



Centro de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Biológicas

TESIS:

**“Efecto del consumo profiláctico de frutos de *Opuntia robusta* en el daño hepático agudo inducido con diclofenaco”**

Que presenta:

Biól. Gloria Stephanie Villa Jaimes

Para obtener el grado: Doctorado en Ciencias Biológicas

Tutores:

Dr. Francisco Javier Avelar González

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Asesor:

Dr. Han Moshage

Aguascalientes, Ags., Enero de 2023

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

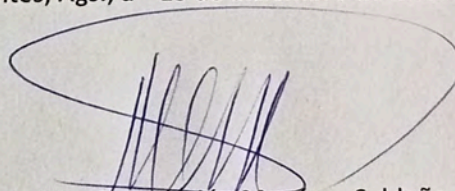
Por medio del presente como TUTOR designado del estudiante **GLORIA STEPHANIE VILLA JAIMES** con ID 260638 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL CONSUMO PROFILÁCTICO DE FRUTOS DE *Opuntia robusta* EN EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO CON DICLOFENACO** un trabajo propio, innovador, relevante 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 13 de diciembre 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



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

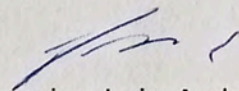
Por medio del presente como TUTOR designado del estudiante **GLORIA STEPHANIE VILLA JAIMES** con ID 260638 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL CONSUMO PROFILÁCTICO DE FRUTOS DE *Opuntia robusta* EN EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO CON DICLOFENACO** un trabajo propio, innovador, relevante 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.

**A T E N T A M E N T E**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 13 de diciembre de 2022**



**Dr. Francisco Javier Avelar González**  
Tutor de tesis

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

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

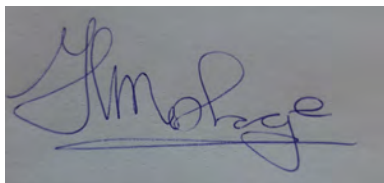
Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante **GLORIA STEPHANIE VILLA JAIMES** con ID 260638 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL CONSUMO PROFILÁCTICO DE FRUTOS DE *Opuntia robusta* EN EL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO CON DICLOFENACO**, un trabajo propio, innovador, 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 13 de noviembre de 2022**

**Dr. Han Moshage**  
**Asesor de tesis**



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





## Biocomponents from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits protect against diclofenac-induced acute liver damage *in vivo* and *in vitro*

Gloria Stephanie Villa-Jaimes<sup>a,1</sup>, Fabio Alejandro Aguilar-Mora<sup>b,1</sup>, Herson Antonio González-Ponce<sup>a,b,1</sup>, Francisco Javier Avelar-González<sup>c</sup>, Ma. Consolación Martínez Saldaña<sup>a</sup>, Manon Buist-Homan<sup>c,d</sup>, Han Moshage<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. Morphology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

<sup>b</sup> Dept. Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands

<sup>c</sup> Dept. Physiology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

<sup>d</sup> Dept. Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Diclofenac  
Hepatocyte  
Apoptosis  
Natural products  
Antioxidants

### ABSTRACT

This study aimed to investigate whether *Opuntia spp.*-extracts protect against diclofenac (DF)-induced hepatotoxicity. Rats were pretreated with *Opuntia* extracts, betanin (Bet) and N-acetylcysteine (NAC) followed by a single challenge of diclofenac. Liver tissue was collected for biochemical and histological analysis. Primary rat hepatocytes were treated with diclofenac (400 μmol/L) with and without pretreatment with *Opuntia* extract. Apoptosis was measured by caspase-3 activity and necrosis by Sytox green staining. RNA was isolated, and real-time qPCR was performed to assess mRNA levels of stress and apoptosis-related genes MnSOD (SOD2), GADD45B and P53. ROS production was measured using the fluorescent MitoSOX assay. Results demonstrated that *Opuntia spp.*-extracts protect against DF-induced liver toxicity via reducing oxidative stress and the inhibition of P53.

### 1. Introduction

Diclofenac (DF) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) available as an over-the-counter (OTC) drug in most countries. DF inhibits prostaglandin and thromboxane synthesis via inhibition of both isoforms of cyclo-oxygenase (COX-1 and COX-2) (Gan, 2010). NSAIDs like diclofenac, ibuprofen and naproxen are widely used for the relieve of acute and chronic pain due to their relative safety. Elderly people and females are at an increased risk for overconsumption of NSAID (González-Ponce et al., 2020; Heard et al., 2006; Leufkens et al., 1990). The 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS) showed that analgesics

were the most common drugs related to acute overdoses in adult patients (11.0%) (Gummin et al., 2020). Diclofenac overdose can lead to severe hepatic adverse drug reactions (ADRs) and kidney damage (Boelsterli, 2003; Lapeyre-Mestre et al., 2013).

Diclofenac toxicity derives from the uncontrolled accumulation of free radicals resulting from both phase I and phase II metabolism. In phase I metabolism CYP2C9, CYP3A4 and CYP2C8 metabolize diclofenac into 4'-hydroxydiclofenac (4-OH) and 5'-hydroxydiclofenac (5-OH). Both 4-OH and 5-OH are highly reactive. In phase II metabolism, 4-OH and 5-OH are glucuronidated by UGT2B1 (rats) or UGT2B7 (humans) into diclofenac 1-O-β-acyl glucuronide. Finally, in phase III metabolism, metabolites are excreted from the liver by Mrp proteins, mainly Mrp2

**Abbreviations:** ADR, adverse drug reaction; ATP, adenosine triphosphate; AUF, arbitrary units of fluorescence; Bet, betanin; Bet+DF, betanin plus diclofenac; CNG, cyclic nucleotide-gated; CTCF, corrected total cell fluorescence; DF, diclofenac; DILI, drug-induced liver injury; DISC, death-inducing signaling complex; FIC, fold induction vs. control; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HO-1, heme oxygenase-1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NAC, N-acetylcysteine; NAC+DF, N-acetylcysteine plus diclofenac; OR, *Opuntia robusta*; OR+DF, *O. robusta* plus diclofenac; OS, *Opuntia streptacantha*; OS+DF, *O. streptacantha* plus diclofenac; OTC, over the counter; PKA, protein kinase A; MGV, mean gray value; MMP, mitochondrial membrane polarization; MPTP, permeability transition pore; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SOD, Superoxide dismutase; 4-OH, 4'-hydroxydiclofenac; 5-OH, 5'-hydroxydiclofenac.

\* Corresponding author at: University Medical Center Groningen, Dept. Gastroenterology and Hepatology Groningen, Hanzeplein 1 9713 GZ, Groningen, the Netherlands.

E-mail address: [a.j.moshage@umcg.nl](mailto:a.j.moshage@umcg.nl) (H. Moshage).

<sup>1</sup> Authors who contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104960>

Received 19 October 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 14 January 2022

Available online 21 January 2022

1756-4646/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

# Molecular and Antioxidant Characterization of *Opuntia robusta* Fruit Extract and Its Protective Effect against Diclofenac-Induced Acute Liver Injury in an In Vivo Rat Model

Gloria Stephanie Villa-Jaimes <sup>1</sup>, Han Moshage <sup>2,3</sup>, Francisco Javier Avelar-González <sup>4</sup>,  
Herson Antonio González-Ponce <sup>5</sup>, Manon Buist-Homan <sup>2,3</sup>, Fidel Guevara-Lara <sup>6</sup>,  
Esperanza Sánchez-Alemán <sup>1,7</sup>, Sandra Luz Martínez-Hernández <sup>8</sup>, Javier Ventura-Juárez <sup>1</sup>,  
Martín Humberto Muñoz-Ortega <sup>6</sup> and Ma. Consolación Martínez-Saldaña <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>2</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, 9713 ZP Groningen, The Netherlands
- <sup>3</sup> Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, 9713 ZP Groningen, The Netherlands
- <sup>4</sup> Departamento de Fisiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>5</sup> Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Aguascalientes 20256, Mexico
- <sup>6</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>7</sup> Unidad de Medicina Familiar 8, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Aguascalientes 20180, Mexico
- <sup>8</sup> Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- \* Correspondence: mcmtzsal@correo.uaa.mx



**Citation:** Villa-Jaimes, G.S.; Moshage, H.; Avelar-González, F.J.; González-Ponce, H.A.; Buist-Homan, M.; Guevara-Lara, F.; Sánchez-Alemán, E.; Martínez-Hernández, S.L.; Ventura-Juárez, J.; Muñoz-Ortega, M.H.; et al. Molecular and Antioxidant Characterization of *Opuntia robusta* Fruit Extract and Its Protective Effect against Diclofenac-Induced Acute Liver Injury in an In Vivo Rat Model. *Antioxidants* **2023**, *12*, 113. <https://doi.org/10.3390/antiox12010113>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 5 December 2022

Revised: 23 December 2022

Accepted: 27 December 2022

Published: 3 January 2023

**Abstract:** A molecular characterization of the main phytochemicals and antioxidant activity of *Opuntia robusta* (OR) fruit extract was carried out, as well as an evaluation of its hepatoprotective effect against diclofenac (DF)-induced acute liver injury was evaluated. Phenols, flavonoids and betalains were quantified, and antioxidant characterization was performed by means of the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH and FRAP assays. UPLC-QTOF-MS/MS was used to identify the main biocompounds present in OR fruit extract was carried out via. In the in vivo model, groups of rats were treated prophylactically with the OR fruit extract, betanin and *N*-acteylcysteine followed by a single dose of DF. Biochemical markers of oxidative stress (MDA and GSH) and relative gene expression of the inducible antioxidant response (*Nrf2*, *Sod2*, *Hmox1*, *Nqo1* and *Gclc*), cell death (*Casp3*) and DNA repair (*Gadd45a*) were analyzed. Western blot analysis was performed to measure protein levels of *Nrf2* and immunohistochemical analysis was used to assess caspase-3 activity in the experimental groups. In our study, the OR fruit extract showed strong antioxidant and cytoprotective capacity due to the presence of bioactive compounds, such as betalain and phenols. We conclude that OR fruit extract or selected components can be used clinically to support patients with acute liver injury.

**Keywords:** oxidative stress biomarkers; bioactive compounds; antioxidant response; dietary antioxidants; diclofenac; liver failure



**Copyright:** © 2023 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/>).

## 1. Introduction

Historically, natural products of plant origin have been used worldwide for medicinal purposes. In Mexico, since pre-Hispanic times, foods, such as corn, maguey and nopal, are part of the population's diet [1,2]. Interest in studying food consumption and its beneficial effects on health has recently increased [3].

The genus *Opuntia* spp. is distributed naturally in the southern United States and Latin America and was introduced in Asia, South Africa, Ethiopia, Australia and countries

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 10-ene-23

NOMBRE: GLORIA STEPHANIE VILLA JAIMES

ID: Z60638

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA LGAC (del posgrado): BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TÍTULO: Efecto del consumo profiláctico de frutos de Opuntia robusta en el daño hepático agudo inducido con diclofenaco\*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

EXPLORA LA POSIBILIDAD DEL USO PROFILÁCTICO DE FRUTOS DE OPUNTIA ROBUSTA PARA DISMINUIR EL DAÑO HEPÁTICO PROVOCADO POR CONSUMO DE DICLOFENACO

**INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:**

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

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

*El egresado cumple con lo siguiente:*

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

*En caso de Tesis por artículos científicos publicados:*

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI 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

Si  SI  
No

FIRMAS

Elaboró:

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

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN 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, designado 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 ALFEREZ 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.



## AGRADECIMIENTOS

Al programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo a este proyecto con número PIT19-2, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 715428. Al personal administrativo del Centro de Ciencias Básicas, el Departamento de Morfología y el Departamento de Apoyo al Posgrado.

A todos los profesores que con su esfuerzo, pasión y dedicación me enseñaron y aportaron a mi crecimiento personal y académico.

A los miembros de mi comité, el Dr. Francisco Javier Avelar y el Dr. Han Moshage por su disposición y apoyo. A mi maestra, Dra. Consolación por las enseñanzas académicas y personales, gracias por apoyarme en los momentos más oscuros en donde me sentí perdida. Gracias por enseñarme a luchar y a esforzarme para cumplir mis metas.

Al Dr. Herson Antonio González Ponce por su colaboración. A Irma Guadalupe Reynosa Andeola y Sonia Sofía por su apoyo técnico, académico y moral. A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio de morfología: Marisol, Mariana Villalobos, Mariana Pizaño, Silvia, Rober y Sam, con quienes reí y compartí mucho, y que hicieron del laboratorio un lugar de trabajo agradable en los momentos de frustración.

A mi amiga y compañera la Dra. Amalinalli Pulido por tantos momentos de risas, llantos y frustraciones. A mis manitos Víctor, Diego, Charal, Denisse por regalarme un hogar en una ciudad ajena. A mi manita Fer por el tiempo compartido y por ser mi compañera de vida y académica, por escucharme, apoyarme y no juzgarme. A mi amiga Marisol por acompañarme en el último año y por sostenerme. A mi amiga Kari por la alegría que contagia y la empatía que brinda.

A mis amigas de Científicas Mexicanas Yun, Andy, Marianita, Zoe, Christella, Dione, Vero, Viri, Rosy, Gloria, Magda, Tina y Mizu por ofrecer un espacio seguro en uno de los momentos más tristes.

A mis amigos y compañeros de generación Nayeli Amalinalli Pulido Hornedo, Fernanda Chávez Samayoa, Karina Alejandra Pedroza García, Carolina Cassandra Barajas García, Fátima Alejandra Martínez Rodríguez, Ekaterina Reyes Pruneta, Alexandro Díaz Barba y Juan José Ayala Rodríguez, Lia Isaura Arteaga Sandoval y Pamela Gallegos por su compañía, por las charlas, las aventuras y las risas que nos han mantenido unidos.

A mi papá Francisco por su apoyo incondicional, a mis hermana Lucero, mi hermano Omar, en especial a mi hermano Christian por regalarme muchos momentos de luz en medio de la oscuridad. A mi pareja Javier por estar para mí en momentos difíciles y por apoyarme.

A mi hijo Milan por ser el motor que me impulsa a continuar.

A mi mamá, Gloria, que extraño mucho y que su ausencia inunda la vida de simbolismos.

A todas las personas que formaron parte de esta experiencia, sin ustedes no sería lo que soy hoy. A mis sesiones de terapia en donde aprendí que también es importante atender la paz mental en la vida académica.



A Fany de hace 4.5 años que se motivó a iniciar esta aventura llena de retos, que a pesar de las pérdidas y sacrificios sigue de pie para volverlo a intentar. Gracias.



**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE GENERAL** ..... 1

**ÍNDICE DE TABLAS** ..... 3

**ÍNDICE DE FIGURAS**..... 4

**RESUMEN**..... 6

**ABSTRACT** ..... 7

**1. INTRODUCCIÓN** ..... 8

    1.1 ESTRÉS OXIDATIVO ..... 8

        1.1.1 Radicales libres ..... 8

        1.1.2 Especies reactivas radicales y no radicales..... 8

        1.1.3 Especies reactivas derivadas del oxígeno ..... 10

        1.1.4 Otras especies reactivas..... 12

        1.1.5 Radicales libres inorgánicos (primarios) y orgánicos (secundarios)..... 13

        1.1.6 Daño oxidativo celular ..... 14

    1.2 DEFENSA ANTIOXIDANTE ..... 18

        1.2.1 Defensa antioxidante endógena ..... 19

        1.2.2 Defensa antioxidante exógena..... 26

    1.3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS ..... 32

        1.3.1 Generalidades..... 32

        1.3.2 Estudios epidemiológicos..... 34

    1.4 HÍGADO ..... 35

        1.4.1 Estructura general..... 35

        1.4.2 Importancia fisiológica y metabólica del hígado..... 37

    1.5 NUTRACÉUTICA..... 38

**2. ANTECEDENTES**..... 39

    2.1 DICLOFENACO ..... 39

        2.1.1 Farmacocinética del diclofenaco..... 40

        2.1.2 Epidemiología del diclofenaco..... 45

        2.1.3 Estudios de hepatotoxicidad inducida por diclofenaco..... 46

    2.2 BETALAÍNAS ..... 48

    2.3 GÉNERO *OPUNTIA* ..... 55

        2.3.1 *Opuntia robusta* J. C. Wendland..... 55

    2.4 *OPUNTIA SP* COMO ALIMENTO FUNCIONAL ..... 56

        2.4.1 *Opuntia robusta* como alimento funcional ..... 57

**3. JUSTIFICACIÓN**..... 58

**4. HIPÓTESIS** ..... 59

**5. OBJETIVOS**..... 59

5.1 OBJETIVO GENERAL .....	59
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	59
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>60</b>
6.1 FASE I: ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DEL EXTRACTO DE <i>O. ROBUSTA</i> .....	61
6.1.1 <i>Colecta de frutos, extracto y almacenamiento</i> .....	61
6.1.2 <i>Elaboración del extracto</i> .....	61
6.1.3 <i>Extracción de compuestos fenólicos solubles</i> .....	61
6.1.4 <i>Determinación de fenoles solubles totales</i> .....	62
6.1.5 <i>Determinación de flavonoides solubles totales</i> .....	63
6.1.6 <i>Determinación de actividad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)</i> .....	64
6.1.7 <i>Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•-)</i> .....	65
6.1.8 <i>Determinación de la actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)</i> .....	66
6.1.9 <i>Cuantificación de betalaínas</i> .....	67
6.1.10 <i>Análisis molecular del extracto de O. robusta por UPLC-QTOF-MS (cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo)</i> .....	68
6.2 MODELO <i>IN VIVO</i> .....	69
6.2.1 <i>Análisis de marcadores de daño hepático</i> .....	71
6.2.2 <i>Análisis histopatológico</i> .....	71
6.2.3 <i>Análisis molecular y de marcadores de estrés oxidativo</i> .....	71
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	77
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
7.1 COLECTA DE FRUTOS, EXTRACTO Y ALMACENAMIENTO.....	77
7.2 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL EXTRACTO DE OR .....	78
7.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL EXTRACTO DEL FRUTO DE <i>O. ROBUSTA</i> .....	79
7.4 ANÁLISIS DE ENZIMAS AMINOTRANSFERASAS (AST Y ALT) .....	82
7.5 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....	83
7.6 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	86
7.7 EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE CONSTITUTIVA E INDUCIBLE .....	87
7.8 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NRF2.....	88
7.9 EVALUACIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA Y APOPTOSIS .....	89
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>90</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>11. REFERENCIAS: .....</b>	<b>100</b>



**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno, cloro, bromo y nitrógeno.....9

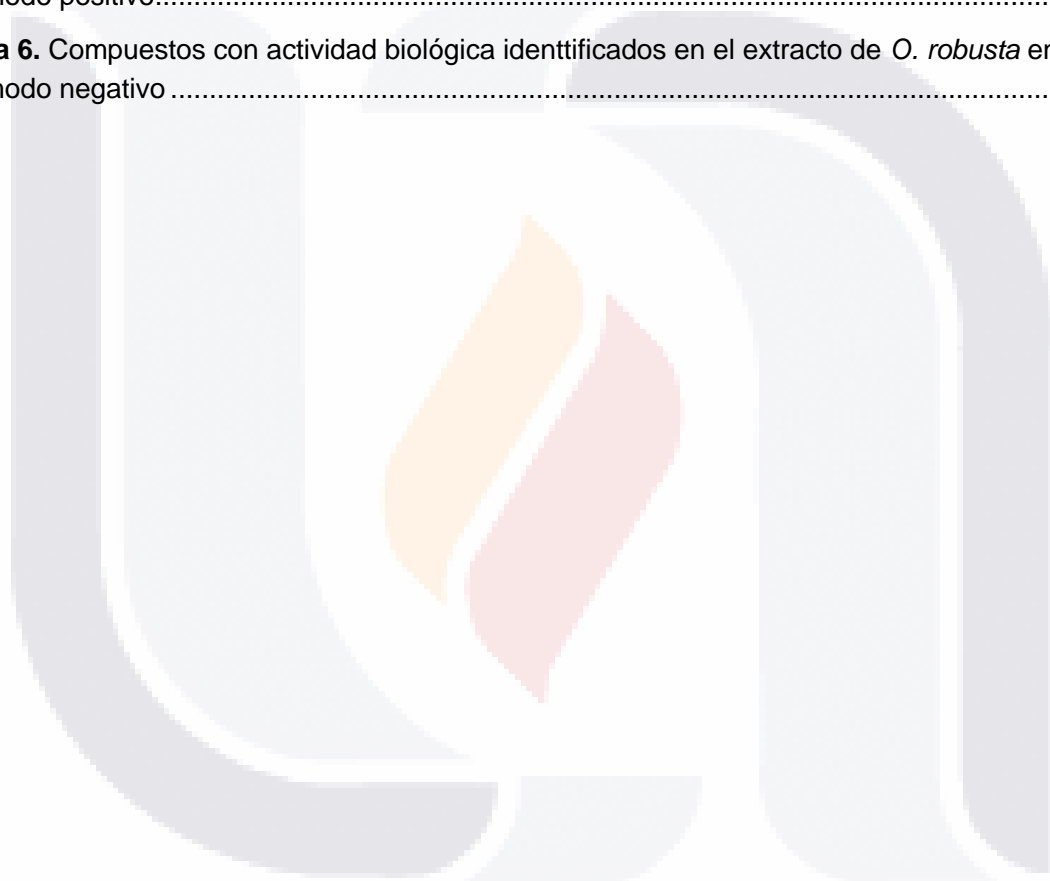
**Tabla 2.** Secuencias de los primers para la qPCR .....74

**Tabla 3.** Valores de fenoles totales, flavonoides, betacianinas, betaxantinas y betalainas totales en el extracto de *O. robusta*.....78

**Tabla 4.** Actividad antioxidante del extracto de *O. robusta* determinada por los ensayos DPPH, ABTS•<sup>+</sup> y FRAP. ....78

**Tabla 5.** Compuestos con actividad biológica identificados en el extracto de *O. robusta* en el ion modo positivo.....80

**Tabla 6.** Compuestos con actividad biológica identificados en el extracto de *O. robusta* en el ion modo negativo .....81



**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Configuración electrónica del O<sub>2</sub> y algunos de sus derivados..... 9

**Figura 2.** Representación de las reacciones y de iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos..... 18

**Figura 3.** Estructura del glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)..... 20

**Figura 4.** Representación de los tres estados redox del ácido L-ascórbico..... 27

**Figura 5.** Estructura de tocoferoles y tocotrienoles..... 28

**Figura 6.** Estructura general de carotenoides..... 30

**Figura 7.** Estructura general de los principales ácidos fenólicos. .... 31

**Figura 8.** El esqueleto de fenilbezopirano es la estructura básica de los flavonoides..... 31

**Figura 9.** Familias de flavonoides y sus patrones de sustitución. .... 32

**Figura 11.** Principales metabolitos de la biotransformación del diclofenaco..... 41

**Figura 12.** Mecanismos propuestos para la bioactivación del DF..... 43

**Figura 13.** Estrés oxidativo inducido por df y daño mitocondrial en hepatocitos..... 44

**Figura 14.** Mecanismos de daño mitocondrial provocado por DF..... 45

**Figura 15.** Estructura química del ácido betalámico, betaxantina y derivados..... 50

**Figura 16.** Cladodio, fruto y espinas de *Opuntia robusta*..... 56

**Figura 17.** Curva de calibración de fenoles solubles totales..... 63

**Figura 18.** Curva de calibración de fenoles solubles totales..... 64

**Figura 19.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox usando DPPH como radical libre..... 65

**Figura 20.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox usando ABTS<sup>•+</sup> como radical libre..... 66

**Figura 21.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a trolox mediante el método FRAP..... 67

**Figura 22.** Fruto de *O. robusta*. .... 78

**Figura 23.** Espectro de masas del estándar de betanina y del extracto de *O. robusta*..... 80

**Figura 24.** Concentraciones séricas de los marcadores de lesión hepática ast y alt..... 83

**Figura 25.** Histopatología de los hígados de rata del grupo control y el grupo tratado con DF..... 84

**Figura 26.** Histopathología de tejido hepático de ratas tratadas con OR, Bet y NAC..... 85

**Figura 27.** Histopatología de tejido hepático de ratas tratadas con OR, Bet y NAC..... 86

**Figura 28.** Marcadores de estrés oxidativo GSH y MDA. .... 87

**Figura 29.** Expresión génica relativa de genes antioxidantes..... 88

**Figura 30.** Análisis de Western blot y cuantificación de la expresión de Nrf2..... 89

**Figura 31.** Tinción inmunohistoquímica y cuantificación de la caspasa-3 activa..... 90





## RESUMEN

El diclofenaco es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de venta libre que presenta elevados índices de consumo a nivel mundial, en el tratamiento de problemas articulares, principalmente. Existen reportes en Europa y Estados Unidos que indican que produce daño hepático en poblaciones susceptibles mayores de 60 años con patologías primarias, sin embargo, en México hay pocos reportes. Actualmente existe una marcada tendencia a utilizar compuestos naturales para prevenir y/o revertir daños en el organismo. Se ha reportado que la pulpa del fruto de *Opuntia* (tuna), presenta una cantidad importante de compuestos bioactivos como vitamina C, fenoles y betalaínas (betanina) con actividad antioxidante y efectos benéficos para la salud intestinal, cardiovascular y hepática. Reportes indican que la especie *O. robusta* (OR) se distribuye de forma silvestre y no presenta riesgo de extinción, además, se ha demostrado que el cladodio (nopal) provee efectos benéficos en el metabolismo humano, pero existen pocos estudios sobre la capacidad nutracéutica del fruto (tuna) por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto protector del extracto del fruto de OR en la toxicidad hepática aguda inducida con diclofenaco. La caracterización nutracéutica *in vitro* del extracto del fruto de OR mediante técnicas espectrofotométricas se llevó a cabo para la cuantificación de compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas, así como la capacidad antioxidante se realizó mediante los ensayos ABTS<sup>+</sup>, DPPH y FRAP. Se identificaron los principales biocompuestos presentes en el extracto de OR mediante el análisis UPLC-QTOF-MS/MS. La capacidad hepatoprotectora del extracto se llevó a cabo en un modelo *in vivo* de daño hepático agudo inducido con diclofenaco. Se organizaron 8 grupos de ratas Wistar macho (200-250 g) que recibieron profilácticamente los tratamientos del extracto de *O. robusta* (800 mg/kg/5días), betanina (Bet, 25 mg/kg/5días) y N-acetylcysteina (NAC; 40 mg/kg/5días) seguido de una sola dosis de DF (75 mg/kg). Se realizó un análisis histopatológico (H&E y PAS), se monitorearon biomarcadores séricos de lesión hepática (AST y ALT). En tejido hepático se cuantificaron las concentraciones de los biomarcadores de estrés oxidativo (MDA y GSH) y se analizó la expresión de genes de respuesta antioxidante inducible modulados por el factor nuclear Nrf2 (*Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gclc*), citoprotectores (*Hmox1*, *Nqo1*) y como biomarcador de muerte celular la expresión génica de caspas-3 activa (*Casp3*) y su inmunolocalización *in situ*. Nuestros resultados muestran que la alta capacidad antioxidante del extracto del fruto de OR se debe a la presencia de compuestos bioactivos como betalaínas, ácidos fenólicos y vitamina C, mediante la activación de la vía de Nrf2.

## ABSTRACT

Diclofenac is an over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that presents high rates of consumption worldwide, mainly in the treatment of joint problems. There are reports in Europe and the United States indicating that it causes liver damage in susceptible populations over 60 years of age with primary pathologies, however, in Mexico there are few reports. Currently there is a marked tendency to use natural compounds to prevent and/or reverse damage to the body. It has been reported that the pulp of the *Opuntia* spp. (prickly pear) fruit presents a significant amount of bioactive compounds such as vitamin C, phenols and betalains (betanin) with antioxidant activity and beneficial effects for intestinal, cardiovascular and liver health. Reports indicate that the species *O. robusta* (OR) is distributed in the wild and does not present a risk of extinction; furthermore, it has been reported that the cladode (nopal) provides beneficial effects on human metabolism, but there are few studies on the nutraceutical capacity of the fruit (prickly pear) so in the present work the protective effect of the extract of OR fruit in the acute hepatic toxicity induced with diclofenac was evaluated. The *in vitro* nutraceutical characterization of the OR fruit extract by means of spectrophotometric techniques was carried out for the quantification of phenolic compounds, flavonoids, and betalains as well as the antioxidant capacity by means of the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH, and FRAP assays. The main biocompounds present in the extract of *O. robusta* by means of UPLC-QTOF-MS/MS analysis. The hepatoprotective capacity of the extract was carried out in an *in vivo* model of diclofenac-induced acute liver injury. Eight groups of male Wistar rats (200-250 g) were organized and prophylactically received the treatments of *O. robusta* fruit extract (800 mg/kg/5 days), betanin (Bet, 25 mg/kg/5 days) and N-acetylcysteine (NAC; 40 mg/kg/5 days) followed by a single dose of DF (75 mg/kg). Histopathological analysis (H&E and PAS) was performed, serum biomarkers of liver injury (AST and ALT) were monitored. In liver tissue, the concentrations of oxidative stress biomarkers (MDA and GSH) were quantified and the expression of inducible antioxidant response genes modulated by the nuclear factor Nrf2 (*Sod1*, *Sod2*, *Cat*, *Gclc*), cytoprotective (*Hmox1*, *Nqo1*) and active caspase-3 gene expression (*Casp3*) and its immunolocalization *in situ* as a biomarker of cell death. Our results show that the high antioxidant capacity of the OR fruit extract is due to the presence of bioactive compounds such as betalains, phenolic acids and vitamin C through the activation of the Nrf2 pathway.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Estrés oxidativo

Se puede definir al “estrés” como un proceso en el cual la homeostasis de un individuo se altera, producto de estímulos que son recibidos ya sea del medio, fisiológicos o psicológicos, y que dan lugar a la activación de una respuesta que va a depender de la capacidad de adaptación del organismo y de la intensidad del estímulo (Rahal et al., 2014). En los sistemas vivos, se conoce como “estrés oxidativo celular” al desbalance entre moléculas oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, es decir, cuando falla el proceso homeostático y la generación de especies químicas reactivas supera la capacidad de defensa antioxidantes, lo que provoca daño a biomoléculas como DNA, lípidos y proteínas, principalmente, lo que conlleva al daño celular (Halliwell & Gutteridge, 2015; Rahal et al., 2014; Sies, 1997).

Es importante señalar que el estrés oxidativo está dado por un exceso de átomos o moléculas que favorecen, ya sea directa o indirectamente, la oxidación de otras moléculas.

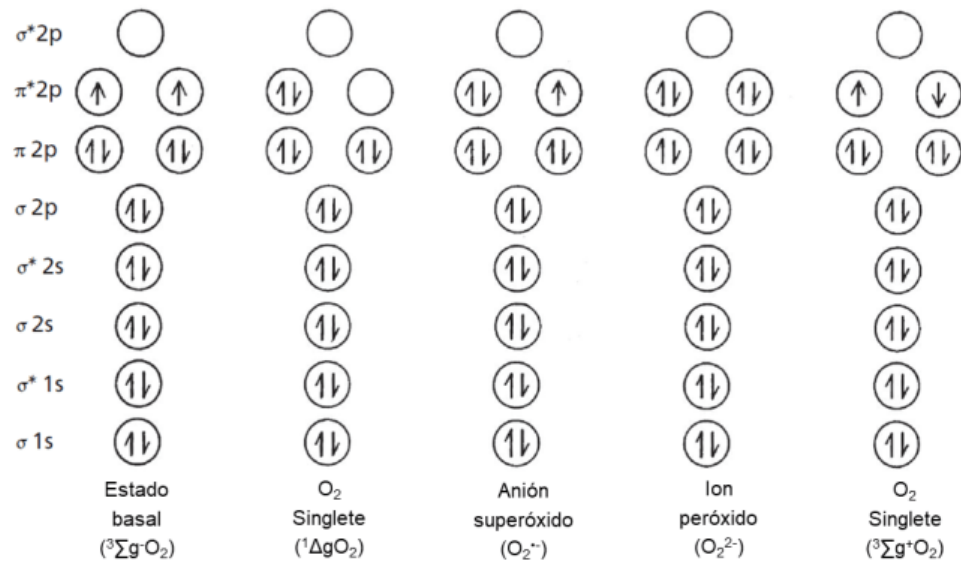
#### 1.1.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que pueden existir independientemente (de ahí su nombre “libre”) y que poseen un electrón que ocupa un orbital atómico o molecular por sí sólo, pueden formarse por la pérdida o ganancia de un solo electrón proveniente de un átomo o molécula no-radical, dando lugar a un electrón desapareado y dejando a la molécula o átomo con carga positiva; un radical libre se expresa mediante un punto superíndice después de la fórmula química (Halliwell & Gutteridge, 2015). El número impar de electrones provoca que estas especies sean inestables, de vida corta y altamente reactivas, por lo que, al extraer electrones de otras moléculas para ganar estabilidad, provocan que la molécula atacada que perdió su electrón se convierta en un radical libre, comenzando con una cascada de reacción en cadena que puede llevar a un daño celular (Phaniendra et al., 2015).

#### 1.1.2 Especies reactivas radicales y no radicales

Las especies reactivas incluyen a los radicales libres y algunos no radicales que pueden actuar como agentes oxidantes y/o se pueden convertir fácilmente en radicales. El oxígeno existe en el ambiente en su forma molecular ( $O_2$ ), y por sí mismo es un radical debido a que posee dos electrones desapareados localizados en orbitales  $2\pi^*$  antienlazante (Figura 1), sin embargo, presentan el mismo número cuántico espín (paralelos), lo que le proporciona mayor estabilidad. Para que el oxígeno actúe como agente oxidante, es elemental que acepte un electrón de otro átomo o molécula cuyo espín sea igual, de esta manera podrá entrar en los espacios vacíos de los orbitales; es debido a esto que el oxígeno reacciona lento con otras moléculas (Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015).





**Figura 1.** Configuración electrónica del  $O_2$  y algunos de sus derivados. El átomo de oxígeno posee 8 electrones, por lo tanto el oxígeno diatómico posee 16 electrones. Tomado de Halliwell & Gutteridge, 201

A excepción de organismos anaerobios y aerotolerantes, todas las formas de vida requieren de  $O_2$  para la producción eficiente de energía a través de cadenas transportadoras que donan electrones al oxígeno (Halliwell & Gutteridge, 2015), de esta manera, el oxígeno es reducido a agua mientras que en los intermediarios se forman radicales libres y otras especies reactivas no radicales, a lo que comúnmente se denomina como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que poseen un tiempo de vida generalmente corto aunque en algunas especies puede ser más prolongado. De acuerdo con lo anterior, se conoce que todos los radicales del oxígeno son ROS, pero no todos los ROS son radicales (Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015; Sies, 1997).

Se pueden formar otros radicales *in vivo*, como los centrados en carbono que son derivados intermediarios de la peroxidación lipídica; los radicales centrados en nitrógeno que pueden ser formados a partir de antioxidantes y poseen grupos amino (-NH); algunos metales de transición; algunos óxidos de nitrógeno (como óxido nítrico,  $NO^*$ ) y a los cuales se les conoce como especies reactivas de nitrógeno; especies reactivas de cloro; especies reactivas de bromo y especies reactivas de azufre (Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015).

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno, cloro, bromo y nitrógeno

Radicales libres	No radicales
------------------	--------------

**Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Anión superóxido,  $O_2^{\cdot-}$   
 Hidroxilo,  $OH^{\cdot}$   
 Hidroperoxilo,  $OH_2^{\cdot}$   
 Carbonato,  $CO_3^{\cdot-}$   
 Peroxil,  $RO_2^{\cdot}$   
 Alcoxil,  $RO^{\cdot}$   
 Dióxido de carbono,  $CO_2^{\cdot-}$   
 $O_2$  singlete,  $^1\Sigma g^+$

**Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Peróxido de Hidrógeno,  $H_2O_2$   
 Ácido hipobromoso,  $HOBr$   
 Ácido hipocloroso,  $HOCl$   
 Oxígeno singlete,  $O_2^1 \Delta g$   
 Peróxidos orgánicos,  $ROOH$   
 Peroxinitrito,  $ONOO^-$   
 Peroxinitrato,  $O_2NOO^-$   
 Ácido peroxinitroso,  $ONOOH$   
 Ácido peroxinitrico,  $O_2NOOH$   
 Nitroperoxicarbonato,  $ONOOCO^-$   
 Peroxomonocarbonato,  $HOOCO^-$

**Especies reactivas de cloro (RCS)**

Cloro atómico,  $Cl^{\cdot}$

**Especies reactivas de cloro (RCS)**

Ácido hipocloroso,  $HOCl$   
 Cloruro de nitrilo,  $NO_2Cl$   
 Cloruro de nitrosilo,  $NOCl$   
 Cloraminas  
 Gas cloro,  $Cl_2$   
 Cloruro de bromo,  $BrCl$   
 Dióxido de cloro,  $ClO_2$

**Especies reactivas de bromo (RBS)**

Bromo atómico,  $Br^{\cdot}$

**Especies reactivas de bromo (RBS)**

Ácido hipobromoso,  $HOBr$   
 Gas bromo,  $Br_2$   
 Cloruro de bromo,  $BrCl$

**Especies reactivas de nitrógeno (RNS)**

Óxido nítrico,  $NO^{\cdot}$   
 Dióxido de nitrógeno,  $NO_2^{\cdot}$   
 Radical nitrato,  $NO_3^{\cdot}$

**Especies reactivas de nitrógeno (RNS)**

Ácido nitroso,  $HNO_2$   
 Catión nitrosil,  $NO^+$   
 Anión nitroxil,  $NO^-$   
 Tetraóxido de dinitrógeno,  $N_2O_4$   
 Trióxido de dinitrógeno,  $N_2O_3$   
 Peroxinitrito,  $ONOO^-$   
 Peroxinitrato,  $O_2NOO^-$   
 Ácido peroxinitroso,  $ONOOH$   
 Ácido peroxinitrico,  $O_2NOOH$   
 Catión nitronium (nitril),  $NO_2^+$   
 Peroxinitritos de alquilo,  $ROONO$   
 Proxinitratos de alquilo,  $RO_2ONO$   
 Cloruro de nitrilo,  $NO_2Cl$   
 Nitrato de peroxiacetilo,  $CH_3C(O)OONO_2$

Se enlistan las principales especies reactivas radicales y no radicales derivados de oxígeno, cloro, bromo y nitrógeno. Estos compuestos son agentes oxidantes y/o pueden convertirse en radicales fácilmente (como  $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $ONOO^-$ ,  $H_2O_2$ ). Tomado de Halliwell & Gutteridge, 2015.

**1.1.3 Especies reactivas derivadas del oxígeno**

Debido a que las ROS son las especies químicas más importantes producidos durante diversas reacciones metabólicas, es relevante conocer los principales radicales que se forman a partir del oxígeno. Las formas más reactivas del  $O_2$  (Figura 1) son los singletes  $^1\Sigma g^+O_2$ , que tiene dos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

electrones desapareados con giros opuestos, y  $^1\Delta gO_2$ , que tiene a sus dos electrones apareados, y se forman por una entrada de energía en uno de los dos electrones y cambia de giro, de los cuales el estado  $^1\Sigma g+2$  cae rápidamente al estado  $^1\Delta g_2$ , por lo cual éste último es el único que se considera en los sistemas biológicos y a pesar de que no es un radical libre, incrementa su reactividad en comparación con el estado fundamental ( $O_2$ ). En ambas formas la restricción del espín es removida (Halliwell & Gutteridge, 2015; Torres, 2002).

En la reducción del  $O_2$  a agua, se añade un electrón en uno de los orbitales  $\pi^*$  antienlazante, lo que resulta en la producción inicial de un radical libre, el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) con sólo un electrón desapareado, esto sucede en los organismos aerobios ya que una porción de los electrones que atraviesan la cadena respiratoria, en la membrana mitocondrial interna, sale de ésta y es captada por el  $O_2$ , proceso que ocurre principalmente en la semiubiquinona, ubiquinol y en el complejo I. La reactividad de  $O_2^{\bullet-}$  es baja, pero puede reaccionar a tasas considerables con quinonas, fenoles, hierro libre o unido a algunas proteínas con centros Fe-S y otros radicales como  $NO^{\bullet}$ , radicales fenoxi o el propio  $O_2^{\bullet-}$ . En condiciones fisiológicas puede reaccionar con otro superóxido y se da lugar a la dismutación espontánea, en donde la misma especie química es tanto oxidada como reducida, y donde uno de los  $O_2^{\bullet-}$  se protona para generar el radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ) que a su vez reacciona con otro superóxido para dar lugar al peróxido de hidrógeno (Phaniendra et al., 2015). Este radical generalmente no atraviesa membranas pero puede pasar mediante proteínas intercambiadoras de aniones (Diplock, 1991; Halliwell & Gutteridge, 2015; Torres, 2002).

Las mitocondrias contribuyen significativamente a la formación de  $H_2O_2$  a través de la acción de enzimas (monoaminas oxidasas) y por la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  de la cadena respiratoria. También se puede producir por enzimas como oxidasa de xantina, oxidasas de aminoácidos, oxidasas de fenoles, entre otras. Debido a que se mezcla rápidamente con el agua, se puede difundir entre y dentro de las células, esta difusión está influenciada por la composición de lipídica de la membrana. También existen canales de membrana conocidos como peroxiporinas, parecidos a las acuaporinas del agua, por los cuales pueden atravesar las moléculas de peróxido de hidrógeno. A pesar de su baja reactividad con biomoléculas, el  $H_2O_2$  puede inactivar algunas enzimas directamente mediante la oxidación de grupos tiol esenciales para catalizar (por ejemplo, peroxirredoxinas); también puede inactivar otras enzimas como glucosa-3-fosfato-deshidrogenasa y algunas caspasas. La producción de  $H_2O_2$  es lenta y constante, y bajo condiciones basales, tiene funciones fisiológicas como señalizador intracelular. Sin embargo,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

puede presentar efectos tóxicos cuando sus concentraciones aumentan (Diplock, 1991; Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015; Torres, 2002).

Como se menciona previamente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede atravesar las membranas celulares y reaccionar con metales de transición como Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup>, de los cuales al aceptar un electrón (se reduce), se fragmenta y da lugar a la formación del radical hidroxilo (Phaniendra et al., 2015) y el ion hidroxilo (HO<sup>-</sup>), mediante la reacción conocida como reacción de Fenton:



El ion hidroxilo se protona y forma agua, sin embargo, el OH<sup>•</sup> es uno de los radicales más reactivos debido a que es de vida corta y reacciona con casi cualquier molécula orgánica en su vecindad en el lugar donde es formado; presenta tres tipos de reacciones, principalmente: abstracción de hidrógeno, adición y transferencia de electrones (Diplock, 1991; Halliwell & Gutteridge, 2015; San-Miguel & Martin-Gil, 2009; Torres, 2002).

Dado que la mayoría de los metales de transición tienen electrones desapareados (Fe<sup>2+</sup>, cuatro; Fe(III), cinco; Cu y Cu<sup>2+</sup>, uno), pueden ser considerados como radicales ya que pueden tanto donar como aceptar electrones. A su vez, su distribución y disponibilidad va a mediar la toxicidad de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Torres, 2002).

Otro radical que se llega a formar a partir de la reacción de OH<sup>•</sup> con carbonato o bicarbonato es el radical carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que también se puede formar cuando el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) reacciona con CO<sub>2</sub>. El radical carbonato oxida biomoléculas fácilmente y está involucrado en las reacciones peroxidasas de la enzima superóxido dismutasa-CuZn, sin embargo es menos dañino que el radical hidroxilo (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.1.4 Otras especies reactivas**

El óxido nítrico, también conocido como monóxido de nitrógeno (NO<sup>•</sup>), es un gas que atraviesa fácilmente las membranas, es un radical libre debido a que posee un electrón desapareado en un orbital 2p π\* antienlazante. Tiene un rol fisiológico en el cerebro, el pene, el sistema vascular y otros tejidos; muchos de sus efectos fisiológicos se dan por su unión a grupos hemo-Fe<sup>2+</sup> en la enzima guanilato ciclasa, sin embargo, un exceso en su producción puede causar daño celular ya sea directamente (mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa o citocromo oxidasa, por ejemplo), o bien, a través de su interacción y/o la de sus productos de oxidación (especies reactivas de nitrógeno) con ROS. Cuando el NO<sup>•</sup> reacciona con O<sub>2</sub><sup>-</sup> se da lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), se piensa que ambas especies químicas (NO<sup>•</sup> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>)



antagonizan las reacciones biológicas de cada una, o bien, si  $\text{NO}^\bullet$  reacciona con  $\text{O}_2$ , el producto que se genera es dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\bullet$ ); ambas especies son más reactivas que el  $\text{NO}^\bullet$  (Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015; Torres, 2002).

A pesar de que  $\text{ONOO}^-$  no es un radical, éste puede ser causante de la inactivación de algunas enzimas mediante la nitración de proteínas, modificación de residuos de aminoácidos u oxidación de grupos  $-\text{SH}$ . Algunas proteínas susceptibles al ataque de  $\text{ONOO}^-$  son enzimas del metabolismo de xenobióticos como N-acetiltransferasas, citocromo P450 (CYP450) y glutatión S-transferasas, y proteínas neurofilamentosas, ciclooxygenasas, albúmina, proteínas mitocondriales (algunas del complejo I), lactato deshidrogenasa (LDH), entre otras (Halliwell & Gutteridge, 2015; Phaniendra et al., 2015; Torres, 2002).

Por otra parte, también se encuentran los productos que se forman a través de la reacción de tioles con radicales centrados en el carbono, los radicales tiilo ( $\text{RS}^\bullet$ ), que también se pueden formar a través de la reacción de grupos  $-\text{SH}$  (como GSH) con ROS ( $\text{OH}^\bullet$ , peroxil, alcoxil,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). La oxidación de tioles puede provocar la formación de diversos radicales de oxígeno, azufre y oxiazufre que son altamente citotóxicos (Halliwell & Gutteridge, 2015).

La mieloperoxidasa (MPO) es una proteína tetramérica que abunda en los neutrófilos y cataliza la conversión del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y cloruro a ácido hipocloroso (García Morales et al., 1998), y también oxida el bromo ( $\text{Br}^-$ ) a ácido hipobromoso ( $\text{HOBr}$ ). El  $\text{HOCl}$  es un no radical, pero puede causar daño en la cadena lateral, fragmentación y agregación de proteínas mediante diversas reacciones como oxidación de cisteína y residuos de metionina, de igual manera, reacciona con los grupos  $-\text{NH}_2$  para dar lugar a cloraminas. También, puede atacar lípidos al agregar dobles enlaces en residuos de ácidos grasos insaturados en fosfolípidos o esterificarlos a colesterol para dar clorohidrinas, de la misma manera, se pueden formar bromohidrinas a partir de la reacción con  $\text{HOBr}$ . Otros compuestos como bromoaminas y cloroaminas también pueden ser generados a partir de estos compuestos, que pueden reaccionar con radicales libres como  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para producir radicales centrados en nitrógeno (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.1.5 Radicales libres inorgánicos (primarios) y orgánicos (secundarios)**

Los radicales se pueden clasificar en inorgánicos o primarios y en orgánicos o secundarios (Vladimirov, 1998). Los primarios se forman a partir de la transferencia de electrones sobre átomos, por ejemplo, los distintos estados de reducción del  $\text{O}_2$  y entre ellos se encuentran  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{NO}^\bullet$ . Los radicales libres secundarios se forman por la transferencia de electrones de un

radical primario a una molécula primaria o cuando reaccionan dos radicales primarios entre sí (Venereo, 2002).

### **1.1.6 Daño oxidativo celular**

El estrés oxidativo se puede generar bajo la exposición de la materia viva a distintas fuentes que provocan un desequilibrio en el sistema redox, es decir entre las moléculas prooxidantes y los sistemas antioxidantes. Como se mencionó previamente, este desequilibrio provoca daño a las distintas biomoléculas (DNA, proteínas y lípidos), lo que eventualmente se vería reflejado en el desarrollo de enfermedades como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), catarata senil, insuficiencia renal, hipertensión, daño hepático (cirrosis, hepatopatía alcohólica), cáncer (colorrectal, pulmonar, mama, próstata, vejiga), enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple), entre otras.

#### **1.1.5.1 Daño al DNA**

El DNA mitocondrial es más susceptible a la oxidación por ER, debido a su localización en proximidad a los sitios donde éstos se forman. A este tipo de daño se le conoce como daño oxidativo al DNA y se relaciona con la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Dizdaroglu et al., 2002). El radical  $\text{OH}^{\bullet}$  reacciona directamente con todos los componentes del DNA (bases púricas y pirimídicas y el esqueleto de azúcar), por lo que puede causar la ruptura de la cadena doble o simple (Chatgialiloglu & O'Neill, 2001; Phaniendra et al., 2015).

La oxidación se da mediante la formación de aductos del radical  $\text{OH}^{\bullet}$  con las pirimidinas debido a la extracción de un átomo de H por parte del radical hidroxil; estos aductos incluyen 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), 8-hidroxideoxiadenosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina; además de que esta oxidación puede provocar un cambio en las bases nitrogenadas (puntos calientes), las más frecuentes son guanina-citocina (González-Torres et al., 2000; Phaniendra et al., 2015). Por otra parte, se puede romper el enlace de la desoxirribosa con el grupo fosfato del siguiente nucleótido al oxidarse la primera; cuando se acumulan numerosos radicales hidroxilo en una zona, se provoca el rompimiento la cadena sencilla y eventualmente de la cadena doble, dañando el material genético. Los sitios más susceptibles a sufrir el ataque por este radical son los carbonos 4 y 5 debido a su posición tridimensional son los sitios más expuestos (González-Torres et al., 2000).

También, la formación de aductos se puede entre una molécula electrofílica y algún sitio nucleofílico en el DNA. Existen 18 sitios en los cuales se puede formar un aducto en el DNA, y la especificidad de la reacción se da en función a la reactividad de la especie, la nucleofilicidad de los sitios del DNA y a factores estéricos. Los anillos de nitrógeno, como N3 y N7, de la

guanina y adenina son los más nucleofílicos, sin embargo, estéricamente el N7 de la guanina está más expuesto y es más accesible que el N3 de adenina, por lo tanto es menos probable que reaccione con electrofílicos. También N1 y N3 de la citosina son sitios altamente nucleofílicos que por su efecto estérico, no reaccionan ampliamente en el DNA (La & Swenberg, 1996).

#### **1.1.5.3 Daño a proteínas**

La oxidación de proteínas puede ser provocada por especies reactivas como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_3$  y oxígeno singlete (Phaniendra et al., 2015), sin embargo el radical hidroxilo es altamente reactivo con proteínas ya que causa enlaces cruzados entre proteínas mediante modificaciones en residuos de aminoácidos como tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, lo que provoca la desnaturalización y pérdida la función de proteínas, pérdida de actividad enzimática, pérdida de la función de receptores y transporte de proteínas, entre otros (González-Torres et al., 2000).

La presencia de grupos carbonilo en las proteínas es considerada como marcador de oxidación de proteínas debido a su reacción con diferentes residuos de aminoácidos, previamente mencionados, aunque también se pueden considerar dos marcadores más, la o-tirosina (marcador del radical hidroxilo) y la 3-nitrotirosina (Dean et al., 1997; González-Torres et al., 2000). Por otra parte, los cambios en grupos  $-SH$  a grupos disulfuro y otras especies oxidadas pueden ser generadas en las proteínas, lo que resulta en cambios conformacionales y una consiguiente pérdida de la función proteica (Dean et al., 1997).

Por otra parte, se ha estudiado la reacción de la conversión del aminoácido tirosina a 3-nitrotirosina a partir de  $ONOO^-$ , la cual es muy usada como biomarcador de generación de peroxinitrito y se relaciona con diversas enfermedades (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.1.5.3 Daño a lípidos (lipoperoxidación)**

Las membranas biológicas se componen de grandes cantidades de cadenas de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados, por sus siglas en inglés). Estas membranas llevan consigo proteínas cuya cantidad varía en función al tipo de membrana (que a su vez varía de acuerdo al tipo de tejido y tipo de membrana dentro de la célula); algunas proteínas se encuentran unidas de manera libre a la superficie de la membrana (extrínsecas) pero la mayoría se encuentra unida firmemente (intrínsecas) de manera parcialmente incrustada, en el interior o a través de la membrana. La lipoperoxidación se da a nivel de éstas proteínas así como de los lípidos de naturaleza anfipática. En las células de mamíferos los lípidos que predominan son los fosfolípidos que son ésteres basados en glicerol, aunque algunas membranas también

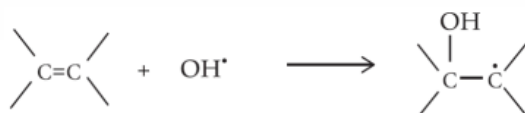
contienen porciones de esfingolípidos y colesterol, para darle cierta rigidez. Las cadenas de ácidos grasos se componen de hidrocarburos con 14 a 24 átomos de carbono, algunos unidos por dobles enlaces con configuración *cis*, lo que provoca que se formen torceduras en la estructura (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Las membranas biológicas (plasmática y de los organelos celulares) se componen de bicapas lipídicas, en donde la fluidez depende de la presencia de cadenas de PUFAs, por lo tanto son semipermeables ya que permiten el paso de algunos iones y moléculas a través de la misma membrana o de canales compuestos de proteínas (Halliwell & Gutteridge, 2015).

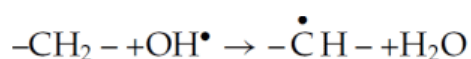
La peroxidación de lípidos se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos generales. Debido a que los lípidos son los encargados de mantener la integridad de las membranas celulares, su peroxidación altera el ensamblaje, composición, estructura y dinámica. Los peróxidos lipídicos son compuestos reactivos que pueden propargarse para generar más ER, o bien, descomponerse en compuestos reactivos que pueden entrecruzarse con el DNA y proteínas (Gaschler & Stockwell, 2017).

Como todas las ER, los peróxidos lipídicos se generan en diferentes contextos celulares y algunos pueden servir como moléculas señalizadoras de diferentes vías (como en la modificación postraduccional de proteínas) y pueden ser producidos o no por procesos enzimáticos y los lípidos que preferentemente se oxidan son PUFAs de cadena larga con más de un doble enlace (Gaschler & Stockwell, 2017).

La peroxidación de lípidos tiene diferentes etapas, la **iniciación** puede ser causada por la adición de una ER a un lípido o, más comúnmente, por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) por parte de una ER (Gaschler & Stockwell, 2017; Girotti, 1985; Halliwell & Gutteridge, 2015), resultando en la formación de un radical carbón. Un buen ejemplo es el radical OH•, que puede reaccionar por ambos mecanismos, adición



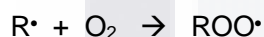
o abstracción de un H•,





Debido a que la presencia de un doble enlace debilita la energía de enlace de los enlaces C-H que s, e encuentran en los átomos de carbono adyacente, a los que se les conoce como hidrógenos alílicos, haciendo que termodinámicamente sean más susceptibles a la oxidación por parte de radicales OH•, HO<sub>2</sub>•, RO• y RO<sub>2</sub>•. Por lo que mientras más dobles enlaces posea un PUFA, más susceptible será a la oxidación (Gaschler & Stockwell, 2017; Halliwell & Gutteridge, 2015).

La fase de la **propagación** puede darse mediante la estabilización del radical carbón mediante un reordenamiento molecular para formar conjugados dienos. Si entran en contacto dos radicales carbono dentro de una membrana, éstos se podrían reticular las cadenas laterales de ácidos grasos, pero en condiciones aerobias, es más probable que estos radicales se combinen con O<sub>2</sub> (Girotti, 1985), lo que da lugar a la formación de un radical peroxil (ROO• o ROO<sub>2</sub>•):



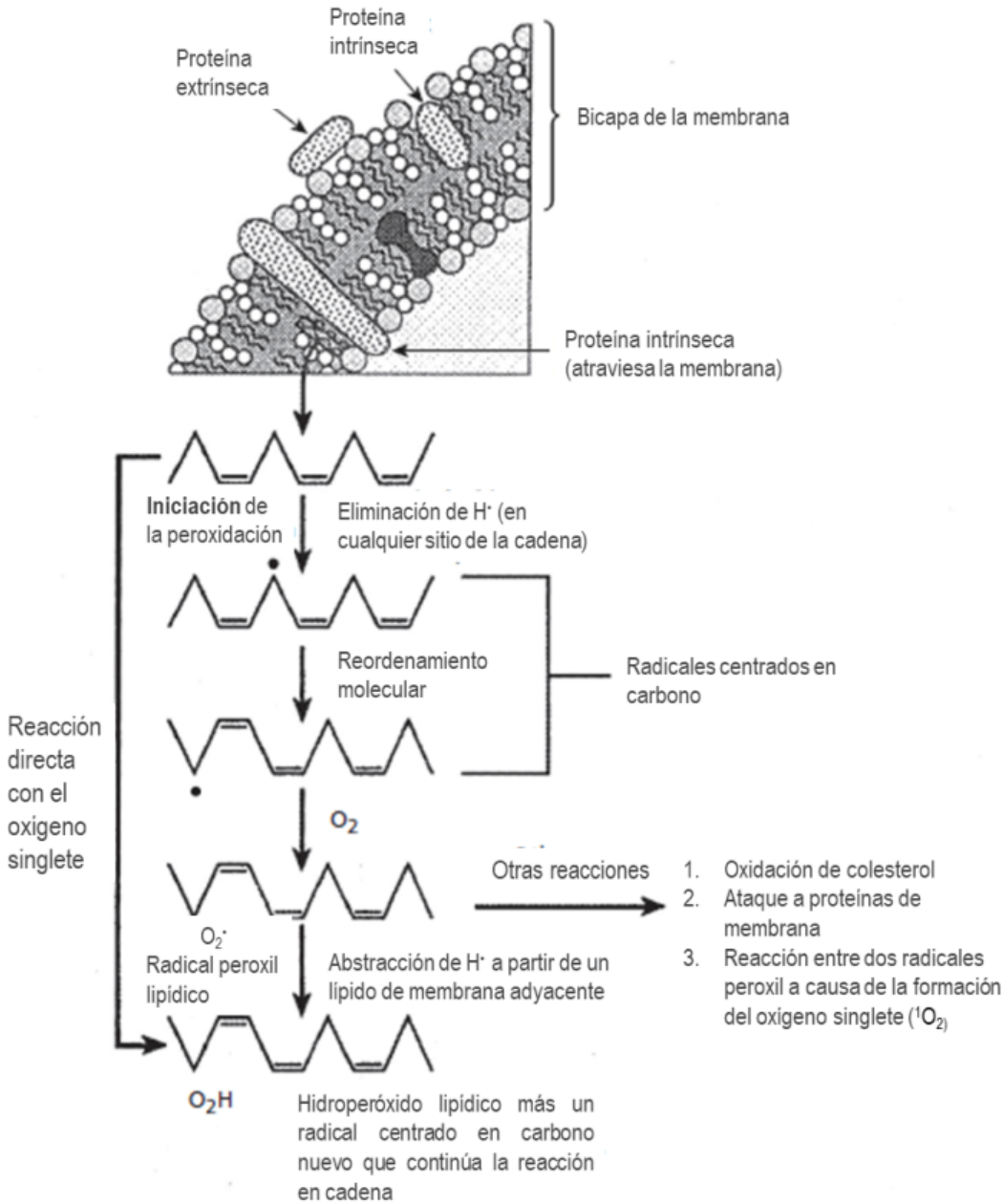
Por lo que la concentración de oxígeno es lo que va a determinar la reacción de entrecruzamiento entre cadenas de ácidos grasos o la reacción con otros componentes de la membrana como grupos -SH de proteínas. La propagación se va a dar al momento en que el radical peroxil abstrae un H• de una cadena de ácidos grasos adyacente:



de esta manera, el nuevo radical carbono puede reaccionar con O<sub>2</sub> para formar nuevos radicales peroxil y dar lugar a la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Entre estas reacciones, el RO<sub>2</sub>• puede combinarse con el H• que ha extraído para dar lugar a formación de un hidroperóxido lipídico (ROOH, también conocido como peróxido lipídico que también incluye peróxidos cíclicos), dicha reacción tiene lugar cuando un radical peroxil ataca otro doble enlace en el mismo residuo del ácido graso (Gaschler & Stockwell, 2017; Halliwell & Gutteridge, 2015).

El radical hidroperoxilo ROOH en presencia de complejos metálicos puede formar más radicales libres, como el OH•. Por otra parte, cuando no hay presencia de compuestos metálicos éstos radicales hidroperóxidos sufren una reestructuración mediante una reacción de ciclación dando lugar a 0 que finalmente forman malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiilnonenal (4-HNA), que son productos tóxicos con el potencial de dañar el DNA y proteínas (Gaschler & Stockwell, 2017; González-Torres et al., 2000; Maiorino et al., 2017; Phaniendra et al., 2015). El MDA es un

producto que se utiliza como indicador de la peroxidación lipídica en diversos ensayos y su presencia en orina indica que forma aductos con proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (Draper & Hadley, 1990).



**Figura 2.** Representación de las reacciones y de iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos de un PUFA con tres dobles enlaces. Tomado de Halliwell & Gutteridge, 2015

### 1.2 Defensa antioxidante

Las especies químicas reactivas están en constante producción en el metabolismo celular normal, pero pueden ser producidos a elevadas tasas bajo condiciones fisiopatológicas, es

debido a esto que se necesitan defensas en contra de la gran variedad de especies reactivas (ER). Como se mencionó anteriormente, la condición oxidante se encuentra regulada por la capacidad de los sistemas antioxidantes de neutralizar dichas especies reactivas, retrasando, previniendo o eliminando el daño oxidativo de la molécula diana, ya que son capaces de interactuar con los radicales libres y las especies reactivas antes de que éstas lleguen a oxidar a otras moléculas (Elejalde Guerra, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2015; Sies, 1997).

La importancia relativa de los antioxidantes depende del tipo de ER que se está generando, el tiempo que dura, el sitio y la manera en que se ha generado. Por lo tanto, no existe un “mejor” antioxidante, ya que éstos van a actuar de diferente manera y con los diferentes tipos de ER a diferentes niveles y tasas, ya que también actúan en distintos sitios y protegen a diferentes moléculas (Halliwell & Gutteridge, 2015).

### **1.2.1 Defensa antioxidante endógena**

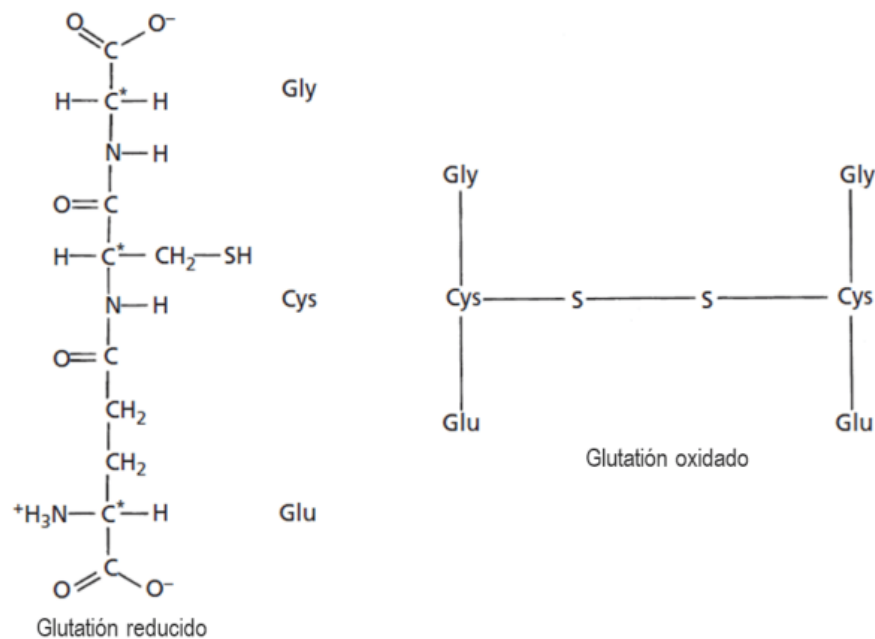
Las defensas antioxidantes endógenas incluyen una red de enzimas antioxidantes y moléculas no enzimáticas que normalmente se encuentran distribuidas dentro del citoplasma y en varios compartimentos endomembranosos (Rahal et al., 2014). Algunas estrategias de defensa antioxidante pueden incluir la remoción catalítica de ER, el control de la formación de ER, agentes protectores de biomoléculas contra el daño oxidativo, “*quenchers*” físicos de ER, “agentes de sacrificio” que reaccionan con las ER y las detienen de oxidar biomoléculas importantes, entre otros (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.2.1.1 Glutación**

El glutación es un tripéptido descubierto en 1888, al que se le dio el nombre de philothion, “amor por el azufre” (Halliwell & Gutteridge, 2015). Se conforma por L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina (Sies, 1999), y se puede encontrar en su forma reducida (GSH) y oxidada (Reed, 1990). Cuando dos moléculas de GSH se unen, los grupos –SH de la cisteína se oxidan para formar un puente disulfuro, dejando un radical GS• (tillo) en el azufre, que puede migrar para dar lugar a radicales centrados en C, ya sea en glutamato, cisteína o glicina de la molécula de GSH (Halliwell & Gutteridge, 2015).

La forma reducida es la que se encuentra en mayor concentración (mM) en las células de mamíferos (Reed, 1990), además es abundante en el citosol (85-90%), mientras que el resto se distribuye en organelos como mitocondria, matriz nuclear y peroxisomas (G. Wu et al., 2004); debido a esto, se considera que GHS/GSSG contribuyen de manera significativa al estado redox celular (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Su forma reducida presenta diferentes funciones, ya que puede actuar como coenzima para distintas reacciones, se conjuga con xenobióticos (fármacos y otros) y con compuestos formados en el metabolismo (prostaglandinas y leucotrienos, por ejemplo) y, por tanto, participa en su metabolismo (Meister & Anderson, 1983), también mantiene la comunicación entre células a través de uniones gap y juega un papel importante en el doblamiento de proteínas, degradación de proteínas que poseen puentes disulfuro (Halliwell & Gutteridge, 2015).



**Figura 3.** Estructura del glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH). \*Carbonos en los cuales puede migrar el electrón desapareado del azufre en GS\*. Tomado de Halliwell & Gutteridge, 2015

GSH puede actuar sobre radicales y especies reactivas ya que actúa directamente como “scavenger” nucleofílico (elimina moléculas electrofílicas) de especies reactivas ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y sus metabolitos ya que convierte sus centros electrofílicos en puentes tioéter (Reed, 1990), y actúa indirectamente a través de reacciones enzimáticas en las cuales es oxidado a GSSG, que es después reducido a GSH con ayuda de la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH (G. Wu et al., 2004). Una reacción muy conocida es cuando forma nitrosotiol a partir de  $\text{ONOO}^-$  (GSNO; (Fang et al., 2002; Halliwell & Gutteridge, 2015), que es transportador de  $\text{NO}^\bullet$  en plasma, o bien, cuando se conjuga con NO para dar lugar a un aducto S-nitroso-glutatión. Se sabe que tanto GSH como NO son importantes en la acción de los agentes sensibilizadores de insulina, sugiriendo que juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos, glucosa y aminoácidos (G. Wu et al., 2004).



También, actúa sobre metabolitos fisiológicos y xenobióticos para formar mecapturatos (Meister, 1988), en reacciones que tienen lugar en el hígado, que se sabe, es el órgano en donde se sintetiza (Reed, 1990) y se encuentra en mayores concentraciones (Halliwell & Gutteridge, 2015; G. Wu et al., 2004).

La presencia de GSH en la mitocondria tiene vital importancia en la regulación de la permeabilidad de la membrana interna al mantener los tioles intramitocondriales en estado reducido (Reed, 1990).

#### **1.2.1.2 Metales de transición**

Cuando los niveles de ciertos metales de transición como hierro, cobre y zinc se mantienen bajos, pueden considerarse como antioxidantes si se mantienen unidos a proteínas (Korc' & Martell, 1995). Tal es el caso del cobre y el zinc, que son necesarios para las enzimas superóxido dismutasa que contienen a estos metales y que son importantes para mantener el estado redox celular.

El hierro se deposita en diferentes órganos, entre ellos el hígado es el principal depósito (Halliwell & Gutteridge, 2015). Existen proteínas antioxidantes importantes en plasma, la ceruloplasmina y albúmina a las cuales se les une el cobre, y, por otro lado, la transferrina, ferritina y lactoferrina que llevan consigo hierro (Loban et al., 1997). Estas proteínas son antioxidantes primarios debido a que evitan que los metales que se encuentran unidos a ellas formen radicales y/o ER, a lo que se le conoce como secuestro de metales de transición (Korc' & Martell, 1995).

#### **1.2.1.3 Enzimas de defensa antioxidante**

Las enzimas de defensa antioxidante se encuentran en todos los organismos eucariotas y se encargan de eliminar catalíticamente a distintas ER. Entre ellas se encuentran superóxido dismutasa, catalasas, glutatión reductasa, peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa, principalmente.

#### **1.2.1.4 Superóxido dismutasa (SOD)**

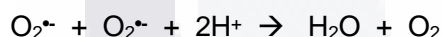
A partir del descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa, por (Mccord & Fridovich, 1969), se obtuvieron las bases para entender que existe una defensa antioxidante contra la toxicidad del oxígeno, y que las especies derivadas de éste son productos biológicos importantes. Las SOD, son un grupo de metaloenzimas (Casaña & Forment, 2014) que se piensa forman parte de las adaptaciones que tuvieron que sufrir los organismos aerobios debido a la oxigenación de la atmósfera de la tierra, producto de la actividad fotosintética de las algas verde-azules

(Fridovich, 1975). Al ser metaloenzimas, poseen distintos metales de transición, además, catalizan la conversión de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Estas enzimas son las únicas que actúan directamente sobre un radical mediante la dismutación del superóxido (Casaña & Forment, 2014).

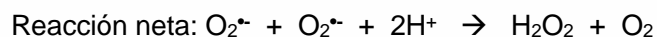
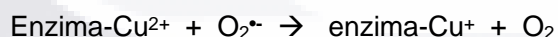
Los tipos de SOD se diferencian por el tipo de metal que poseen, el sitio en donde se encuentran dentro de la célula y el grupo de organismos que las sintetizan. Las enzimas que contienen hierro (FeSOD) y manganeso (MnSOD) son características de procariotas y se encuentran estrechamente relacionadas mientras que las que contienen cobre y zinc (CuZnSOD) son características de eucariotas y parecen haber evolucionado de manera independiente ya que no presenta secuencias homólogas con FeSO y MnSOD. Sin embargo, los eucariotas generalmente contienen tanto CuZnSOD como MnSOD (Fridovich, 1975, 1978; Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### 1.2.1.4.1 CuZnSOD

Esta enzima se encuentra principalmente en citosol principalmente, aunque también se puede encontrar en lisosomas, núcleo, espacio intermembranal de la mitocondria y peroxisomas. Posee 2 subunidades proteicas, una con un ion cobre y la otra con un ion zinc; cada subunidad posee un sitio activo y un puente disulfuro intramolecular. Su principal función es acelerar la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$ :



en esta reacción, los iones de cobre catalizan la dismutación al experimentar oxidación y reducción alternadas:



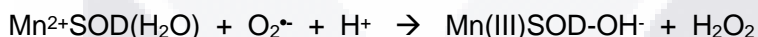
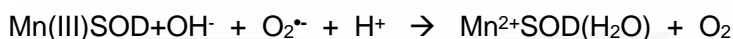
El zinc, no tiene función en el ciclo catalítico, pero ayuda a estabilizar a la enzima (Fridovich, 1975, 1978; Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### 1.2.1.4.2 MnSOD

La MnSOD es una enzima que se encuentra en bacterias, levaduras, plantas y animales, distribuyéndose ampliamente en la mitocondria (animales y levaduras). Las cantidades relativas de MnSOD y CuZnSOD varían dependiendo del tejido y la especie, sin embargo, una variable

obvia entre tejidos es el número de mitocondrias; en el hígado de rata forma aproximadamente el 10% de la actividad total de SOD.

Contiene manganeso en su forma Mn(III) en su sitio activo, cuando la enzima está “en reposo”. En los organismos superiores normalmente posee 4 subunidades proteicas con uno (hígado humano) o la mitad (por ejemplo, dos subunidades comparten un Mn) de Mn por subunidad. A pesar de las diferencias entre MnSOD y CuZnSOD, catalizan la misma reacción. Cuando se encuentra “en reposo”, un OH<sup>-</sup> se une al Mn, siguiendo la siguiente reacción



Los niveles de MnSOD cambian en respuesta a los cambios en la fisiología de la célula (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.2.1.5 Catalasas**

Las catalasas, o más correctamente, hidroperoxidasas (Chelikani et al., 2004), son enzimas que poseen 4 subunidades de las cuales cada una contiene hemo-Fe(III) en su sitio activo y debido a la conformación de su estructura, es específica para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que no permite que otras moléculas tengan acceso a ella. Por lo regular, cada subunidad posee una molécula de NADPH. Son enzimas que se encuentran presentes en todos los órganos, pero se encuentran especialmente concentradas en el hígado y ayudan a proteger a los eritrocitos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la dismutación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de la autooxidación de la hemoglobina.

El mecanismo de acción de esta enzima es mediante la catálisis de la dismutación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde uno es reducido a agua y el otro es oxidado a oxígeno:



La actividad de esta enzima se da en los peroxisomas, que son organelos compuestos por una membrana y que además contienen diversas enzimas que producen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también juegan un papel importante en la degradación de ácidos grasos de cadena larga (Chelikani et al., 2004; Halliwell & Gutteridge, 2015).

### **1.2.1.6 Glutación reductasa**

La enzima glutación reductasa es una flavoproteína debido a que presenta FAD (flavin adenin dinucleótido) en cada uno de sus dos sitios activos (Seefeldt et al., 2009) y cataliza la reducción de GSSG a GSH mediante la transferencia de electrones por parte de NADPH que va a reducir al FAD, lo que va a resultar en la formación de dos grupos –SH que al interactuar con GSSG lo reducen a dos moléculas de GSH (Thieme et al., 1981):



Esta reacción es importante para mantener los niveles de glutación en la célula (Carlberg & Mannervik, 1985). Esta enzima se sintetiza en el citoplasma, y el órgano en donde ejerce mayor actividad es en el hígado (Marí et al., 2013).

### **1.2.1.7 Glutación peroxidasa**

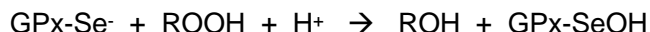
Las enzimas glutación peroxidasa (GPx) son una familia de enzimas presentes en mamíferos que se encuentran estrechamente relacionadas filogenéticamente (Margis et al., 2008). Consisten en tres grupos evolutivos que provienen de un ancestro que contenía el aminoácido cisteína: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 y GPx4/GPx7/GPx8. Las GPx4 son selenoproteínas con selenocisteína en su centro catalítico (Toppo et al., 2008), GPx6 sólo se encuentra en humanos (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

Se sabe que las GPx catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgánicos a agua o sus alcoholes correspondientes, utilizando GSH como donador de electrones (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Halliwell & Gutteridge, 2015; Toppo et al., 2008):



El hígado humano contiene GPx1, GPx2 y GPx4, también llamada fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa (PHGPx) que además de reducir peróxidos orgánicos, también reduce hidroperóxidos de ácidos grasos y colesterol que aún se encuentran esterificados (Halliwell & Gutteridge, 2015).

En estas enzimas, el selenio juega un papel importante, ya que GPx1, GPx2 y GPx3 contienen cuatro subunidades proteicas con un átomo de selenio (Se) en su sitio activo, mientras que GPx4 sólo contiene uno. Al encontrarse como selenocisteína, reemplaza al azufre (R-SeH), y en la reacción que catalizan las GPx, el selenol (GPx-Se<sup>-</sup>) reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar un ácido selénico (GPx-SeOH), dando lugar a la siguiente reacción:





En donde se une el glutatión:



En seguida, el segundo GSH se une:



De esta manera, el selenio es un elemento no metálico que también presenta actividad antioxidante *in vivo* (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.2.1.8 Glutatión S-transferasa**

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en eucariotas, en concentraciones intracelulares relativamente altas. Juegan un papel importante en el metabolismo de xenobióticos, ya que reaccionan con una gran variedad de compuestos farmacológicos, así como intermediarios reactivos que se han formado durante la biotransformación de éstos con GSH. De hecho, el aducto de glutatión se llega a considerar menos tóxico que el mismo compuesto sin conjugar, por lo que su unión con ciertas sustancias reactivas es considerado un mecanismo detoxificante (Moron et al., 1979). Sin embargo, también pueden reaccionar con otros sustratos endógenos (Board, 1981).

En otras palabras, glutatión S-transferasa (GST) cataliza el ataque nucleofílico por GSH sobre compuestos no polares que contienen un átomo electrofílico de carbono, nitrógeno o azufre (Hayes et al., 2005), siguiendo la reacción:



O bien, catalizan la reacción de peróxidos orgánicos con GSH para formar GSSG y alcohol (Aniya & Imaizumi, 2011).

Existen 3 familias principales de estas enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: GST citosólicas y mitocondriales, que son enzimas solubles que están relacionadas de forma distante y que comparten similitudes en el doblamiento tridimensional; y la tercer familia que son GTS microsomales y que son proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo de eicosanoides y glutatión (Hayes et al., 2005).

Estas enzimas se encuentran en altos niveles en el hígado, en donde los aductos generados pueden ser degradados por  $\gamma$ -glutamyltransferasas ( $\gamma$ GGT) para remover glutamato y glicina; al resultar un conjugado de cisteína éste se acetila y se genera un conjugado N-acetilcisteína, también conocido como ácido mercaptúrico (Halliwell & Gutteridge, 2015).

### **1.2.1.9 Peroxirredoxinas**

Las peroxirredoxinas son enzimas clave en el metabolismo del  $H_2O_2$ , producto de SOD y otras enzimas. Son una familia de enzimas que reducen el  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos. No cuentan con grupos prostéticos y sus reacciones sólo involucran residuos de cisteína en sus sitios activos; existen 6 tipos diferentes: prx1, prx2, prx3, prx4, prx5 y prx6. Debido a que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante en la transducción de señales es vital su acumulación transitoria, es por ello que la actividad de estas enzimas debe modularse (Halliwell & Gutteridge, 2015).

### **1.2.1.10 Respuesta antioxidante endógena inducible**

Cuando el estrés oxidativo supera la defensa antioxidante basal, se activa la respuesta antioxidante inducible la cual está mediada por el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). En condiciones de homeostasis celular, Nrf2 se encuentra unido a la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) la cual en su superficie presenta residuos de cisteína sensibles a la oxidación por parte de moléculas electrofílicas u otros oxidantes. Una vez liberado, Nrf2 se trasloca al núcleo en donde se heterodimeriza con proteínas sMaf y se une con los motivos de los genes de respuesta a electrofílicos (EpRE) que codifican para enzimas antioxidantes (*Sod1*, *Cat*), enzimas de detoxicación del grupo hemo (*Hmox1*) y enzimas involucradas en la síntesis de GSH (*Gclc*) (Ghanim et al., 2021; Jaiswal, 2004). Existe evidencia que soporta que los fitoquímicos son capaces de activar la defensa antioxidante celular.

## **1.2.2 Defensa antioxidante exógena**

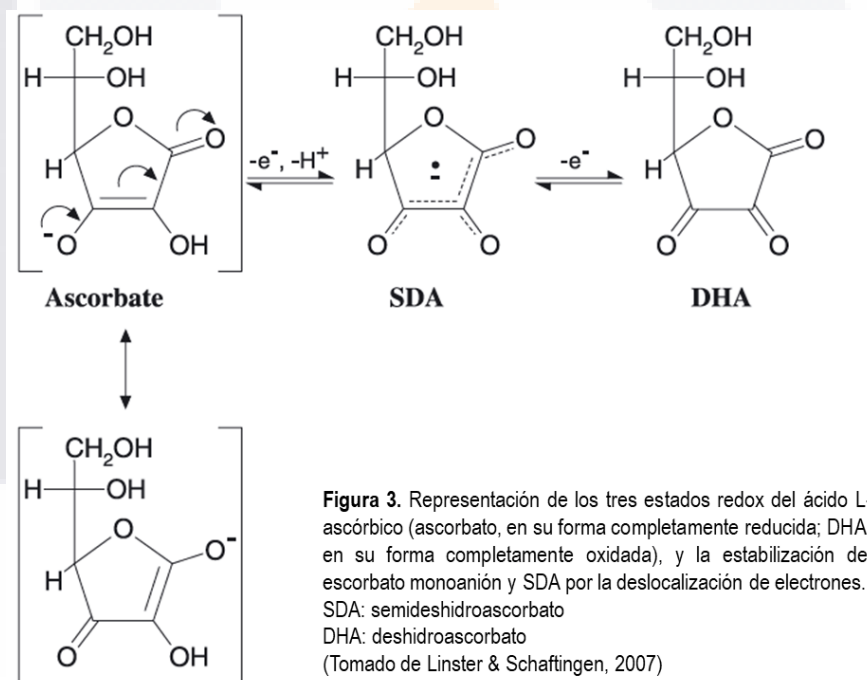
A lo largo de la historia del hombre, siempre ha habido un interés en el bienestar físico. En el año 400a.c., Hipócrates escribió “que tu alimento sea tu medicina y la medicina tu alimento”. Si bien, se tiene el pensamiento de que ciertos tipos de alimentos ayudan en la prevención de enfermedades y padecimientos, como el consumo de frutas y vegetales. Comúnmente estos efectos benéficos se han atribuido a la presencia de antioxidantes en los alimentos, sin embargo, también se debe de conocer que los resultados positivos no se deben a un solo componente, sino a la sinergia de varios compuestos presentes en los alimentos (Halliwell & Gutteridge, 2015).

### **1.2.2.1 Ácido ascórbico**

La vitamina C es una lactona de seis carbonos que es sintetizada a partir de la glucosa en el hígado de muchos mamíferos, sin embargo, primates como el humano y el cerdo de Guinea son incapaces de producirla debido a la ausencia de la enzima gulonolactona oxidasa, que es primordial para la síntesis del precursor intermediario del ácido ascórbico, la 2-cetogulonolactona (Nishikimi & Yagi, 1996; Padayatty et al., 2003). Dadas estas condiciones, es

un micronutriente que se tiene que obtener a través de la ingesta de algunos alimentos ya que es requerido para desarrollar diversas funciones metabólicas que ocurren en el cuerpo (Carr & Frei, 1999). El escorbuto es una de las enfermedades causadas por el déficit de esta vitamina (Linster & Schaftingen, 2007).

Este compuesto es un donador de electrones y, por lo tanto, es un agente reductor, ya que dona dos electrones del doble enlace que posee entre el segundo y el tercer carbono, y que se pierden secuencialmente, formando un radical libre, el ácido semideshidroascórbico (SDA) (Figura 3) o radical ascorbil que es relativamente estable y que puede ser reducido para ser menos reactivo. A la reducción de un radical libre reactivo a través de la formación de un compuesto menos reactivo se le conoce como “scavenging” de radicales o “quenching”. Los radicales formados pueden volverse a reducir a ácido ascórbico mediante al menos tres vías enzimáticas separadas, en humanos sólo ocurre una reducción parcial, aunque no se recupera el ácido ascórbico (Padayatty et al., 2003).



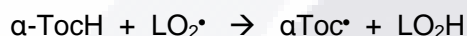
**Figura 4.** Representación de los tres estados redox del ácido L-ascórbico (ascorbato en su forma completamente reducida; DHA, en su forma completamente oxidada), y la estabilización del ascorbato monoanión y SDA por la deslocalización de electrones. SDA: semiascorbato, DH: deshidroascorbato. Tomado de Linster & Schaftingen.

### 1.2.2.2 Vitamina E

Se conoce como vitamina E a una familia de ocho moléculas (“E” por eight, en inglés), que presentan en común un anillo cromanol con una cadena lateral alifática. Considerando si la

cadena lateral es saturada o insaturada, se agrupan en tocoferoles y tocotrienoles, respectivamente. En cada grupo existen cuatro isoformas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ , nombradas así por las sustituciones específicas de grupos metilo en las posiciones 5, 7 y 8 del anillo cromanol (Halliwell & Gutteridge, 2015; Schneider, 2005; Tucker & Townsend, 2005).

Los compuestos de ambos grupos son capaces de inhibir la peroxidación lipídica debido a que son capaces de eliminar los radicales lipídicos peroxil ( $LO_2$ ), que son el primer producto de la peroxidación lipídica (Schneider, 2005), antes de que puedan reaccionar con cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes o con proteínas de membrana (Halliwell & Gutteridge, 2015):



El radical alfa-tocofeoxil ( $\alpha\text{Toc}\cdot$ ) es capaz de reaccionar rápidamente con otros radicales peroxil para dar lugar a productos no radicales:



El  $\alpha$ -tocoferol ha sido definido como interruptor de la cadena de radicales y dada su naturaleza hidrofóbica, lleva a cabo su actividad en ambientes lipídicos. La actividad antioxidante es dada por el grupo hidroxilo en el carbono 6 del anillo cromanol, el cual puede donar su átomo de hidrogeno (Frei, 1994; Schneider, 2005).

Como antioxidante, su actividad se restringe a las membranas y dominios lipoproteicos (Azzi, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2015).

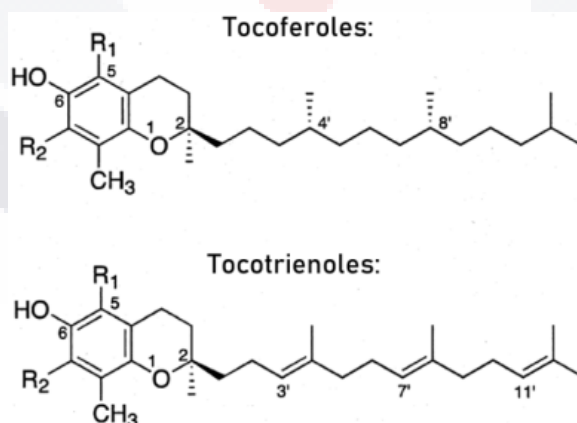
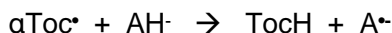


Figura 5. Estructura de tocoferoles y tocotrienoles. Tomado de Schneider, 2005

### 1.2.2.3 Sinergia entre vitaminas C y E

Debido a que la actividad antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol como interruptor de cadenas forma un radical ( $\alpha\text{Toc}\cdot$ ), éste puede volver a convertirse en  $\alpha$ -tocoferol a través de la reducción por ácido

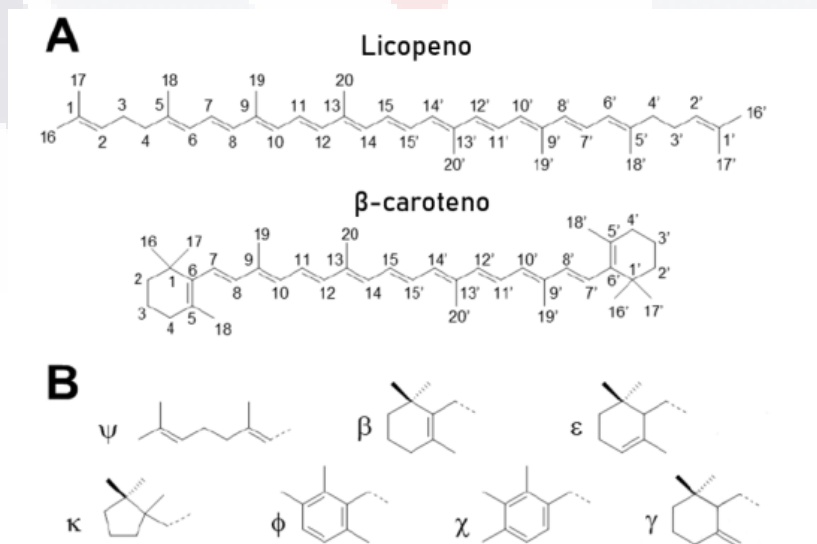
ascórbico (Frei, 1994; Kagan et al., 1992; Tucker & Townsend, 2005), lo que mejora su capacidad antioxidante.



#### 1.2.2.4 Carotenoides

Los carotenoides son metabolitos isoprenodios (pigmentos naturales) que sintetizan las plantas, hongos, algas y bacterias (Rodríguez-Concepcion et al., 2018). Existen más de 650 tipos en la naturaleza, de los cuales más de 100 se incluyen en nuestra dieta (Eggersdorfer & Wyss, 2018; Paiva & Russell, 1999). En humanos se han encontrado en tejido adiposo e hígado, y en altas concentraciones en el cuerpo lúteo del ovario y glándulas adrenales (Halliwell & Gutteridge, 2015). Son los responsables de dar la coloración roja, naranja y amarillo a las hojas, frutos y flores de las plantas, así como a algunas aves, insectos, peces y crustáceos, quienes los incorporan a través de la dieta (Stahl & Sies, 2003).

Muchos carotenoides derivan de una estructura basal de 40 carbonos (Stahl & Sies, 2003). Estos compuestos son isoprenoides con un esqueleto polieno que contiene un sistema de dobles enlaces conjugados, por lo cual son capaces de absorber luz visible resultando en su coloración característica en el rango de amarillo a rojo (Rodríguez-Concepcion et al., 2018), y pueden tener (cíclicos) o no (acíclicos) en su estructura (Figura 6). De acuerdo a su composición, pueden contener sólo carbono e hidrógeno, o bien, sólo oxígeno (Halliwell & Gutteridge, 2015; Paiva & Russell, 1999; Rodríguez-Concepcion et al., 2018; Stahl & Sies, 2003).





**Figura 6.** Estructura general de carotenoides. (A) Carotenoides acíclico (licopeno) y cíclico ( $\beta$ -caroteno). (B) Grupos terminales que pueden existir en carotenoides. Tomado de Rodríguez-Concepción et al., 2018

Estos pigmentos tienen diversos papeles metabólicos ya que, por ejemplo, la vitamina A, también llamada retinol, participa en el crecimiento y diferenciación celular, así como en la visión (Halliwell & Gutteridge, 2015), también bloquean la formación y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Eggersdorfer & Wyss, 2018).

A pesar de que la habilidad de eliminar radicales por parte de los carotenoides *in vivo* parece ser limitada, pueden llevar a cabo mecanismos que benefician al organismo, como regular la comunicación entre células o la expresión de genes (Halliwell & Gutteridge, 2015).

#### **1.2.2.5 Compuestos fenólicos**

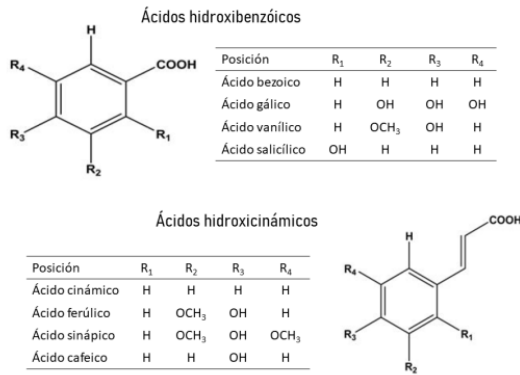
Los fenoles, son compuestos que poseen un grupo  $-OH$  unido a un anillo bencénico. Pueden poseer un anillo aromático con su grupo  $-OH$  unido (monofenol), dos (difenol), o más (de la Rosa et al., 2019; Halliwell & Gutteridge, 2015). Estos compuestos son metabolitos secundarios producidos por las plantas y forman parte integral de la dieta de animales y humanos (Huyut et al., 2017). De acuerdo a la naturaleza del esqueleto carbonado, existe los ácidos fenólicos, flavonoides y menos común estilbenos y lignanos, de los cuales, los flavonoides son los más abundantes y diversos (Karakaya, 2004).

##### **1.2.2.5.1 Ácidos fenólicos**

Poseen un solo grupo fenilo sustituido por un grupo carboxílico y uno o más grupos  $OH$ . Éstos pueden dividirse en ácidos hidrobenczoicos, ácidos hidroxinámicos y otros ácidos hidroxifenilos (como el acético, propanoico y pentaenoico), diferenciándose en la longitud de la cadena que contiene el grupo carboxilo (de la Rosa et al., 2019).

Los ácidos hidroxibenzóicos (esqueleto básico C6-C1) se pueden encontrar en frutas como las bayas, nueces, achicoria y algunas especias. Comúnmente se encuentran glicosilados, unidos a ácidos orgánicos pequeños o unidos a componentes de la célula vegetal, como celulosa, proteínas o lignina (de la Rosa et al., 2019).

Los ácidos hidroxicinámicos (esqueleto básico C6-C3) son fenilpropanoides, de los cuales el más abundante es un éster de los ácidos quínico y cafeico, como ácido clorogénico, que junto con sus isómeros (*neo*-clorogénico y *crypto*-clorogénico) se encuentran en muchos frutos (ciruela, bayas, nectarina, durazno, manzana, pera) y vegetales (de la Rosa et al., 2019; Karakaya, 2004).

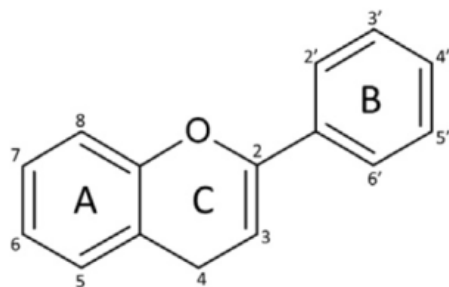


**Figura 7.** Estructura general de los principales ácidos fenólicos. Modificado de Saxena et al., 2012

De manera general, los ácidos fenólicos aportan casi un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta.

#### 1.2.2.5.2 Flavonoides

Estos fitoquímicos representan casi dos tercios de la dieta de compuestos fenólicos, ya que son los más abundantes en frutos y vegetales. Poseen un esqueleto de fenil benzopirano, compuesto por dos anillos fenilo, A y B, unidos mediante un anillo pirano heterocíclico, C (Figura 8)



**Figura 7.** El esqueleto de fenilbenzopirano es la estructura básica de los flavonoides. Tomada de de la Rosa et al., 2019.

**Figura 8.** El esqueleto de fenilbenzopirano es la estructura básica de los flavonoides. Tomado de de la Rosa et al., 2019

Dependiendo de las diferencias que presentan en el anillo pirano, se pueden agrupar en 6 familias, en las cuales cada compuesto difiere en su patrón de hidroxilación y metilación de sus anillos A y B (de la Rosa et al., 2019).

#### 1.2.2.5.3 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

Una condición peculiar de estos compuestos es que *in vitro*, presentan actividad antioxidante ya que a menudo inhiben la peroxidación lipídica y eliminan radicales peroxil que detiene la

reacción de cadena; también, pueden eliminar radicales libres y especies reactivas como OH•, NO•, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ONOOH y HOCl. Los difenoles y polifenoles pueden reaccionar con O<sub>2</sub>•. Aquellos que poseen dos grupos –OH adyacentes, o cualquier otra estructura quelante, pueden unirse a metales de transición (Fe y Cu) y evitar que reaccionen con otras moléculas. Su inclusión en la dieta también representa un beneficio a la salud ya que se sabe que previenen enfermedades relacionadas con la producción exacerbada de moléculas reactivas (Halliwell & Gutteridge, 2015; Saxena et al., 2012).

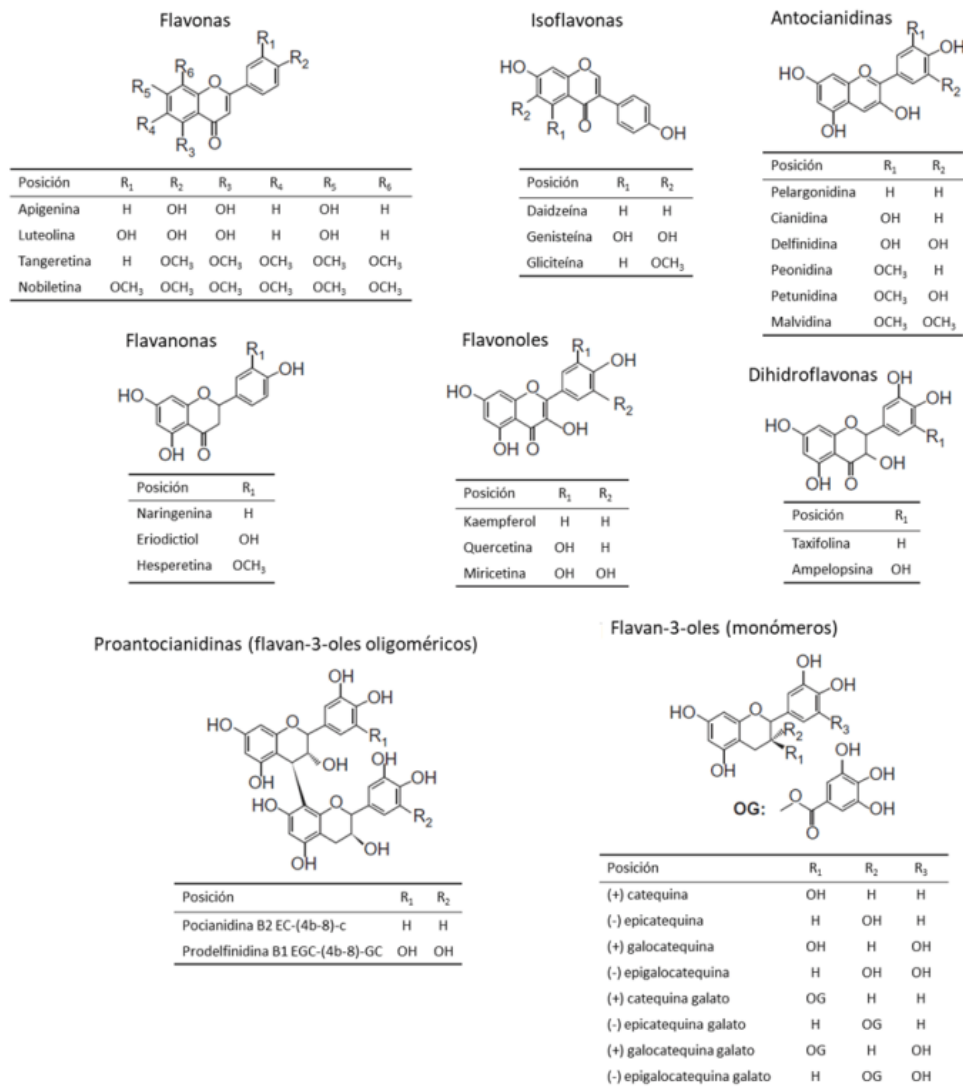


Figura 9. Familias de flavonoides y sus patrones de sustitución. Tomado de de la Rosa et al., 2019

## 1.3 Antiinflamatorios no esteroideos

### 1.3.1 Generalidades

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un conjunto de fármacos que comparten algunas características como el efecto antiinflamatorio, antipirético y analgésico, y que se

introdujeron como tratamiento alternativo al uso de glucocorticoides (de donde viene su nombre) para el alivio de diversos síntomas, sin embargo, presentan algunas diferencias ya que un fármaco en concreto puede mostrar mayor efecto en alguna de las tres características que comparten (Feria, 1998).

El mecanismo de acción de los AINEs es mediante la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas y en algunos casos tromboxanos, ya que evitan que el ácido araquidónico (sustrato) se una al sitio activo de la enzima ciclooxigenasa (COX). La COX convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos inestables que eventualmente se transformarán en prostaglandinas y tromboxanos. Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, la COX-1 y la COX-2, la primera cataliza la síntesis de prostaglandinas que se encuentran asociadas con diversas funciones fisiológicas como el mantenimiento de la función renal, la producción normal de la mucosa del tracto gastrointestinal y la acumulación de tromboxanos A<sub>2</sub> en las plaquetas; por otro lado, la COX-2 se encuentra asociada con la respuesta inflamatoria, dolor y fiebre y su expresión se encuentra mediada por citocinas. Además, la mayoría de los AINEs inhiben de forma no selectiva la actividad enzimática de la COX (Conaghan, 2012).

La clasificación de los AINEs varía dependiendo del criterio a considerar, como la selectividad a cualquiera de las isoformas de la enzima COX, así como las propiedades químicas y farmacológicas. En general, tienen similitudes químicas en cuanto a que son ácidos débiles relativamente liposolubles (Conaghan, 2012). De acuerdo con este criterio se pueden clasificar de la siguiente manera:

Salicilatos: el ácido salicílico, 2-hidroxibenzoico es el núcleo en común en estos fármacos, entre los que se encuentran el ácido acetilsalicílico (aspirina), salicilato sódico, diflunisal, salicilamida, entre otros.

Paraminofenoles: son derivados de la anilina como el acetaminofen y la fenazopiridina.

Derivados pirazólicos: fármacos antiguos utilizados como analgésicos, destacan el metamizol (dipirona), propifenazona y fenilbutazona.

Derivados del ácido propiónico: derivados del ácido fenilpropiónico que a pesar de tener estructuras químicas diferentes, poseen características farmacológicas muy similares, algunos ejemplos son el ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, oxaprozina, entre otros.

Derivados del ácido acético: este grupo de fármacos poseen sistemas cíclicos como anillos indólicos, pirrólicos, fenilos o piranoindólicos con moléculas de ácido acético. Como ejemplos

de derivados indolacéticos se encuentran la indometazina, acemetazina, oxametazina, entre otros; derivados pirrolacéticos están el ketorolaco, sulindaco y tolmetina; derivados fenilacético se encuentran el diclofenaco, aceclofenaco y fentiazaco; por último derivados piranoidolacéticos como el etodoloco (Feria, 1998).

### **1.3.2 Estudios epidemiológicos**

Debido las acciones farmacológicas que poseen los AINEs y a su libre venta, su uso indiscriminado ha ido en aumento, además de que se encuentran entre los fármacos más prescritos a nivel mundial, sin embargo, se han reportado un gran número de casos en donde se relaciona su uso con el desarrollo de reacciones adversas, entre las que destacan la formación de úlceras gástricas, enfermedades cardiovasculares y daño hepático (Conaghan, 2012; Patrono & Baigent, 2017; Schüssel & Schulz, 2006; Tejada Cifuentes, 2010; Tenenbaum, 1999).

A principios de los noventa, se estimaban 67 millones de prescripciones tan sólo en Estados Unidos, de las cuales la mayoría pertenecía a personas de la tercera edad (>65 años). Para 2016 se consideraban cifras que superaban los 30 millones de prescripciones diarias y más de 111 millones cada año (Wong y Chang, 2016; (Patrono & Baigent, 2017). Por otra parte, de acuerdo con estas estadísticas, se han realizado estudios en los cuales se utilizan datos de la “Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición” (NHANES) en donde se describe la prevalencia del uso regular de AINEs y sus cambios a través de diferentes periodos en la población estadounidense. Los periodos que se evaluaron en dicho estudio pertenecen a la NHANES III (1988-1994) y ciclos continuos de la NHANES (1999-2000, 2001-2002 y 2003-2004), en estos resultados se observó una diferencia demográfica en la cual la mayoría de la población que consume AINEs pertenece a personas americanas no hispanas (NHANES III 76.2%, NHANES 71.8%), además de que personas mayores de 60 años eran los consumidores más frecuentes; otro parámetro que evaluaron fue la posición socioeconómica, ya que personas con bajos recursos eran consumidores más frecuentes que aquellos saludables (Davis et al., 2017).

Por otra parte, en Europa las prescripciones de AINEs representan el 7.7% del total. En Inglaterra en 1998 se estimaron 513 millones de prescripciones de las cuales los analgésicos representaban un 8% (41.5 millones). El consumo de AINEs en distintos países europeos es variable, siendo Italia el país con mayor consumo de estos fármacos (Jones, 2001), sin embargo estos datos son antiguos, además de que siempre es recomendable sobreestimar las cifras debido a que las ventas superan el número de prescripciones.



En México, existen al menos 300 registros de medicamentos que contienen paracetamol, además de que en estudios sobre automedicación se estimó que 68% de los fármacos que se consumían pertenecía a AINEs. A partir de estos datos se desarrolló un estudio en el cual se analizaron las reacciones adversas en el periodo de 2011-2014 con datos obtenidos del Centro Nacional de Farmacovigilancia. Los resultados obtenidos demostraron 4553 reacciones adversas asociadas con la administración de AINEs (3.9%) en la población mexicana para este periodo, siendo el género femenino el que presenta mayor porcentaje de reacciones 66% (3002 reacciones), mientras que los varones representan un 34.4% (1521 reacciones), además, en cuanto a edad, las personas más susceptibles se encuentran entre los 45 y 65 años (Ríos-Quintana & Estrada-Hernández, 2018).

## **1.4 Hígado**

### **1.4.1 Estructura general**

El hígado es considerado como la glándula más grande, representando un 25% del peso corporal y con un peso de 1.500 kg. En el humano se ubica en el hipocondrio derecho de la región abdominal, se extiende en pequeña porción por el hipocondrio izquierdo y se encuentra revestido por una capa de tejido conjuntivo conocida como cápsula de Glisson y por el peritoneo visceral que es una cubierta serosa que rodea a la cápsula de Glisson a excepción de de la porción en la que la glándula se adhiere al diafragma y otros órganos (Ross y Pawlina, 2012).

La irrigación del hígado se conforma a partir de 2 suministros de sangre distintos, la vena porta y la arteria hepática son los dos sistemas vasculares que proveen de sangre al hígado. La vena porta provee alrededor del 70% de la sangre que irrigó primero a los intestinos, páncreas y el bazo, y del 40% de oxígeno, mientras que la arteria hepática provee del 30% del flujo sanguíneo y del 60% del oxígeno (Malarkey et al., 2005).

En cuanto a la organización estructural del hígado, el parénquima se encuentra conformado por trabéculas o cordones de hepatocitos bien organizados de una capa de grosor (Elias, 1949), el estroma de tejido conjuntivo que se continúa con la cápsula de Glisson, los sinusoides que son los vasos que se encuentran entre las trabéculas de hepatocitos, y los espacios de Disse que se encuentran entre en endotelio sinusoidal y los hepatocitos (Ross y Pawlina, 2012).

Los sinusoides hepáticos desembocan en la vénula centrolobulillar y pueden contener 4 tipos diferentes de células: células endoteliales, células de Kupffer, células estrelladas hepáticas (células de Ito) y los hepatocitos. También se encuentran cubiertos de un delgado sinusoidal discontinuo que posee una lámina basal de igual manera discontinua. Las células endoteliales tienen fenestraciones y existen espacios amplios entre las células contiguas, además filtran

fluidos, haciendo un intercambio entre los sinusoides y el espacio de Disse. Las células de Kupffer se acumulan en las áreas periportales y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y se pueden encontrar a travessando la luz sinusoidal; los lipopolisacáridos y el interferón y son activadores potenciales de las células de Kupffer, resultando en una secreción de radicales de oxígeno, factores de necrosis tumoral, interleucina 1 y 6, y una variedad de eicosanoides, lo que puede provocar necrosis del hígado. Las células de Ito se encuentran en el espacio de Disse y son el principal almacén de vitamina A en forma de ésteres retinílicos dentro de inclusiones lipídicas citoplasmáticas, además juegan un papel importante en la formación de la matriz extracelular. Los hepatocitos forman las trabéculas celulares anastomosadas, son células poliédricas grandes de entre 20  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$  en cada dimensión y forman aproximadamente el 80% de la población celular del hígado, muchos son binucleados y tienen un tiempo de vida de unos 5 meses (Bruni & Porter, 1965; E Wisse et al., 1985; Eddie Wisse et al., 1996).

Las células del hígado se encuentran organizadas alrededor de una unidad estructural y funcional conocida como lobulillo hepático, que consiste en pilas de las trabéculas de hepatocitos organizados en una forma típicamente hexagonal alrededor de la vénula centrolobulillar, en la cual desembocan los sinusoides. En los vértices de estos hexágonos se encuentran las triadas portales que están conformadas por ramas de distribución de la vena porta, ramas de la arteria hepática y por ramas de drenaje de la vía biliar, sin embargo el número puede variar en un promedio de 1 a 2 arterias, 1 vena porta y 1 a 2 conductos biliares, además de conductos linfáticos y nervios en una matriz de tejido conectivo compuesta principalmente por colágena tipo I, también conocido como espacio portal o espacio de Kiernan. El espacio portal se encuentra limitado por los hepatocitos que se están en la periferia del lobulillo. Por último, el espacio de Mall, o espacio periportal, se encuentra en los bordes del espacio portal, entre el estroma del tejido conjuntivo y los hepatocitos, y se piensa que es uno de los sitios en donde se origina la linfa en el hígado (Malarkey et al., 2005; Trefts et al., 2017).

En 1954, Rappaport propone al acino hepático como la unidad funcional del hígado, basándose en las zonas o hepatocitos entre las vénulas centrolobulillares, además, esta unidad permite la explicación de lesiones como necrosis, así como la función excretora exócrina del hígado, presenta una forma romboidal y un eje menor, que está constituido por las ramas terminales de la triada portal que siguen el límite entre dos lobulillos clásicos, y el eje mayor que es considerado como la línea perpendicular entre las dos vénulas centrolobulillares que se encuentran más cerca al eje menor (Malarkey et al., 2005). Las células hepáticas de cada acino se encuentran distribuidas en tres zonas: a) la zona 1 se encuentra en la periferia de los lobulillos

clásicos; b) la zona 2 se encuentra en las zonas 1 y 2 y sus límites son poco visibles; c) la zona 3 que se encuentra cerca a la vénula centrolobulillar de un lobulillo clásico y comienza en el espacio portal. De esta manera, se puede explicar la microcirculación dentro del hígado, ya que los hepatocitos de la zona 3 son los últimos en recibir la sangre proveniente de los sinusoides, por lo que el oxígeno que llega a esta zona se encuentra en bajas concentraciones. Como consecuencia, el gradiente de oxígeno entre las tres zonas varía, además de la actividad metabólica y la expresión de las enzimas hepáticas (Rappaport, 1958).

#### **1.4.2 Importancia fisiológica y metabólica del hígado**

El hígado puede ser considerado como una glándula secretora debido a que produce y secreta la mayoría de las proteínas plasmáticas, además, también produce la bilis que contiene sales biliares que son necesarias para la emulsificación de las grasas provenientes de la dieta para que puedan ser absorbidas y digeridas (Trefts et al., 2017).

Metabólicamente, se encuentra implicado en distintas vías del cuerpo, además de que juega un papel importante en la síntesis de moléculas que mantienen la homeostasis y regulan el balance energético. En el metabolismo de carbohidratos almacena, sintetiza, metaboliza y libera glucosa, acciones que se llevan a cabo gracias a que en los hepatocitos se encuentran distintas enzimas que regulan los niveles de glucosa en la sangre. El metabolismo de lípidos se encuentra regulado principalmente por el hígado debido a que en él se lleva a cabo la captación, síntesis, empaquetamiento y secreción de lípidos, lipoproteínas y colesterol; el exceso de carbohidratos se puede convertir en ácidos grasos y triglicéridos en el hígado, los cuales son transportados a los adipocitos. En cuanto al metabolismo de proteínas, el hígado produce proteínas plasmáticas como albúminas que intervienen en la regulación del volumen plasmático y de los tejidos; glucoproteínas como la haptoglobina, transferrina y hemopexina; protrombinas y fibrinógeno que participan en la cascada de coagulación sanguínea; y globulinas  $\alpha$  y  $\beta$  que sirven como transportadoras de distintas sustancias (Trefts et al., 2017).

Por otra parte, otra de las principales funciones del hígado es en el metabolismo de los fármacos, debido a que muchos xenobióticos no son hidrosolubles tienen que ser transformados a sustancias con mayor solubilidad para poder ser eliminados del cuerpo mediante un proceso de dos fases llevadas a cabo en los hepatocitos, la fase I y la fase II, y que son mediadas principalmente por un grupo de enzimas conocidas como citocromo P-450 (CYP450), conformado principalmente por oxidasas, reductasas e hidrolasas y que se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico liso y en la membrana interna de la mitocondria (Almazroo et al., 2017).

En la fase I se llevan a cabo reacciones de óxido-reducción e hidrólisis, con lo que se obtiene la formación de nuevos grupos funcionales y mayor polaridad de la molécula, dando lugar a la inactivación, conversión de un producto inactivo a uno activo o a la conversión de un producto activo a otro activo pero tóxico. En la fase II los metabolitos de la fase I son enzimáticamente conjugados con sustratos endógenos, como el ácido glucurónico, sulfato, glutatión (GSH), aminoácidos y donadores de Acetil-CoA y S-adenosinmetionina (grupos metilo y acetilo), mientras que las reacciones son catalizadas por transferasas de glucuronilo (T-Glu), transferasas de Glutatión (T-GSH), transferasas de sulfato (T-Sul) y transferasas de metilo (T-Met), entre otras. Por lo tanto, en la fase I se adicionan grupos -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, con lo que eventualmente se permitirá que se lleven a cabo las reacciones de la fase II, obteniendo como resultado compuestos polares e hidrosolubles que pueden ser fácilmente excretados por la orina y la bilis (Almazroo et al., 2017; James R Gillette, 1963).

## **1.5 Nutracéutica**

Los “alimentos funcionales” son aquellos productos alimenticios ingeridos en la dieta diaria que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos que modulan funciones terapéuticas en el cuerpo y que aportan un beneficio para la salud (Serrano et al., 2006), por lo que contribuyen en la prevención y tratamiento de enfermedades (Leonard, 2006). El término fue propuesto por primera vez en Japón en los 80's con la publicación de la reglamentación para los “Alimentos para uso específico de salud” (FOSU-Foods for specified health use; (Alvírez-Morales *et al.*, 2002)

Por otra parte, el término “nutracéutica” acuñado por Stephen DeFelice en 1989, a partir de las palabras “nutrición” y “farmacéutica”, se define como “un alimento, o parte de un alimento, que proporciona beneficios médicos o de salud, así como la prevención o tratamiento de enfermedades” (Kalra, 2003). Con base en esto surge la idea de optimizar estos beneficios mediante el desarrollo de píldoras, polvos y otras presentaciones para ser lanzados en el mercado (Birujete *et al.*, 2009). El término nutracéutica se aplica para productos aislados de alimentos que son comercializados como medicamentos no asociados con alimentos (Nasri et al., 2014).

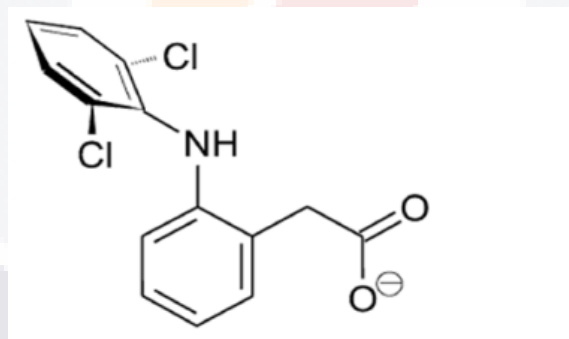
Se ha descrito que los compuestos nutracéuticos de procedencia herbal poseen el potencial de combatir los efectos tóxicos de toxinas y metabolitos tóxicos de una gran variedad de fármacos gracias a su capacidad antioxidante (Nasri et al., 2014). Los antioxidantes de origen vegetal más estudiados son la vitamina C, vitamina E, carotenoides, fitoestrógenos, flavonoides, fenoles, polifenoles, entre otros (Rafieian-Kopaei et al., 2013).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Diclofenaco

El ácido 2-[2,-(2,6-dicloroanilino) fenil] acético (Figura 10) (IUPAC) es un compuesto lipofílico y débilmente ácido que presenta dos anillos aromáticos con un giro; presenta 2 componentes estructurales: 1) el derivado del ácido fenilacético que a su vez posee un ácido carboxílico (sustrato para la formación de metabolitos derivados del ácido glucurónico), y 2) posee un esqueleto de fenilamina, en donde la amina secundaria contribuye a su actividad desacoplante en la mitocondria y que también se ve implicada en el estrés oxidativo (Boelsterli, 2003a; Stierlin et al., 1979).

Se lanzó al mercado por primera vez en Japón en 1974 y actualmente se encuentra disponible en diversos países del mundo (Skoutakis et al., 1988) en distintas presentaciones, como oral, intravenosa, supositorio, parche transdérmico y gel (Gan, 2010). Es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de libre venta con potenciales efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos (Lill et al., 2000) y que se prescribe para el tratamiento de artritis reumatoides, osteoartritis, artritis gotosa aguda, espondilitis anquilosante, dolor muscular agudo, dolor postoperatorio, dismenorrea y en diversas afecciones oculares (Davies & Anderson, 1997; Small, 1989).



**Figura 10.** Estructura del diclofenaco. Tomado de Boelsterli, 2003

El principal mecanismo de acción del diclofenaco es mediante la inhibición de la enzima prostaglandina endoperoxidasa sintasa (también conocida como COX; (Davies & Anderson, 1997; Tang, 2003a), ya que compite con el ácido araquidónico por la unión a la COX, resultando en la disminución de la síntesis de prostaglandinas, principalmente la prostaglandina E (Gan, 2010), sin embargo es mayormente selectivo a la isoforma COX-2 (Kh et al., 2013).



## **2.1.1 Farmacocinética del diclofenaco**

### **2.1.1.1 Absorción**

La absorción del diclofenaco varía en función a la dosis administrada, dentro del rango de 25 a 150 mg, y se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. En dosis de 50 mg se ha observado una biodisponibilidad casi completa ( $90\pm 11.6\%$ ), y aproximadamente el 60% del fármaco ingerido pasa por la circulación de forma intacta (Davies & Anderson, 1997; Skoutakis et al., 1988). Las concentraciones detectables en plasma se registran dentro de 0.5-2 horas después de la ingesta en individuos en ayuno, y la concentración máxima ocurre entre las 1.5-2.5 horas (Kh et al., 2013; Small, 1989). La ingesta de tabletas de 25, 50, 100 y 150 mg producen concentraciones máximas de 500, 900, 1500 y 2500 ng/ml respectivamente (Skoutakis et al., 1988). La velocidad de absorción y biodisponibilidad se ven afectadas cuando se toma el fármaco con los alimentos (Davies & Anderson, 1997; Skoutakis et al., 1988).

### **2.1.1.2 Distribución**

La unión a tejidos es menor que la unión a proteínas plasmáticas, ya que tiene una gran afinidad a la albúmina sérica ( $>99.7\%$ ). La membrana del líquido sinovial es el principal sitio de acción del diclofenaco, por lo que se ha indicado que después de la administración del fármaco, se presenta la concentración máxima entre las 2-4 horas después de la concentración máxima del fármaco en plasma, además de que las concentraciones en líquido sinovial son 3 veces mayores a las del plasma (Davies & Anderson, 1997; Kh et al., 2013; Skoutakis et al., 1988; Small, 1989). Se puede considerar que las bajas concentraciones de albúmina sérica son el causante de las altas concentraciones en el líquido sinovial (Davies & Anderson, 1997).

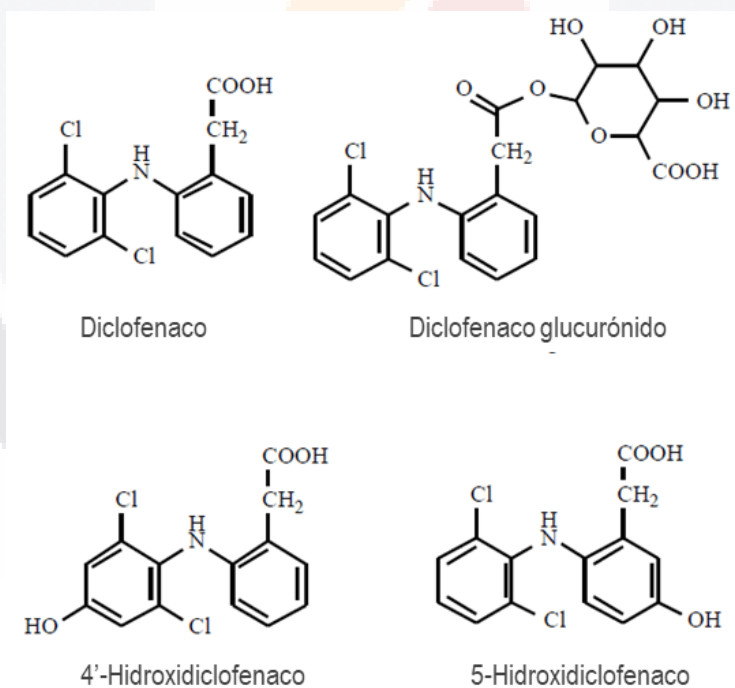
### **2.1.1.3 Biotransformación**

El diclofenaco es metabolizado en el hígado, en donde sufre una serie de hidroxilaciones aromáticas de la fase I por el citocromo P450 y conjugaciones de la fase II con ácido glucurónico y el aminoácido taurina (Bort et al., 1999; Davies & Anderson, 1997).

En la fase I, el principal metabolito en humanos es el 4'-hidroxiclofenaco (Figura 11) que es abundante en el hígado (Boelsterli, 2003a; Bort et al., 1999; Davies & Anderson, 1997; Stierlin et al., 1979; Tang, 2003a) y de naturaleza catiónica y cuyos sustratos son aniónicos, por lo que se facilita la unión y orientación del complejo enzima-sustrato; las reacciones oxidativas se dan en los compuestos fenólicos que poseen grupos hidroxilo en el anillo de ácido fenilacético, o en el anillo diclorofenilo (3' o 4'), o en ambos simultáneamente (Bort et al., 1999; Stierlin et al., 1979; Tang, 2003a). También se han encontrado en orina otros 3 metabolitos: 5'-

hidroxiciclofenaco (reacción catalizada por CYP3A4), 3'-hidroxiciclofenaco y 4',5-dihidroxiciclofenaco, todos presentan efectos analgésicos a dosis muy altas (Bort et al., 1999; Davies & Anderson, 1997; Stierlin et al., 1979; Tang, 2003a).

En la fase II (Figura 11), las conjugaciones se llevan a cabo en el grupo carboxilo del diclofenaco, con el ácido glucurónico y el aminoácido taurina como ligandos, además de la conjugación con ácido sulfúrico en compuestos a los que se les ha introducido un grupo hidroxilo, especialmente en la posición 4' del anillo diclorofenil (Stierlin et al., 1979). Los principales productos de esta fase son el diclofenaco glucurónico, hidroxidiclofenaco y diclofenaco-sulfato (Sarkar et al., 2017), aunque también se han aislado otros metabolitos como diclofenaco taurino conjugado, 4'-hidroxiciclofenaco sulfato, 5-hidroxiciclofenaco y 1-O-β-acyl glucurónico (Sarkar et al., 2017; Stierlin et al., 1979). Las reacciones de glucuronidación del diclofenaco son catalizadas por isozimas de la uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UGT), específicamente la uridina 5'-difosfoglucuronosil transferasa (Boelsterli, 2003a). Por otra parte, el diclofenaco puede sufrir conjugación directamente, para formar un acyl-β-D-glucurónico, reacción catalizada principalmente por la isoforma UGT2B7 (King et al., 2001; Kumar et al., 2002).



**Figura 11.** Principales metabolitos de la biotransformación del diclofenaco. Tomado de Tang, 2003

#### 2.1.1.4 Eliminación

Entre el 60 y 70% del diclofenaco es excretado por la orina en forma de conjugados, y un 90% de aclaramiento entre 3 y 4 horas. El 30% del fármaco también puede ser eliminado por heces

(Davies & Anderson, 1997). Otros estudios realizados en fluidos de rata determinaron que de una dosis de 5 mg/kg se excreta por la orina un 40% de 4'-hidroxiclofenaco sulfato, y por la bilis un 80% de diclofenaco ester glucurónico, mientras que en humano para una dosis de 150 mg/kg se excreta un 60% de conjugados de 4'-hidroxiclofenaco (Stierlin et al., 1979).

#### **2.1.1.5 Mecanismos de daño celular**

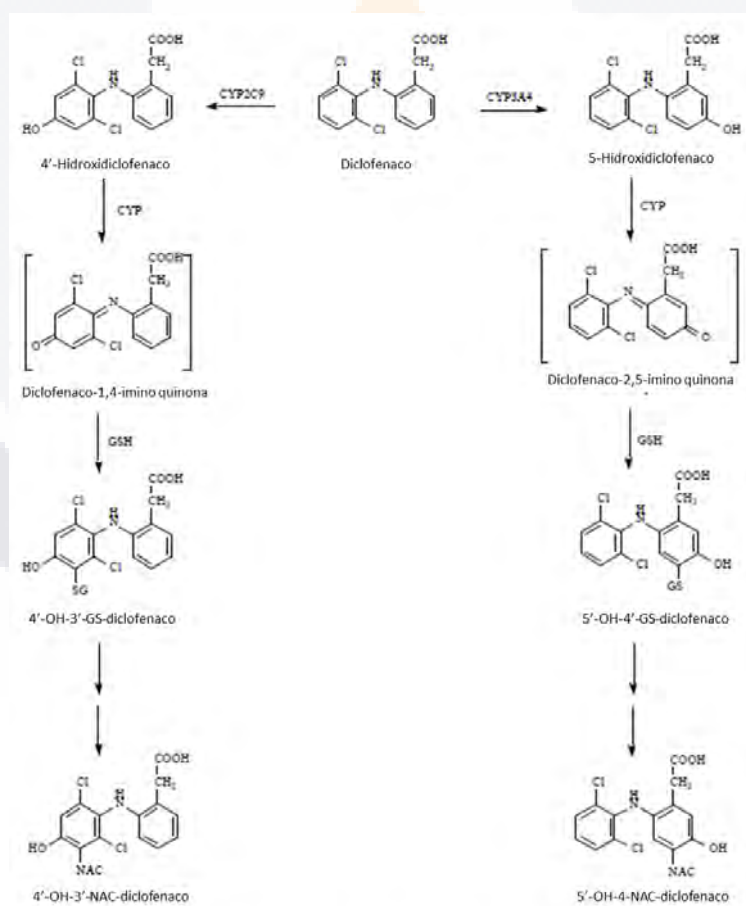
Se sabe que bajo condiciones de exposición prolongada (exposición crónica) al fármaco o a dosis altas (exposición aguda), el diclofenaco puede causar daño celular. Los mecanismos de daño celular son variables, uno de ellos se da mediante la continua oxidación de los metabolitos 4'-hidroxiclofenaco y 5-hidroxiclofenaco (catalizado por la CYP3A4), por lo que son considerados como prooxidantes potenciales debido a que al oxidarse más se pueden convertir en imino quinonas (Figura 12), que son electrófilos que al presentar reactividad tiol, pueden unirse covalentemente a grupos sulfhidrilo protéicos y no protéicos y que se encuentran implicados en el ciclo de óxido-reducción y en la producción de estrés oxidativo. Uno de estos productos es la formación de aductos *S*-glutathionil, que pueden ser degradados y *N*-acetilados, dando lugar a 4'-hidroxi-3'-*N*-acetilcisteína diclofenaco y 5-hidroxi-4-*N*-acetilcisteína diclofenaco, que son intermediarios tiol potencialmente reactivos (Boelsterli, 2003a; Syed et al., 2016a; Tang, 2003a).

Los metabolitos de la fase II también se encuentran involucrados en el daño hepático, como el diclofenaco 1-*O*-acil glucurónico y el diclofenaco glutathion tioéster. El primero es un intermediario con potencial reactividad a proteínas debido a la presencia de un enlace tioéster débil, en comparación con los glucurónidos fenólicos o grupos éter que son más estables. Existen dos mecanismos principales en la formación de aductos mediante enlaces covalentes entre estos compuestos acil glucurónidos y residuos de aminoácidos, y por los cuales el diclofenaco puede unirse a proteínas hepáticas:

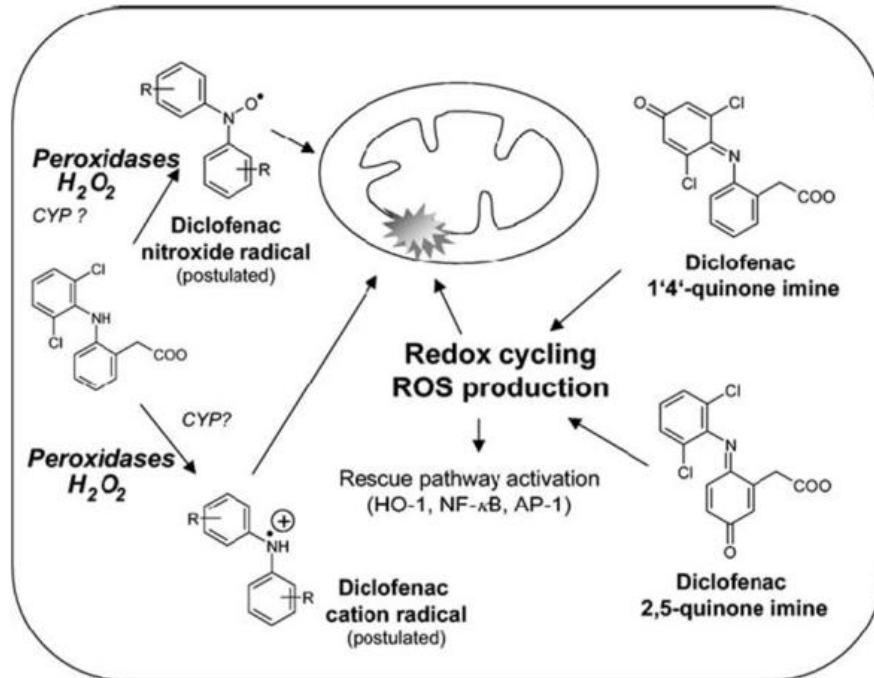
- 1) Mediante un ataque nucleofílico en el carbono carboxilo del diclofenaco por grupos sulfhidrilo, amino o hidroxilo
- 2) El segundo involucra un reordenamiento espontáneo del glucurónico debido a la migración de la aglicona a lo largo de los grupos hidroxilo del anillo de azúcar para formar 2-*O*- $\beta$ -glucurónico, 3-*O*- $\beta$ -glucurónico o 4-*O*- $\beta$ -glucurónico. El anillo del ácido glucurónico de estos compuestos *iso*-glucurónidos (pero no en el acil glucurónico) se puede abrir, de tal manera que queda expuesto un grupo ceto reactivo, que puede ser fácilmente atacado por un grupo amino nucleofílico (Boelsterli, 2003a; Syed et al., 2016a).

Otro metabolito involucrado en la hepatotoxicidad es el producto generado a partir de la reacción entre el diclofenaco 1-O-acil glucurónido y el GSH, el diclofenaco glutatión tioéster, que a pesar de encontrarse en pequeñas cantidades, su reactividad es mayor que la del diclofenaco 1-O-acil glucurónido (Grillo et al., 2003).

El estrés oxidativo inducido por fármacos de manera prolongada puede provocar lesiones mitocondriales, apoptosis y/o necrosis. Se ha sugerido que el mecanismo se da mediante la producción de radicales catalizada por la peroxidasa, que a su vez puede oxidar GSH y NADPH, y que durante la cooxidación de estas moléculas el O<sub>2</sub> puede reducirse y darse lugar a la formación de radicales libres que entrarían al ciclo óxido-reducción. En otras palabras, la oxidación del diclofenaco catalizada por peroxidasa puede dar lugar a un radical nitróxido o a un radical catión. Por otra parte el derivado de 4'-hidroxiclofenaco, el diclofenaco 1'4'-iminoquinona, y el derivado de 5-hidroxiclofenaco, el diclofenaco 2,5- iminoquinona, pueden resultar en el ciclo redox y estrés oxidativo (Boelsterli, 2003a).



**Figura 12.** Mecanismos propuestos para la bioactivación del DF, catalizada por CYP y dando lugar a la formación de imino benzoquinonas. Tomado de Tang, 2003



**Figura 13.** Estrés oxidativo inducido por DF y daño mitocondrial en hepatocitos. Tomado de Boelsterli, 2003

Por otra parte, se sabe que, al haber altas concentraciones de diclofenaco, puede haber un agotamiento en la producción de energía en la mitocondria, seguido de daño celular. Esto se encuentra relacionado con la disminución del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) que es un gradiente electroquímico de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal; estos protones se encargan de controlar la ATP sintasa, por lo que al colapsar el  $\Delta\psi_m$ , la síntesis de ATP se ve comprometida. El diclofenaco puede contribuir a este efecto mediante 2 mecanismos:

- 1) Desacoplamiento de la respiración por la transposición de protones: el diclofenaco, al ser una molécula lipofílica es capaz de translocar protones a través de la membrana interna mitocondrial. Al ser un anión y debido a que el medio en el que se encuentra es ácido, éste tiende a protonarse y resultar en una molécula sin carga que puede atravesar la membrana interna y llegar a la matriz que al ser un sitio alcalino, el diclofenaco se desprotona de nuevo y donde se comienza un ciclo de protones, lo que da como resultado la disipación del gradiente de protones. En este momento el transporte de electrones de la cadena transportadora es estimulado y aumenta el consumo de oxígeno, pero los protones, al reingresar a la matriz a través del diclofenaco en lugar de señalizar a la ATP sintasa, provocan que la respiración se desacople de la fosforilación



oxidativa, dando como resultado un agotamiento en el contenido de ATP celular. Es por esto que se considera al diclofenaco como un poderoso agente desacoplante.

- 2) Apertura del poro de transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT): este poro es un megacanal conformado por numerosas proteínas y que abarca tanto membrana externa como membrana interna. Por lo regular está cerrado, pero al aumentar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , se da lugar a estrés oxidativo y se puede abrir el canal, lo que conlleva a un efecto doble: los protones pueden ingresar rápidamente a la matriz y disminuir por completo el potencial de membrana, además de que se pueden liberar moléculas proapoptóticas como citocromo c que al ser liberado al citosol puede activar a la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3, dando lugar a las últimas fases de apoptosis. Si la gran mayoría de mitocondrias en un hepatocito son afectadas, la producción de energía colapsa y la célula puede sufrir muerte celular necrótica, pero si el daño mitocondrial se produce sólo en una porción de mitocondrias, puede seguir la síntesis de ATP, pero las caspasas que fueron activadas pueden desencadenar apoptosis (Boelsterli, 2003a).

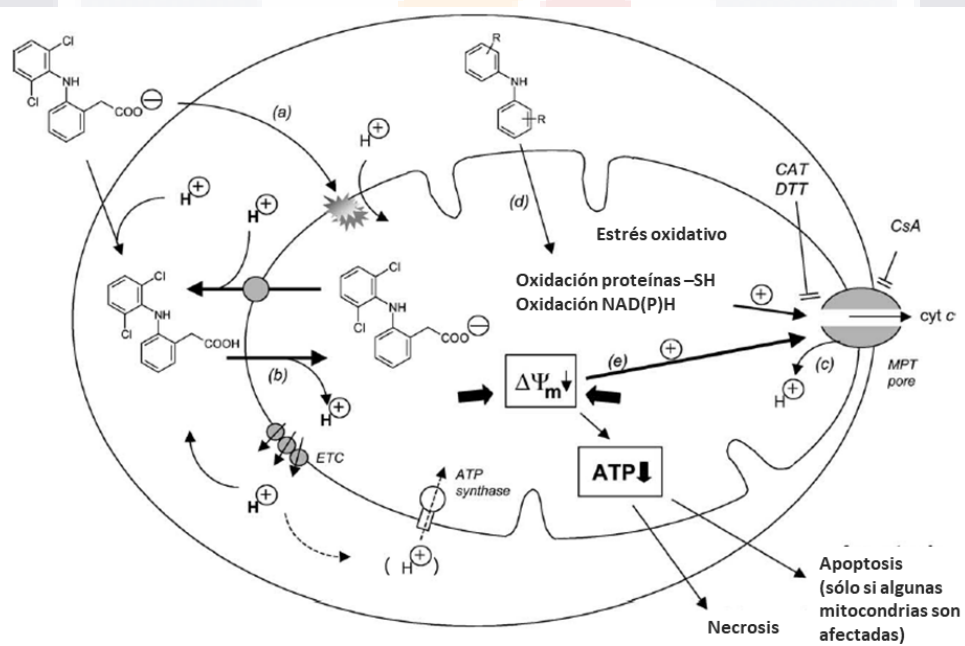


Figura 14. Mecanismos de daño mitocondrial provocado por DF. Tomado de Boelsterli, 2003

### 2.1.2 Epidemiología del diclofenaco

Para 2003 la incidencia de casos de reacciones adversas hepáticas inducidas por diclofenaco eran bajas, aproximadamente de 1 a 2 casos por millón de prescripciones (Boelsterli, 2003a).

Actualmente, se han encontrado cifras muy altas sobre la prevalencia en el consumo de este fármaco.

Para finales de los 90, se estimaban 6.9 millones de prescripciones en Inglaterra, con ventas de hasta 81.7 millones de euros, además de que para esa época, fue el AINE más prescrito en Europa, con un 28%, seguido de ibuprofeno con 18%, siendo España el país con mayor prescripciones (Jones, 2001). Entre 2005 y 2009, el diclofenaco seguía siendo el AINE más usado en la población europea, además, se encontró un incremento del 43% en el riesgo de usar el fármaco (Thöne et al., 2017).

Dentro de los AINEs más usados a nivel mundial, se encuentran el diclofenaco y el ibuprofeno con aproximadamente el 40% de ventas en todo el mundo en prescripciones de osteoartritis, además de que las personas que más lo consumen son de la tercera edad (Conaghan, 2012).

En México, se realizó un estudio en donde se analizó la información de 629 pacientes mayores de 50 años que acudieron a consulta a dos unidades de medicina familiar del IMSS en la Ciudad de México durante el 2006 y que se presentaron con síndrome doloroso de origen no oncológico y que recibieron prescripción de analgésicos no opioides. Entre los resultados destaca que el diclofenaco fue de los fármacos prescritos con mayor frecuencia en combinación con algún otro AINE (naproxeno, piroxicam, indometacina, celecoxib; (Doubova et al., 2007).

### **2.1.3 Estudios de hepatotoxicidad inducida por diclofenaco**

El diclofenaco está considerado como el AINE más tóxico que resulta en daño hepático, renal y gastrointestinal, sin embargo, el nivel del daño está en función de la dosis y tiempo de exposición, además de que en la mayoría de los casos es reversible (Helfgott et al., 1990; Nouri et al., 2017).

Existen diversos estudios que mencionan que el consumo prolongado de diclofenaco puede causar hepatotoxicidad a diversos niveles. Muchos de estos estudios se han realizado *in vitro*, mediante el uso de cultivos primarios o de microsomas, en donde se han evaluado los efectos tóxicos de los metabolitos hidroxilados y conjugados (Grillo et al., 2003; Kretz-Rommel & Boelsterli, 1993; Kumar et al., 2002; Mueller et al., 2012; Sarkar et al., 2017; Syed et al., 2016a).

(Gómez-Lechón et al., 2003) evaluaron el efecto del diclofenaco en las etapas tempranas que desencadenan la cascada apoptótica en hepatocitos, así mismo evaluaron si los antioxidantes previenen la apoptosis causada por el fármaco. Encontraron que el diclofenaco induce apoptosis

sin llegar a necrosis mediante la activación de las caspasas 3, 8 y 9. Además, determinaron que el estrés oxidativo también está involucrado en el daño mitocondrial alterando la integridad de la permeabilidad de la membrana (MPT), lo que indica el daño oxidativo provocado por diclofenaco.

Debido a que los procesos patológicos como esteatosis, fibrosis y cirrosis son enfermedades hepáticas, se ha establecido la medición de biomarcadores para determinar si existe desarrollo de alguno de estos procesos, sin embargo, los parámetros que se miden a veces son el producto de alguna reacción que sucedió (Aithal et al., 2012).

Existen pocos marcadores que son confiables para la detección, monitoreo o diagnóstico. Los biomarcadores más ampliamente utilizados son alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina en suero, ya que sus valores indican que el hígado está dañado (Meunier & Larrey, 2019).

Más recientemente, se ha estudiado el efecto del diclofenaco a diferentes dosis (6.75 mg/kg y 13.5 mg/kg) durante 14 días y su evaluación hematológica (concentración de hemoglobina), bioquímica (ALT, AST, albúmina total, globulina total, urea, creatinina), estatus antioxidante y estrés oxidativo (MDA y GSH) e histopatológica (H&E) en hígado y riñón. Para todos los parámetros, la dosis baja (6.75 mg/kg) no mostró un efecto significativo, mientras que la dosis alta (13.5 mg/kg) sí mostró modificaciones en los resultados, tanto en hígado como en riñón. En general, el diclofenaco a altas dosis puede causar alteraciones hematológicas, bioquímicas e histopatológicas, además de que se pueden ver afectadas por el estrés oxidativo inducido por los metabolitos hidroxilados o conjugados del fármaco (Kh et al., 2013).

Como se describe previamente, las actividades de lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotrasferasa (ALT) y las concentraciones de los metabolitos 5-hidroxiclofenaco y 4'-hidroxiclofenaco incrementan conforme la concentración de diclofenaco aumenta. Respecto a los cambios macroscópicos y microscópicos en hígado de rata, a dosis terapéuticas (8 mg/kg/día, equivalente a la dosis en humanos) y durante dos períodos en donde se administraron 75 mg/3ml de diclofenaco durante 7 y 28 días, se observó que las ratas sufrían distensión abdominal y depósitos de fibrina en el hígado al séptimo día, además de degeneración parenquimal, mientras que al día 28 se observó infiltrado perivascular y necrosis. Este daño fue determinado mediante la técnica histológica hematoxilina-eosina (Tomic et al., 2008).

OTROS TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Otros estudios mencionan que altas dosis de diclofenaco provoca que los metabolitos tóxicos se acumulen causando daño hepático, por lo que el uso prolongado de este fármaco se encuentra relacionado con la hepatotoxicidad causada por estrés oxidativo, ya que provoca un desequilibrio en los procesos bioquímicos involucrados en la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En este sentido, existen estudios en los que se prueban antioxidantes naturales para evaluar el efecto hepatoprotector que pueden poseer, como el realizado por (Oa et al., 2018), quienes demostraron la actividad hepatoprotectora del muérdago de cacao y de la hoja de papaya, sin embargo no identificaron el compuesto bioactivo responsable.

Otros estudios se han enfocado en evaluar el efecto protector de fármacos contra el daño hepático causado por diclofenaco. La N-acetilcisteína es un agente modulador de glutamato que puede actuar como antioxidante debido a su naturaleza nucleófila y como donador de -SH en la toxicidad de compuestos químicos y se ha reportado que disminuye los niveles de las enzimas AST, ALT y ALP en suero en ratas que sufren de daño hepático provocado por diclofenaco, además de que restablece las actividades de CAT (catalasa) y SOD (superóxido dismutasa), enzimas que juegan un papel importante en el acarreamiento de radicales libres (Nouri et al., 2017).

A principios de los 90's (Helfgott et al., 1990), cuando recién se había introducido el diclofenaco a Estados Unidos, se reportaron 7 casos de hepatitis asociada al fármaco. 6 pacientes eran mujeres y uno varón, en un rango de edad entre los 45 y los 70 años, presentando un diagnóstico de osteoartritis, fibrositis y artritis reumatoides. Todos mostraron elevaciones en los niveles de las aminotransferasas séricas. Hubo un caso de muerte con necrosis hepática, mientras que el resto de los pacientes se recuperaron después de suspender la administración.

## **2.2 Betalaínas**

Las betalaínas, son metabolitos secundarios de las plantas, almacenados en vacuolas celulares (Escribano et al., 1998) que se encuentran en algunas familias pertenecientes al orden Caryophyllales (a excepción de Caryophyllaceae y Moluginaceae) y en algunos hongos superiores (Gliszczynska-Świgło et al., 2006), son excluyentes de las antocianinas, ya que las reemplazan física y funcionalmente en todos los contextos (Akbar Hussain et al., 2018). Estas moléculas son pigmentos que debido a su estructura absorben luz a cierta longitud de onda reflejando el resto, el cual es el color que percibe el ojo humano. La parte de la molécula responsable del color es el cromóforo que usualmente presenta una cadena con dobles enlaces conjugados, dando lugar a un sistema de resonancia electrónica, en donde la separación energética de sus estados electrónicos coincide con la energía de determinados fotones del

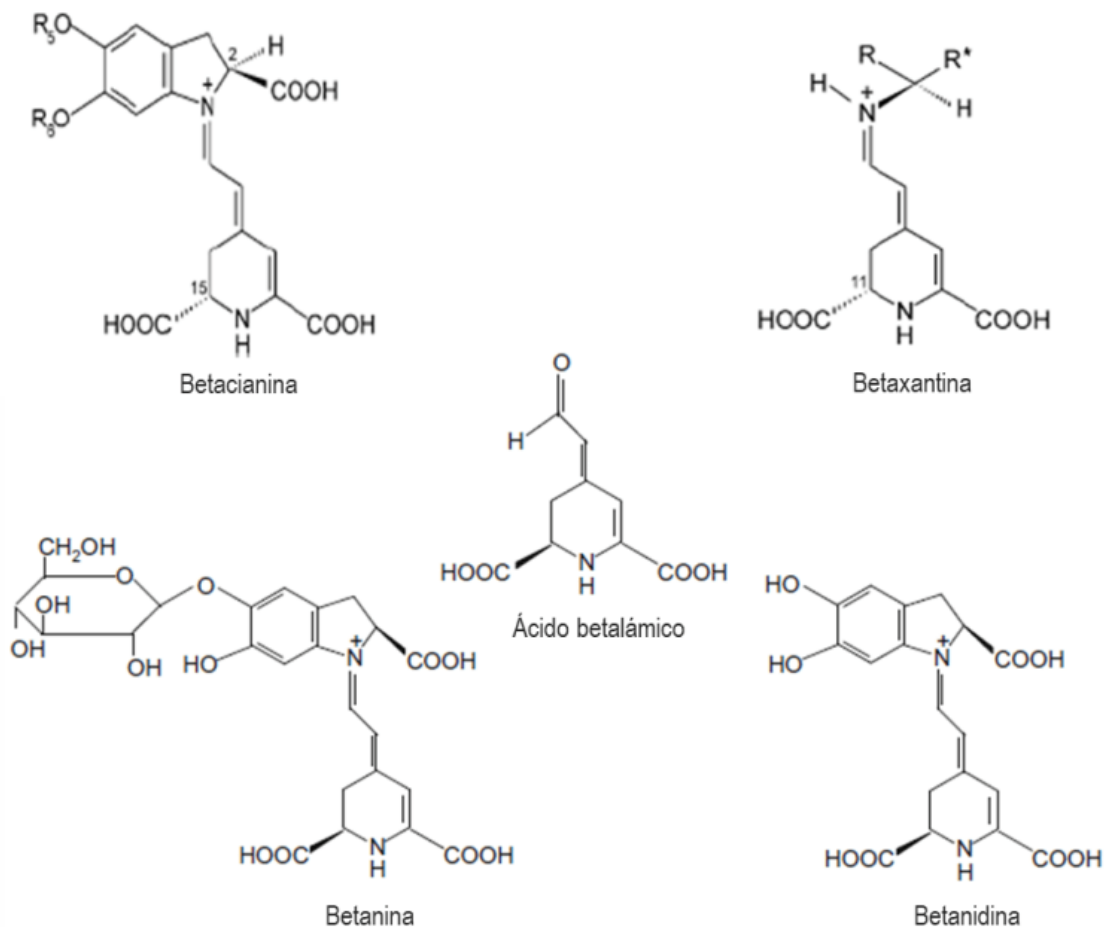
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

rango visible de la luz y los cuales son absorbidos por el pigmento (Gandía-Herrero et al., 2012). Este sistema de resonancia electrónica le confiere estabilidad a la molécula (Gandía-Herrero et al., 2010a).

Comparten una unidad básica estructural y funcional, el ácido betalámico [ácido 4-(2-oxoetilideno)-1,2,3,4-tetrahidropiridin-2,6-dicarboxílico], que a su vez, es el cromóforo de estas moléculas (Khan, 2016). Cuando se conjuga con un aminoácido o amina surgen las betaxantinas, cuya absorbancia se encuentra dentro del espectro visible de luz con absorbancias de longitud de onda ronda entre 467 y 489 nm, presentando coloraciones amarillas y naranjas; cuando se conjuga con una 3,4-dihidroxifenilalanina (*ciclo-DOPA*) con sustituciones adicionales mediante diferentes patrones de glicosilación y acilación en los carbonos 5 o 6 surgen las betacianinas, de las cuales la betanina (betanidina 5-*O*- $\beta$ -glucósido) es el principal componente, y cuyo rango de máxima absorbancia de luz se encuentra de 524 a 542 nm, presentando coloraciones rojo-púrpura (Kanner et al., 2001b; Livrea & Tesoriere, 2012). El sistema de dobles enlaces conjugados presentes en el ácido betalámico es el responsable de la coloración de estos pigmentos (García Carmona et al., 2011).

Ha surgido un gran interés por explorar más a fondo las características de las betalaínas en la industria, específicamente de la betanina extraída de la remolacha, que se ha aprobado como colorante rojo con el código EEC No. 162 por la Unión Europea bajo la Sección 73.40 en el Título 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, y se ha usado ampliamente en la industria de cosméticos, farmacéutica y como aditivo alimentario usado como colorante en productos lácteos como yogur, helado, glaseados preparados, mezclas para pasteles, otros alimentos como dulces, sustitutos de carne, mezclas de bebida en polvo, malvaviscos y gelatinas; por otra parte, también se ha usado como conservador de alimentos gracias a la actividad antioxidante que posee, ya que se ha demostrado que protege de la peroxidación lipídica (Indumathi et al., 2017; Khan, 2016; Vieira Teixeira da Silva et al., 2019).





**Figura 15.** Estructura química del ácido betalámico, betaxantina y derivados. Modificado de Livrea & Tesoriere, 2012

Las betalainas se extrajeron por primera vez de *Beta vulgaris* (betabel) y actualmente es reconocida como una fuente natural y principal de este pigmento. Gracias al avance en técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética, se ha logrado explicar la estructura de estas moléculas, logrando una amplia caracterización de este grupo de pigmentos así como su biosíntesis (Akbar Hussain et al., 2018). Gracias a estos nuevos conocimientos se ha propuesto que las betalainas pueden proveer de efectos benéficos a la salud humana.

### 2.2.1. Actividad biológica de las betalainas

Similar a otros fitoquímicos, las betalainas han llamado la atención debido a sus actividades farmacológicas como antioxidantes, antiinflamatorios y antilipidémicos. (Escribano et al., 1998) fueron los primeros en reportar el posible efecto antioxidante de las betalainas. Realizaron un ensayo de capacidad antioxidante utilizando una mezcla del radical catión 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) y peróxido de hidrógeno, en donde evaluaron la reducción del radical ABTS<sup>•+</sup> por

parte de betacianinas y betaxantinas aisladas de *B. vulgaris* y de las cuales las betacianinas presentaron mejor capacidad antiradical. Esto se puede explicar mediante la donación de un electrón por parte del oxígeno fenólico de las betacianinas dando lugar a un radical betacianina, que logra estabilizarse por la deslocalización del electrón no apareado a través del anillo aromático. Respecto a la donación por parte de las betaxantinas, el electrón extraído sólo puede ser de los orbitales  $\pi$  conjugados, sin embargo, este proceso se ve interferido por la carga positiva que se encuentra en el átomo de nitrógeno. Por lo tanto, los autores sugieren que las especies desprotonadas de las betalaínas son las principales responsables de las propiedades antiradicales, lo cual se demostró más adelante cuando se aislaron 15 compuestos betalaínicos (Gandía-Herrero et al., 2010a) a partir de diferentes especies (orden Caryophyllales), los cuales mostraron tener una mejor capacidad antiradical mediante la técnica de capacidad antiradical equivalente a Trolox (TEAC), en donde se utiliza el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), que es un análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -tocoferol, como compuesto estándar en un medio que contiene el radical ABTS<sup>•+</sup>; dichos compuestos se evaluaron a diferentes pH y se observó que el valor TEAC mejoraba conforme el pH aumentaba.

A partir de entonces, son diversos los estudios en donde se evalúa principalmente la capacidad antioxidante, mediante el uso de radicales libres como ABTS<sup>•+</sup> (Gandía-Herrero et al., 2010a; Gliszczynska-Świgło et al., 2006; H. González-Ponce et al., 2016), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>; (Cai et al., 2003a; Esatbeyoglu et al., 2014a; H. González-Ponce et al., 2016), hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; (Cai et al., 2003a; Tesoriere et al., 2009a) y aplicando las técnicas TEAC, Poder Antioxidante Reductor de Hierro (FRAP), y otras de peroxidación lipídica (Czapski, Mikołajczyk, et al., 2009; Gandía-Herrero et al., 2012; Gliszczynska-Świgło et al., 2006; Vieira Teixeira da Silva et al., 2019).

De esta manera se ha logrado elucidar que la actividad antioxidante de las betalaínas se relaciona con su estructura molecular. Se ha observado que, mientras más protonada se encuentre la molécula ( $\text{pH} > 4$ ) mayor será la capacidad antiradical (Gandía-Herrero et al., 2010a), la cual se relaciona con la capacidad de donar electrones y un átomo de hidrógeno por parte del grupo hidroxilo en la molécula monofenólica (betanina) (Cai et al., 2003a; Gandía-Herrero et al., 2010a), por lo que su actividad antiradical incrementa conforme aumenta el número de grupos hidroxilo e imino (Livrea & Tesoriere, 2012), por lo tanto, las betaxantinas al no presentar grupos hidroxilo fenólicos exhiben menor actividad eliminadora de radicales (Esatbeyoglu et al., 2014a; Pedreño & Escribano, 2000). En cuanto al ácido betalámico, se demostró que una molécula de este compuesto puede reducir dos iones Fe(III) a Fe<sup>2+</sup> y de esta

manera evitar la reacción de Fenton y la consiguiente la formación de  $\text{OH}^\bullet$  (Gandía-Herrero et al., 2012). Asimismo, se ha reportado que la actividad antioxidante de la betanina es 7.5 veces (TEAC) y 3 veces (DPPH) mayor que la vitamina C (Gliszczyńska-Świgło et al., 2006).

En un estudio en donde se evaluó la capacidad antioxidante del jugo de 11 cultivares de *B. vulgaris* se observó que presentaban mayor valor TEAC aquellos cuya mayor cantidad de betacianinas era mayor (Czapski, Mikołajczyk, et al., 2009). Gracias a estos hallazgos, surge el interés de estudiar la actividad la actividad antiradical por parte de las betacianinas.

### **2.2.2 Betanina, compuesto estándar de las betacianinas**

Como se describe previamente, se considera que las betacianinas son poderosos y mejores agentes antioxidantes. Se ha logrado aislar este compuesto principalmente de *B. vulgaris*, sin embargo también se puede obtener de otras fuentes, dentro del Orden Caryophyllales, que presenten estructuras (flores, inflorescencias, brácteas, frutos, raíz, etc.) con coloración violeta o púrpura, como de diversas especies de la familia Cactaceae, entre ellas *Myrtillocactus geometrizans* (Reynoso et al., 1999) y *Opuntia ficus-indica* (Tesoriere et al., 2009a) a partir de técnicas de purificación como Sephadex y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y sus variantes (LC-MS, UHPLC-MS/MS, HPLC-UV, HPLC-DAD, HPLC-DAD-ESI-MS/MS).

En un estudio comparativo entre betanina y betanidina (Tesoriere et al., 2009a), se evaluó la actividad reductora de estos compuestos contra radicales lipoperoxilo en un medio metanólico y en uno acuoso/lipídico (liposomas), y se encontró que la betanidina presenta una eficacia mayor y se asume a que la ausencia del azúcar hidrofílico mejora la partición de bicapas lipídicas. Al transferir un átomo de H del grupo hidroxilo fenólico, ambas moléculas quedan en forma de radical. El radical betanina se puede descomponer en ácido betalámico y en radical ciclo-DOPA 5-O- $\beta$ -glucósido (CDG<sup>\*</sup>) el cual puede formar aductos estables, mientras que el radical betanidina puede seguir reaccionando con los lipoperoxilos y formar una betanidina quinona o ácido betalámico y dopacromo, los cuales se forman al sufrir un ataque nucleofílico de agua al C adyacente al N indólico, sin embargo, la betanidina es menos estable que la betanina (Sawicki et al., 2018). De acuerdo con (Akbar Hussain et al., 2018), estudios *in vitro* han revelado que la betanina es más eficiente en el retraso de la oxidación de LDL y la lipoperoxidación de membrana que la betanidina, además de que presenta una inhibición de la peroxidación lipídica de moderada a alta, lo que indica que la betanina puede resistir el daño oxidativo por parte de LDL.

Además de lo citado, se reportó en un estudio *in vitro* de cultivos celulares de THLE-2 (hepatocitos humanos no tumorales) y HepG2 (carcinoma hepatocelular) que la betanina puede inducir la translocación del factor nuclear (derivado de eritroide 2) tipo 2 (Nrf2) del citosol, en donde forma un dímero con la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1), al núcleo. Este factor de transcripción modula el sistema de defensa contra el daño oxidativo y estrés electrofílico ya que estimula la expresión de genes que codifican enzimas que se involucran en la detoxificación y eliminación de especies reactivas y moléculas electrofílicas. Algunas de estas enzimas son las de la fase II como quinona reductasa en células Hepa 1c1c7 (Wettasinghe et al., 2002), isozimas de glutatión S-transferasa, NAD(P)H quinona oxidorreductasa (NQO1) y hemooxigenasa-1 (HO-1), por lo que se puede considerar que la betanina puede funcionar como hepatoprotector (Krajka-Kuźniak et al., 2013a). Esta evidencia fue confirmada más adelante por (Esatbeyoglu et al., 2014a), quienes utilizaron cultivos celulares de Huh7 (células de hepatoma humano) y HT-29 (células de adenocarcinoma de colon humano) y los resultados obtenidos sugieren que el pretratamiento con betanina además de inducir la expresión de enzimas de fase II, también induce la síntesis de GSH mediante la vía de Nrf2 en las Huh7 y en las HT-29 previene el daño al DNA por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dado que el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es un compuesto que se activa por la isoforma CYP2E1 cuyo producto inicial es el radical triclorometil que produce moléculas reactivas que pueden provocar necrosis hepática. Se estudió el efecto protector de la betanina como antioxidante en un modelo de daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> en *Cyprinus carpio* L. (carpa común), en donde se encontró un incremento en MDA y una disminución en los niveles de GSH y reducción en la actividad de SOD y CAT en los grupos tratados con CCl<sub>4</sub>, mientras que en el grupo tratado con betanina profilácticamente se atenuó el estrés oxidativo provocado por CCl<sub>4</sub>, ya que los niveles de MDA disminuyeron e incrementó GSH, así como la actividad de SOD y CAT, demostrando el efecto protector de la betanina contra el estrés oxidativo. Por otra parte, en la evaluación del daño hepático, la actividad de AST y ALT séricas aumentó en el grupo CCl<sub>4</sub>, mientras que en el tratado profilácticamente con betanina la actividad de estas enzimas se redujo, asimismo, en el análisis histopatológico se observó que la betanina atenuó el daño hepático, lo que indica el efecto hepatoprotector de la betanina contra el daño hepático inducido con CCl<sub>4</sub> (Han, Gao, et al., 2014a).

De igual manera, otro estudio demuestra que además de atenuar el daño hepático inducido con un herbicida (paraquat) en rata, a través del monitoreo de biomarcadores de estrés oxidativo (MDA, GSH, SOD, CAT) y de daño hepático (ALT, AST), mostró que el tratamiento con betanina

antagoniza la inducción de la expresión del RNAm de CYP3A2, enzima que reduce al paraquat dando lugar a un radical paraquat, además disminuyó la presencia del poro de transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPTp), así como la fuga del citocromo c y la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria al citosol, eventos pro apoptóticos que se dan a partir del exceso de moléculas reactivas en la mitocondria (Tan et al., 2015).

En general, se atribuye que la betanina posee una alta actividad biológica por su estructura, ya que mediciones voltaméricas mostraron que tiene un potencial redox de 0.4 v, lo que indica que es un reductor eficiente (Tesoriere et al., 2009a).

### **2.2.3 Biodisponibilidad de las betacianinas**

Para que cualquier compuesto sea benéfico para la salud, tiene que ser biodisponible *in vivo* (Kaur et al., 2018) ya que cuando es ingerido pasa a través de la vía gastrointestinal para ser absorbido y de esta manera se podrá encontrar disponible en la circulación y transportado a los diferentes tejidos. Respecto a las betacianinas, y las betalainas en general, su absorción no es completamente clara y tampoco se han descrito por completo su metabolismo ni su eliminación (Akbar Hussain et al., 2018).

En estudios *in vitro* en donde se evalúa la biodisponibilidad, estabilidad y capacidad antioxidante de la betanina a través de simulaciones del tracto gastrointestinal se encontró que los valores FRAP, TEAC y ORAC son altos, sin embargo el sitio exacto en donde la betanina es absorbida permanece en duda, aunque los autores sugieren que se da en el intestino delgado (Vieira Teixeira da Silva et al., 2019).

(Kanner et al., 2001b) evaluaron la biodisponibilidad de las betalainas en orina de humanos, demostraron una biodisponibilidad parcial de betacianinas ya que incrementó la absorción de la orina a 536 nm la cual fue detectada entre 2 y 3 horas después de haber ingerido 300 mL de jugo de betabel. Mediante HPLC detectaron que el pico más alto pertenece a isobetanina, sugiriendo que la betanina fue isomerizada a isobetanina debido a la temperatura corporal.

Por otra parte, (Tesoriere, Allegra, et al., 2004a) investigaron las cinéticas plasmáticas y la disponibilidad de la betanina y betaxantina en humanos después de haber ingerido 500 g de fruto de *O. ficus-indica*. Ambos pigmentos se detectaron una hora después de su ingestión, mientras que el pico en plasma fue a las 3 horas después de haberlo ingerido, y eliminación del plasma fue a las 12 horas. La excreción de la betanina fue de  $3.7 \pm 3.0\%$  y se observó que una porción pequeña se une a LDL.



Otro estudio realizado por (Frank et al., 2005) en humanos que ingirieron jugo de *B. vulgaris* mostró que las betacianinas son absorbidas del intestino a la circulación sistémica sin modificar su estructura, sin embargo su baja excreción renal sugiere que debe de existir excreción biliar, circulación enterohepática y metabolismo.

Respecto a casos clínicos, existe un reporte de una persona que había asistido a un festival de música techno en donde ingirió sustancias nocivas y que fue encontrado muerto al día siguiente, aparentemente unas horas después de haber consumido betabel y cuya autopsia reveló que presentaba el colon teñido con mayor pigmentación en las zonas que tienen contacto con las heces, por lo que mediante un análisis de la muestra por LC-HRMS (cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas) detectó betanina, betanidia e isobetanina, además de dos metabolitos de fase II conjugados, betanidina glucurónido y betanidina sulfato. Además, confirman que la excreción de la betanina es baja y poco alterada, mientras que la betanidina puede ser reabsorbida de los intestinos y llegar al hígado a través de la vena porta en donde es ampliamente metabolizada con sustratos de la fase II (glucuronidación y sulfatación; (Roemmelt et al., 2014).

### **2.3 Género *Opuntia***

El género *Opuntia* pertenece a la familia Cactaceae y está formado por 200 especies que se distribuyen desde el círculo Ártico en Canadá hasta la punta de la Patagonia en América del Sur, en climas que no superan los 500 cm de precipitación anual, de estas especies 83 se distribuyen en México (Reyes-Agüero et al., 2005), por lo cual es el país más importante como centro de diversidad de género (73%, incluyendo *Opuntia*) y especies de cactáceas (78%) de las cuales su mayoría son endémicas (Illoldi-Rangel et al., 2012), además de que es considerado uno de los centros de origen de *Opuntia* (Flores Hernández et al., 2016; Maki-Díaz et al., 2015).

En México, su distribución se encuentra principalmente en la Altiplanicie Meridional, que comprende valles separados por sierras y con altitud de 2000 m y en la que se encuentran los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Ciudad de México y Puebla, cubriendo un área de aproximadamente 50,000 ha, su clima va desde seco estepario, matorrales xerófilos y encinares y piñonares (Pimienta-Barrios, 1994; Reyes-Agüero et al., 2005).

#### **2.3.1 *Opuntia robusta* J. C. Wendland**

*Opuntia robusta* (nopal tapón) es una planta arbustiva, muy ramificada, de 1-2 m de altura con tronco definido, de forma cilíndrica, artículos oblongos a orbiculares, de 25-400 cm de longitud los más terminales, muy robustos, areolas grandes, espaciadas de 3.5-4.5 cm en los artículos

medios con glóquidas color café, el número de espinas vas de 3 a 5, de 0.5-2.5 cm de longitud, blancas o blanco amarillentas de tamaño desigual; flores de 5-6 cm de diámetro, de color amarillo con tépalos abovados de 3-305 x 1-1.5 cm de anchura, lóbulos estigmáticos de color verde y fruyo globoso o elíptico de color púrpura (Ortiz & Van Der Meer, 2007).

Su distribución en México es en las zonas áridas de Zacatecas, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán (Ortiz & Van Der Meer, 2007). Es una planta que se encuentra principalmente en forma silvestre, sin embargo también existen cultivos (Pimienta-Barrios, 1994) y se ha aprovechado como verdura ya que sus brotes son consumidos en los estados de San Luis Potosí, Aguascalientes y Zacatecas, donde se consume entre abril y agosto (Romero *et al.*, 2015).



**Figura 16.** Cladodio, fruto y espinas de *Opuntia robusta*

En cuanto a su estatus de conservación, se encuentra en menor preocupación de acuerdo con la lista roja (Hernández *et al.*, 2017), su tipo de distribución de acuerdo a la NOM es endémica de México (Nájera, 2019).

**2.4 *Opuntia sp* como alimento funcional**

La presencia de las betalaínas en vegetales comestibles se reduce a las familias Amaranthaceae y Cactaceae, de las cuales las especies más estudiadas son *Beta vulgaris*

(Vieira Teixeira da Silva et al., 2019), *Chenopodium quinoa*, el género *Amaranthus* y *Myrtillocactus geometrizans*, *Hylocereus undatus* y *Opuntia ficus-indica* (Neelwarne, 2012).

Los frutos de *Opuntia sp.*, conocidos como tuna en México y *nochtli* en Náhuatl (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008a), son de los más representativos de la cultura mexicana; se han utilizado para elaborar alimentos como pulpas, jugos, bebidas alcohólicas, mermeladas y edulcorantes, además de que su comercio es alto debido a su sabor y a las propiedades nutrimentales que posee. Se sabe que es una buena fuente de minerales, vitaminas, ácido ascórbico, azúcares, vitamina E, fibra dietética, carotenoides, compuestos fenólicos y betalainas (Pimienta-Barrios, 1994).

Los estudios que se han realizado en donde se evalúa el valor agregado de este alimento son, en su mayoría, con especies cultivadas en Europa y Asia, y se ha reportado que muestran alta actividad antioxidante ya que reducen significativamente el estrés oxidativo en pacientes (Sumaya-Martínez et al., 2011a), además de su acción hipoglucémica e hipolipidémica (El-Mostafa et al., 2014) por lo que puede ayudar a prevenir patologías como diabetes mellitus tipo 2 en ratas y humanos (González-Stuart & Rivera, 2019).

El fruto más estudiado es el de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., del cual se sabe que de 33% a 35% pertenece al pericarpio (cáscara), 45% a 67% a la pulpa y el resto (2% a 10%) a las semillas, sin embargo estos porcentajes varían en todas las especies dependiendo del cultivar y de estímulos ambientales como la exposición a la luz, la temperatura y la humedad que va a estar dada por la temporada de lluvias (Piga, 2004). Se cuenta con reportes de que sus componentes tienen efectos antiulcerogénicos, antioxidantes, anticancerígenos, neuroprotectores, hepatoprotectores y antiproliferativos (Stintzing et al., 2005a).

#### **2.4.1 *Opuntia robusta* como alimento funcional**

En estudios comparativos entre diferentes especies del género *Opuntia* en los que se incluye a *O. robusta* se ha encontrado que es la que presenta mayor concentración de betalainas, siendo las betacianinas las más abundantes. Estas comparaciones se han realizado con clones de *O. ficus-indica* (Stintzing et al., 2005a), con diferentes cultivares de especies como *O. albicarpa*, *O. megacantha*, *O. cochineria* (Figueroa et al., 2010; Ramírez-Ramos et al., 2015; Sumaya-Martínez et al., 2011a) y *O. streptacantha* (H. González-Ponce et al., 2016). Entre ellos, cabe resaltar que se reportó que *O. robusta* posee mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (Figueroa-Cares et al., 2010; H. González-Ponce et al., 2016; Stintzing et al., 2005a), mayor actividad quelante del ion férrico (Sumaya-Martínez et al., 2011a), alto contenido de ácido ascórbico y valores TEAC

y ORAC más altos (Figuroa-Cares et al., 2010; H. González-Ponce et al., 2016; Stintzing et al., 2005a).

Existe un reporte en donde se evalúa el tratamiento terapéutico del fruto de *O. robusta* en pacientes adultos con hipercolesterolemia familiar y observaron un efecto antioxidante disminuyendo 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (isoprostano, marcador de daño oxidativo) en plasma, suero y orina (Budinsky et al., 2001).

En otros estudios en donde se comparan 10 especies y variedades de *Opuntia*, se determinó que las proporciones de azúcares presentes en el jugo de *O. robusta* no afectan los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, pero sí disminuye la concentración de HDL en ratas diabéticas además de presentar la capacidad antioxidante más alta en comparación con las otras especies (*O. ficus-indica*, *O. albicarpa*, *O. megacantha*, *O. streptacantha*, *O. streptacantha* spp. *aguirrana*; Zenteno-Ramírez, 2016).

(H. González-Ponce et al., 2016) evaluaron el efecto hepatoprotector de *O. robusta* y *O. streptacantha* y determinaron que el extracto de estas especies a dosis indicadas pueden incrementar la detoxificación hepática y puede ser consumida como suplemento dietético para prevenir el daño hepático causado por paracetamol, sin embargo, encontraron mejor efecto por parte de *O. robusta*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El género *Opuntia* se distribuye en zonas semi-áridas de la parte central de México (Altiplanicie Meridional), tanto en forma silvestre como cultivada. La especie *O. robusta* (tuna taño) se distribuye en su mayoría de forma silvestre y existen estudios que reportan que el cladodio (nopal) provee de efectos benéficos en el metabolismo humano, a pesar de ello existen pocos estudios sobre la capacidad nutracéutica del fruto (tuna).

Por otra parte, en clínica el diclofenaco es uno de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que presenta elevados índices de consumo a nivel mundial debido a sus efectos analgésicos y antiinflamatorios, además es un fármaco de venta libre. Existen estudios en Europa y Estados Unidos que indican que el diclofenaco puede desarrollar daño hepático, en poblaciones susceptibles mayores de 60 años con patologías primarias. Sin embargo, en México existen pocos reportes clínicos.

Con base en lo anterior, el presente trabajo evaluará in vivo e in vitro el efecto nutracéutico y nutrigenómico del fruto de *Opuntia robusta* y betanina en la toxicidad hepática inducida con diclofenaco.

#### 4. HIPÓTESIS

Los componentes del extracto del fruto de *O. robusta* poseen efectos protectores en la hepatotoxicidad inducida con diclofenaco.

#### 5. OBJETIVOS

##### **5.1 Objetivo general**

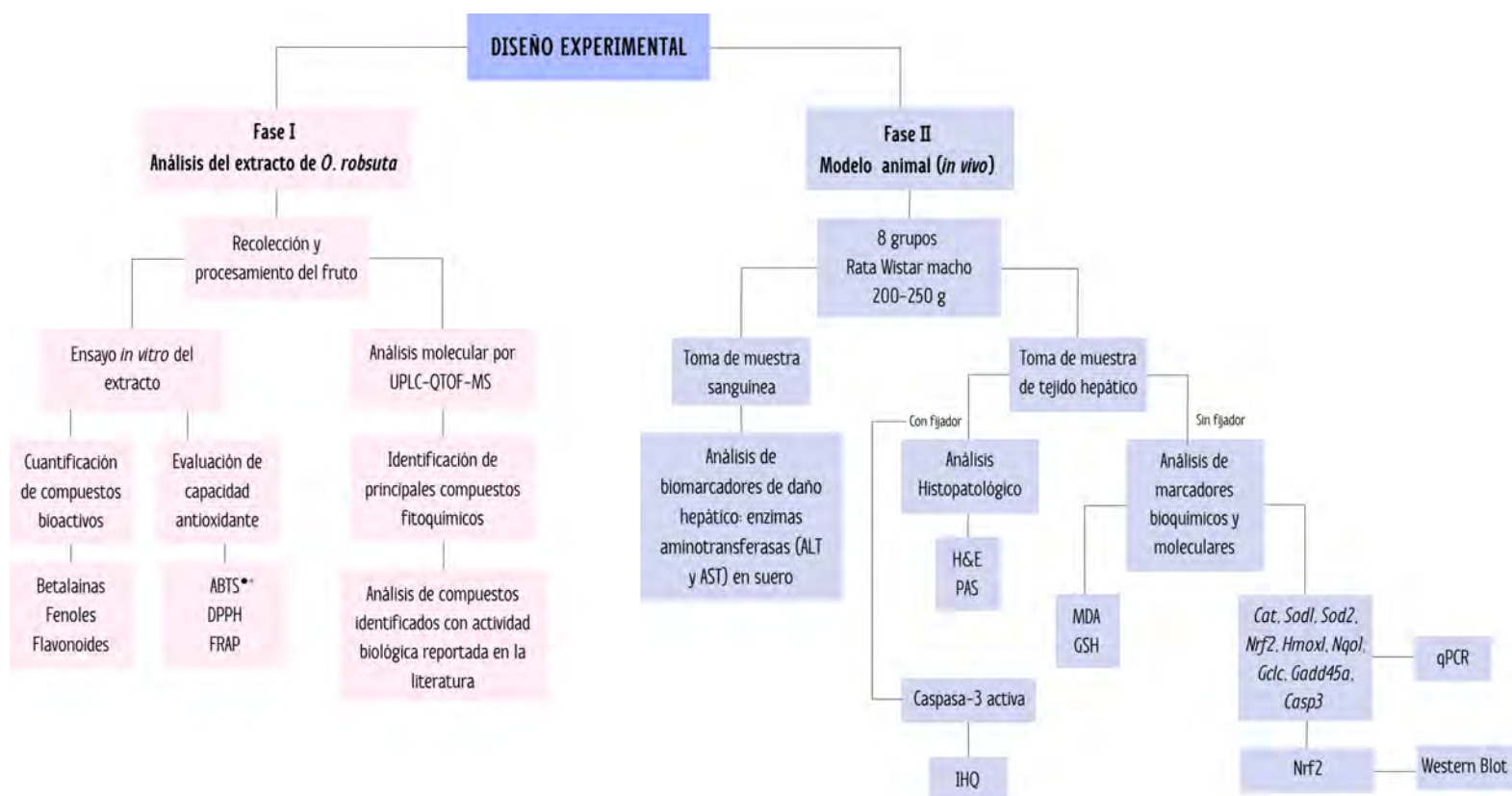
Evaluar el efecto profiláctico de los componentes del extracto del fruto de *O. robusta* en la hepatotoxicidad aguda producida por diclofenaco.

##### **5.2 Objetivos particulares:**

1. Caracterizar la capacidad antioxidante del extracto del fruto de *O. robusta*.
2. Evaluar el efecto del tratamiento profiláctico del extracto de *O. robusta* sobre el daño hepático agudo causado por diclofenaco.



## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



Abreviaturas: UPLC-QTOF-MS: cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo; ABTS\*+: Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FRAP: Poder Antioxidante de Reducción Férrica; H&E: Hematoxilina&Eosina; MDA: Malondialdehído; GSH: Glutatión reducido; Cat: catalasa; Sod: superóxido dismutasa; Nrf2: factor nuclear eritroide 2; Hmox1: hemoxygenasa 1; Nqo1: NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1; Gclc: glutamato-cysteín ligasa subunidad catalítica; Gadd45: detención del crecimiento y daño del ADN inducible, alfa; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; IHQ: inmunohistoquímica.

## **6.1 Fase I: Análisis *in vitro* del extracto de *O. robusta***

### **6.1.1 Colecta de frutos, extracto y almacenamiento**

Se realizaron 3 colectas en la comunidad Soledad de Abajo (Estación de Adames), El Llano, Aguascalientes, México, con las coordenadas 21°47'04.7"N 102°06'40.1"O. Las colectas se llevaron a cabo en la temporada de lluvia (2 de agosto, 28 de agosto y 18 de septiembre de 2019).

Los frutos se lavaron y desinfectaron con Microdyn®, se retiró la cáscara con utensilios lavados y desinfectados con etanol 96°. Se separaron la cáscara y el fruto, se pesaron para su procesamiento.

### **6.1.2 Elaboración del extracto**

Se obtuvo el jugo del fruto con una licuadora Oster. El jugo de cada lote se centrifugó en una centrífuga refrigerada de suelo Sorvall™ ST8 FR Thermo Fisher Scientific a 5000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel Whatman 40 (tamaño de poro 8 micras) y se almacenó en alícuotas de 25 mL en tubos falcon oscuros de 50 mL a -80°C. Todas las muestras se liofilizaron en un liofilizador Labconco FreeZone 18 Liter Freeze Dry System (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) y se mantienen a -80°C.

Se caracterizó la capacidad antioxidante de los extractos. Mediante el uso de DPPH y ABTS•- como radicales libres, el método FRAP, además de la determinación de compuestos fenólicos solubles y flavonoides solubles totales.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración que permitió calcular la pendiente de la recta, la cantidad de equivalentes del compuesto estándar, y de esta forma evaluar la actividad antioxidante de la muestra.

Asimismo, se determinó el porcentaje de humedad del extracto y el peso seco mediante el método AOAC 920.151 en donde se colocó una muestra del extracto en una charola dentro de una estufa Felisa® modelo FE-291AD serie 1604023 a 105°C durante dos horas, transcurrido el tiempo se pasaron a un desecador hasta que se enfrió y se pesó. Este procedimiento se repitió hasta que el peso de la muestra fue constante. La muestra se analizó por triplicado.

### **6.1.3 Extracción de compuestos fenólicos solubles**

El extracto se realizó pesando 3.1369 g y se le añadieron 10 mL de metanol acuoso (50%) pH 2.0, se centrifugó a 1500 g en una centrífuga clínica EBA 200 Hettich durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto A), al residuo insoluble se le añadieron 10 mL de acetona acuosa (79%) y se resuspendió. Se agitó en un agitador vortex-Genie Scientific Industries, Inc.

durante una hora y al transcurrir el tiempo se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante (extracto B) en el tubo del extracto A (extracción en MAA), se mezclaron y se almacenó en congelación hasta su uso (Hassan et al., 2011).

#### 6.1.4 Determinación de fenoles solubles totales

Se utilizó el método colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu 2N y ácido gálico como compuesto estándar en concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 µg, se dejó reaccionar y posteriormente se agregó carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 7%; para la muestra del extracto, se sustituyó el ácido gálico por el extracto de *O. robusta* en MAA en alícuotas de 250 µL por triplicado. El producto de reacción se midió a una λ 757nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Biomate 3. La curva de calibración se obtuvo con 3 repeticiones (gráfica 1) (Folin & Ciocalteu, 1927; Folin & Denis, 1912a, 1912b; Folin & Denis, 1915; Hassan et al., 2011; Singleton et al., 1999). Se determinó la cantidad de equivalentes de ácido gálico mediante la siguiente ecuación:

$$EAG = \left[ \frac{(A - b)}{m} \right] * \left( \frac{Vt}{Va} \right) * \left[ \frac{1}{(Mh * 10)} \right] * \left[ \frac{1}{(100 - H)} \right]$$

en donde:

EAG = miligramos de equivalentes de ácido gálico/gramo de muestra seca

A = absorbancia del extracto

b = ordenada al origen (absorbancia)

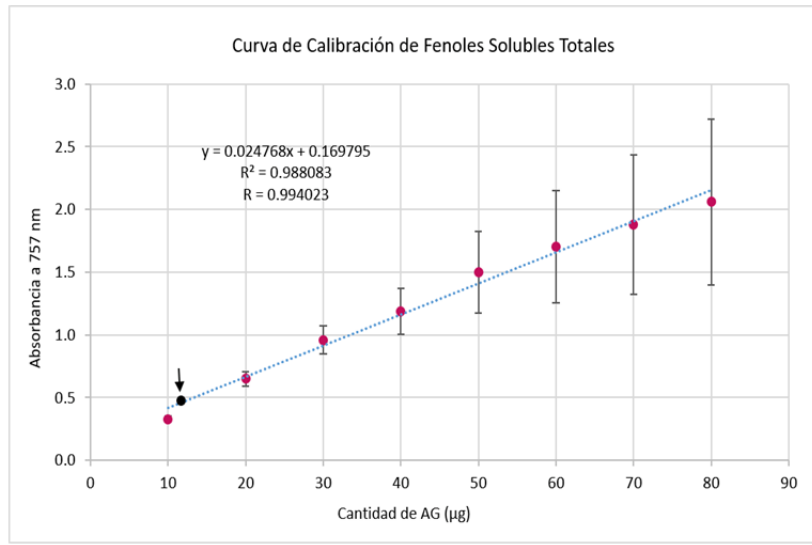
m = pendiente (absorbancia/microgramo de ácido gálico)

Vt = volumen total del extracto en microlitros

Va = volumen de alícuota del extracto en microlitros

Mh = peso de la muestra húmeda extraída en gramos

H = contenido de humedad de la muestra húmeda (%)



**Figura 17.** Curva de calibración de fenoles solubles totales. Se observan las absorbancias obtenidas de las diferentes cantidades de ácido gálico utilizadas

### 6.1.5 Determinación de flavonoides solubles totales

La curva de calibración (gráfica 2) se elaboró con 4 reacciones por cantidad de catequina (0, 3.33, 8.33, 16.67, 33.33, 50.00, 66.67 y 83.33 µg) utilizando cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 10% (p/v), nitrito de sodio (NaNO<sub>3</sub>) al 5% e hidróxido de sodio (NaOH) 1 M; para la muestra del extracto, se sustituyó la catequina por alícuotas de 250 µL de extracto en MAA por triplicado. El producto de reacción se midió a una λ de 510 nm (Hassan et al., 2011; Heimler et al., 2006). Se determinó la cantidad de flavonoides solubles totales como equivalentes de (+) - catequina mediante la siguiente ecuación:

$$ECat = \left[ \frac{(A - b)}{m} \right] * \left( \frac{Vt}{Va} \right) * \left[ \frac{1}{(Mh * 10)} \right] * \left[ \frac{1}{(100 - H)} \right]$$

en donde:

ECat = miligramos de equivalentes de (+) - catequina/gramo de muestra seca

A = absorbancia del extracto

b = ordenada al origen (absorbancia)

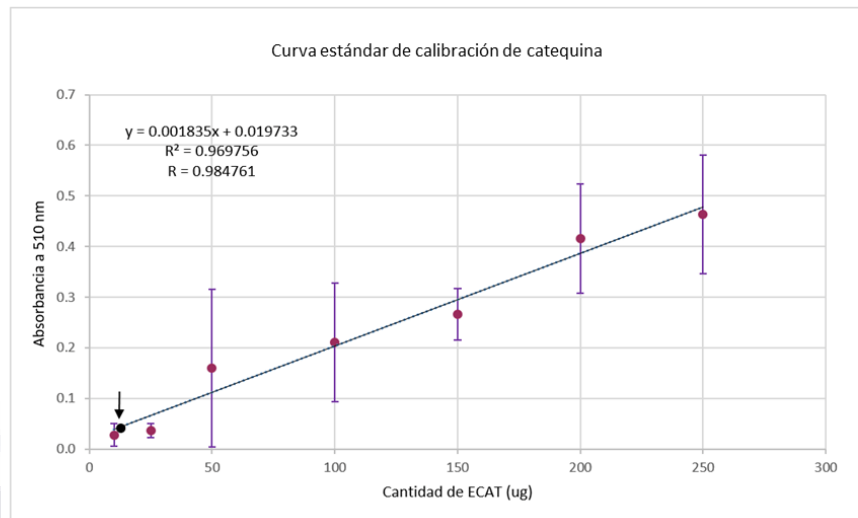
m = pendiente (absorbancia/microgramo (+) - catequina)

Vt = volumen total del extracto en microlitros

Va = volumen de alícuota del extracto en microlitros

Mh = peso de la muestra húmeda extraída en gramos

H = contenido de humedad de la muestra húmeda (%)



**Figura 18.** Curva de calibración de fenoles solubles totales. Se observan las absorbancias obtenidas de las diferentes cantidades catequina utilizadas

### 6.1.6 Determinación de actividad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Se elaboró una curva de calibración utilizando el radical DPPH el cual reacciona con el reactivo Trolox (gráfica 3), en cantidades de 0, 5, 15, 15, 20, 25, 30 y 35 nmol; para el extracto se realizaron tres repeticiones en donde se sustituyó Trolox por el extracto de *O. robusta* en MAA en alícuotas de 75 µL; el producto de todas las reacciones se midió a una λ de 515 nm (Blois, 1958; Brand-Williams et al., 1995; Frankel & Meyer, 2000; Fukumoto & Mazza, 2000; Hassan et al., 2011). Se determinó la cantidad equivalentes de Trolox mediante la siguiente ecuación:

$$ET = \left[ \frac{(A - b)}{m} \right] * \left( \frac{Vt}{Va} \right) * \left[ \frac{1}{(Mh * 10)} \right] * \left[ \frac{1}{(100 - H)} \right]$$

en donde:

ET = micromoles de equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca

A = absorbancia del extracto

b = ordenada al origen (absorbancia)

m = pendiente (absorbancia/nanomol de Trolox)

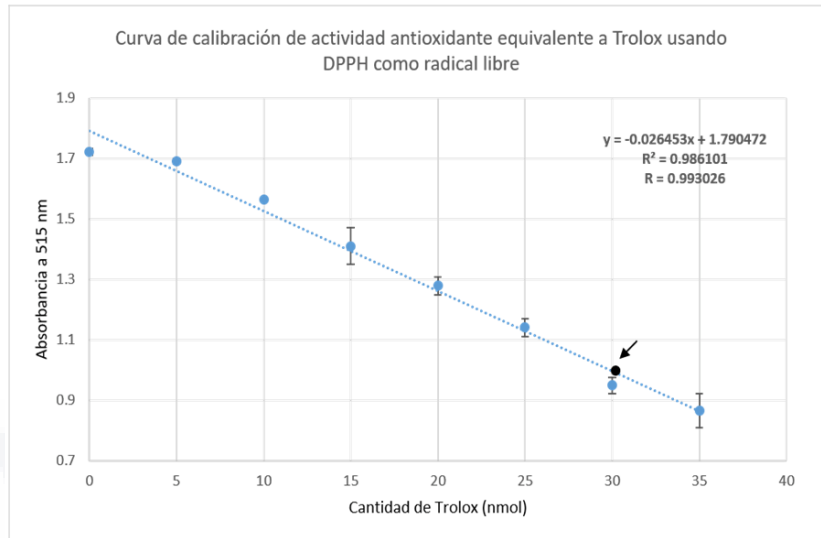
Vt = volumen total del extracto en microlitros

Va = volumen de alícuota del extracto en microlitros

Mh = peso de la muestra húmeda extraída en gramos

H = contenido de humedad de la muestra húmeda (%)





**Figura 19.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox usando DPPH como radical libre. Cada punto representa el valor promedio de tres mediciones con su desviación estándar, se muestra la ecuación de la recta y los valores del coeficiente de determinación y de correlación

**6.1.7 Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•-)**

La mezcla de ABTS y persulfato de potasio da lugar a la formación del radical (ABTS•-), el cual se reduce en presencia de un antioxidante. Para realizar la curva de calibración se utilizaron 3 repeticiones de cada reacción en presencia de Trolox (gráfica 4) cuyas concentraciones fueron de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 nmol; para evaluar la actividad eliminadora del radical se realizaron tres repeticiones sustituyendo Trolox por alícuotas de 75 µL del extracto en MAA. La reacción se midió a una λ de 734 nm (Arnao et al., 2001; Frankel & Meyer, 2000; Hassan et al., 2011; Niki, 2010; Thaipong et al., 2006). Se determinó la cantidad de equivalentes de Trolox mediante la siguiente ecuación:

$$ET = \left[ \frac{(A - b)}{m} \right] * \left( \frac{Vt}{Va} \right) * \left[ \frac{1}{(Mh * 10)} \right] * \left[ \frac{1}{(100 - H)} \right]$$

en donde:

ET = micromoles de equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca

A = absorbancia del extracto

b = ordenada al origen (absorbancia)

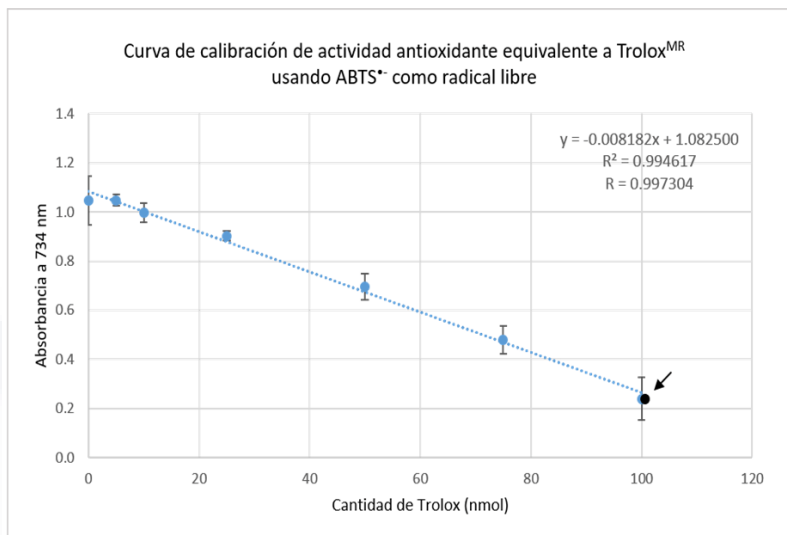
m = pendiente (absorbancia/nanomol de Trolox)

Vt = volumen total del extracto en microlitros

Va = volumen de alícuota del extracto en microlitros

Mh = peso de la muestra húmeda extraída en gramos

H = contenido de humedad de la muestra húmeda (%)



**Figura 20.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox usando ABTS\* como radical libre. Cada punto representa el valor promedio de tres mediciones con su desviación estándar, se muestra la ecuación de la recta y los valores del coeficiente de determinación y de correlación

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

Para determinar la curva de calibración (gráfica 5) se colocaron volúmenes de solución diluida de Trolox 0.666 mM en cantidades de 0, 16.65, 33.30, 49.95, 66.60, 83.25 y 99.90 nmol, que reaccionaron con la solución FRAP, que contiene buffer de acetatos 300mM pH 3.6, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM (disuelto en agua destilada y ácido clorhídrico concentrado) y solución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 20 mM); para evaluar la capacidad de reducir Fe(III) a Fe<sup>2+</sup> del extracto, se sustituyó Trolox por el extracto de *O. robusta* en MAA en alícuotas de 75 µL por triplicado. El producto de reacción se midió a una λ de 593 nm (Benzie & Strain, 1996; Frankel & Meyer, 2000; Hassan et al., 2011; Thaipong et al., 2006). Se determinó la cantidad de equivalentes de Trolox mediante la siguiente ecuación:

$$ET = \left[ \frac{(A - b)}{m} \right] * \left( \frac{Vt}{Va} \right) * \left[ \frac{1}{(Mh * 10)} \right] * \left[ \frac{1}{(100 - H)} \right]$$

en donde:

ET = micromoles de equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca

A = absorbancia del extracto

b = ordenada al origen (absorbancia)

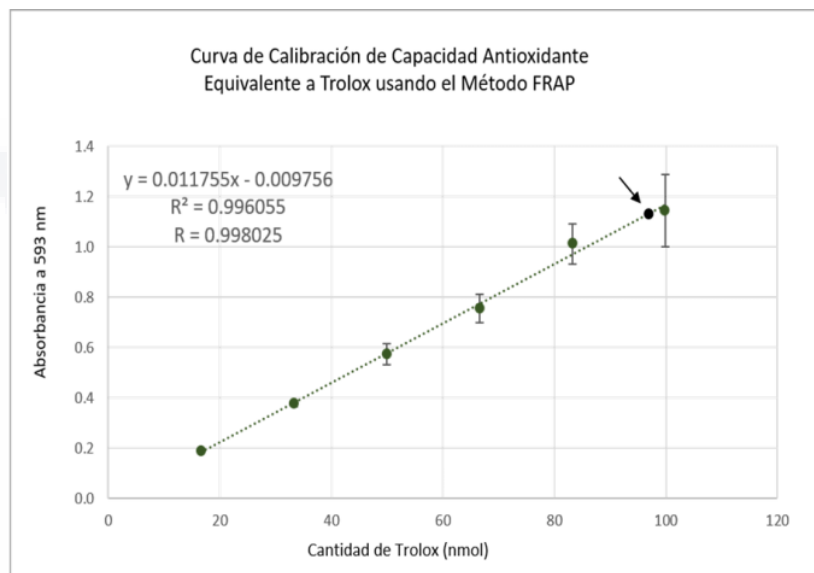
m = pendiente (absorbancia/nanomol de Trolox)

Vt = volumen total del extracto en microlitros

Va = volumen de alícuota del extracto en microlitros

Mh = peso de la muestra húmeda extraída en gramos

H = contenido de humedad de la muestra húmeda (%)



**Figura 21.** Curva de calibración de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox mediante el método FRAP. Cada punto representa el valor promedio de tres mediciones con su desviación estándar, se muestra la ecuación de la recta y los valores del coeficiente de determinación y de correlación

### 6.1.9 Cuantificación de betalaínas

Se tomaron diferentes alícuotas del extracto y se hicieron diluciones (1:25, 1:30 y 1:40) en agua destilada para obtener un volumen total de 2 mL con tres repeticiones cada dilución. Se clarificaron los extractos diluidos a 12000 rpm en una centrífuga Becton Dickenson-Clay Adams Micro2000 y se midió a una  $\lambda$  de 538 nm para betacianinas y 485 nm para betaxantinas. Se aplicó la siguiente ecuación para determinar las cantidades de cada pigmento (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008a; Stintzing et al., 2005a):

$$BT \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A * FD * PM * 1000}{\epsilon * l}$$

en donde:

B= betacianinas o betaxantinas

A = absorbancia de la muestra, 485 nm para betaxantina, y 538 nm para betacianina

FD = factor de dilución

PM = peso molecular (Indicaxantina = 308 g/mol, Betanina = 550g/mol)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar (indicaxantina = 48 000 L mol.cm<sup>-1</sup>, betanina= 60 000 L mol.cm<sup>-1</sup>)

l = Longitud de la celda (1 cm)

#### **6.1.10 Análisis molecular del extracto de *O. robusta* por UPLC-QTOF-MS (cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo)**

##### **6.1.10.1 Preparación de la muestra para el análisis de HPLC-MS**

El estándar de betanina (Sigma-Aldrich 901266-5G, St. Louis, MO, USA) se preparó a una concentración de 1 mg/mL en agua ultra pura. Después de descongelar a 4 °C, se resuspendieron 0.11 g de extracto de *O. robusta* liofilizado en 1 mL de agua con 0.1% de ácido fórmico. Se agitó la muestra en vórtex durante 60 s y posteriormente se centrifugó por 10 min a 186 rfc. Se pasó a través de un filtro de nylon de 0.22  $\mu$ m y una vez filtrada, se volvió a centrifugar por 5 min a 186 rfc. Finalmente, el sobrenadante se colocó en un vial ámbar para su análisis

##### **6.1.10.2 Cromatografía líquida y espectrometría de masas**

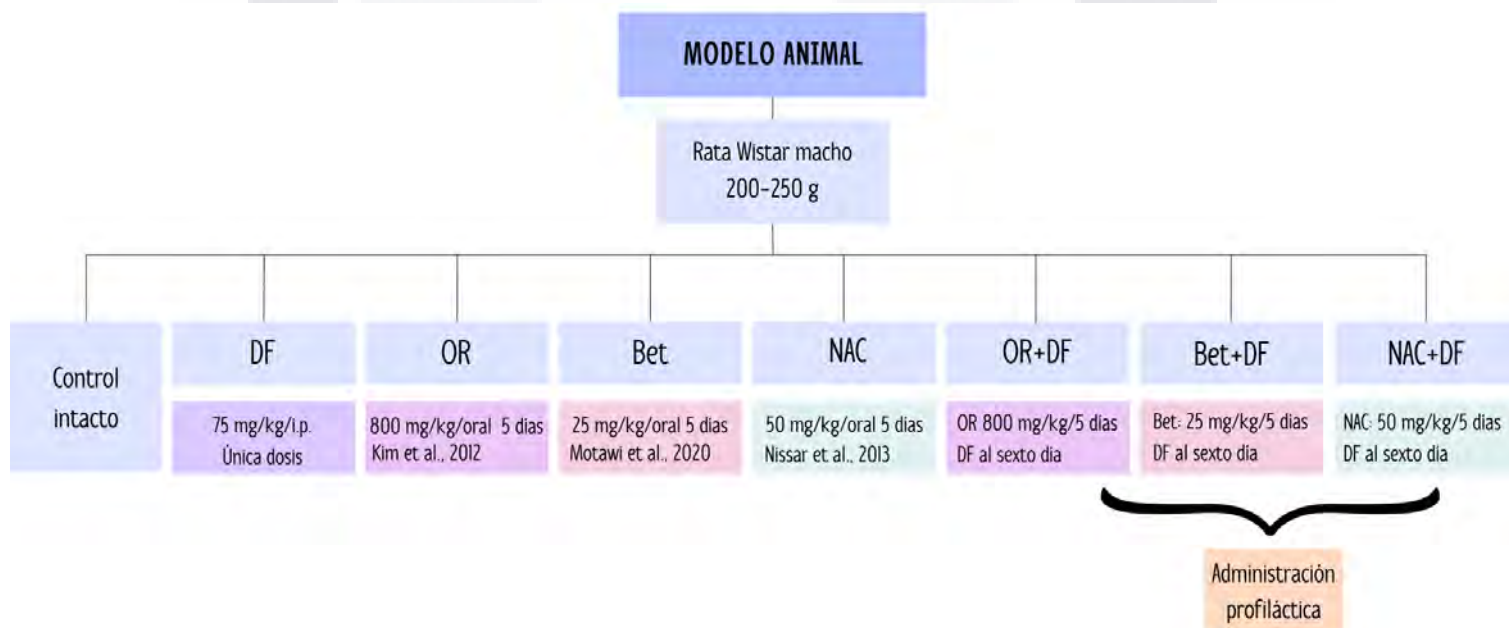
La separación cromatográfica se realizó en un equipo Waters ACQUITY UPLC® Class I (Waters Corporation, Milford, MA, USA) usando una columna Acquity HSS T3 (2.1× 100 mm;1.8  $\mu$ m, Waters Corporation, USA). Las condiciones para el UPLC fueron las siguientes: la columna y el automuestreador se mantuvieron a 30 y 6 °C, respectivamente, la tasa de flujo a 0.30. mL/min, y el volumen de inyección de 3  $\mu$ L. La fase móvil consistió en (A) 0.1% de ácido fórmico en agua y (B) 0.1 ácido fórmico en acetonitrilo. La separación de compuestos fue en gradiente lineal que consistió de la siguiente manera: 1% B (0-3 min), 1 to 25 % B (3-19 min), 25 % B (19-20 min), 25-100 % B (20-20.10 min), 100 % B (20.10-21.10 min), 100-1 % (21.10-21.20 min) and 1 % B (21.20-24 min).

El análisis de espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas Waters Synapt G1 Q-TOF (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una fuente ionizadora electrospray (ESI) en ion modo positivo y negativo. Las condiciones para el ion modo positivo fueron las siguientes: flujo de gas de desolvatación de 650 L/H a 250 °C. El voltaje de capilar fue de 3.5 kV y los voltajes de cono de muestreo y extracción fueron de 35 y 4.5 V respectivamente. La energía de colisión de trampa y transferencia fueron de 6 eV y 4 eV respectivamente. Para el ion modo negativo se utilizaron las siguientes condiciones: flujo de gas de desolvatación de 500 L/H a temperatura de 300 °C. El voltaje de capilar fue de 2.3 kV y el voltaje de los conos de muestreo y extracción fueron de 35 y 3.5 V respectivamente. La energía de trampa y transferencia fue de 4 eV y 2 eV respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C para ambos iones. El intervalo de

escaneo fue de 0.1 s y el rango de adquisición de 100-1000 *m/z*. Para una determinación precisa de masa se utilizó leucina-encefalina como lock mass, con valor *m/z* 556.2771 para ESI (+) y valor 554.25615 para ESI (-).

### 6.2 Modelo *in vivo*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (N=64) de 200-250 g. que se dividieron aleatoriamente en 10 grupos (*n* = 8). Los animales se mantuvieron en cajas de polipropileno a temperatura ambiente (25 ± 2°C) con alimento y agua *ad libitum*. Los experimentos se sometieron al Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, en apego a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062 ZOO 1995 vigente). Los animales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos organizados de la siguiente manera:



**Control (Intacto):** sin tratamiento

**Diclofenaco (DF):** 75 mg/kg, dosis única, i. p. (Villa-Jaimes et al., 2022)

**Extracto de *O. robusta* (OR):** 800 mg/kg durante 5 días, o. p. (Kim et al., 2012)

**Betanina (Bet):** 25 mg/kg durante 5 días, o. p. (Motawi et al., 2019)

**N-acetilcisteína (NAC):** 50 mg/kg, durante 5 días, i.p. (Nissar et al., 2013)

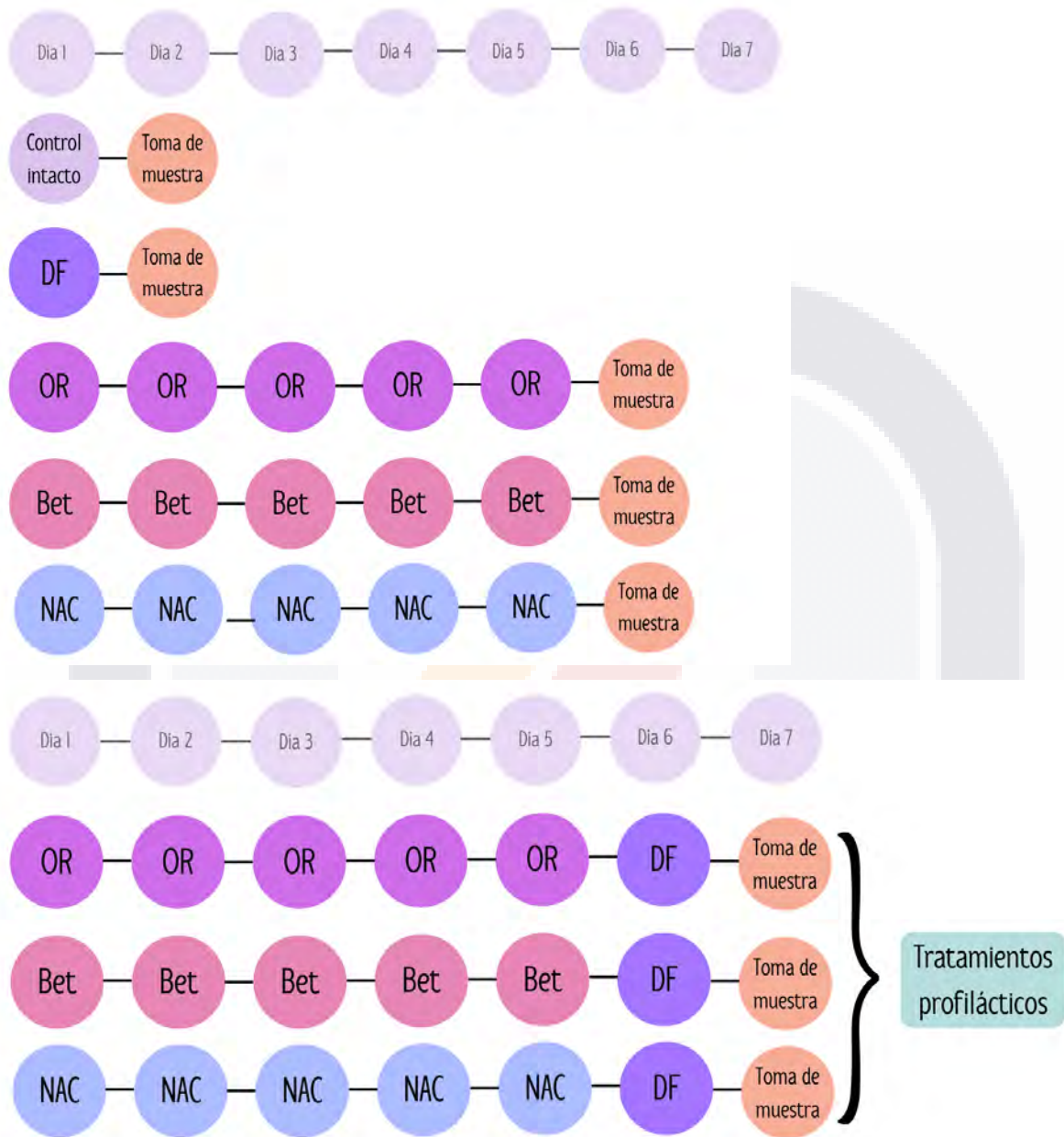
**OR + DF:** 800 mg/kg de OR durante 5 días o. p., administración de 75 mg/kg de DF (dosis única) al sexto día

**Bet + DF:** 25 mg/kg de Bet durante 5 días o. p., administración de 75 mg/kg de DF (dosis única) al sexto día

**NAC + DF:** 50 mg/kg de NAC durante 5 días i.p., administración de 75 mg/kg de DF (dosis única) al sexto día



Línea del tiempo de la administración:



### **6.2.1 Análisis de marcadores de daño hepático**

A todos los individuos se les tomó muestra de sangre y tejido hepático 24 post tratamiento. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y a todos se les tomó 2 mL de sangre vía punción cardiaca, la cual se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min (microcentrífuga Hanil-Micro-12) para separar el suero, el cual se almacenó en tubos para microcentrífuga de 2 mL a -80°C hasta su análisis. La evaluación de daño hepático se realizó a través de la medición de los niveles séricos de las enzimas aminotransferasas aspartato aminotransferasa (ALT) y alanino aminotrasferasa (AST) mediante química sanguínea seca en el equipo VITROS® 5600 Ortho Clinical Diagnostics. Todos los animales fueron perfundidos in situ con ayuda de una bomba de infusión (Fisher Scientific, KD Scientific 789200) con solución de lavado que contiene NaCl al 0.9%, procaína al 0.5% y heparina al 0.1%.

### **6.2.2 Análisis histopatológico**

De cada grupo experimental, 4 animales se fijaron in situ con formalina neutra. Se tomó muestra de tejido hepático y se almacenó en frascos que contenían formalina neutra durante 72 horas. El estudio histológico se realizó por inclusión en parafina y las técnicas de tinción hematoxilina y eosina (H&E) y ácido peryódico de Schiff (PAS; Prophet et al., 1992).

### **6.2.3 Análisis molecular y de marcadores de estrés oxidativo**

Para la evaluación molecular y de marcadores de estrés oxidativo, de cada grupo experimental, 4 animales fueron perfundidos únicamente con solución de lavado. Una porción del hígado (100 mg aproximadamente) se almacenó en tubos para microcentrífuga de 2 mL que contenía RNA later™ (Invitrogen, Monterrey N. L., México) a -80°C, con la finalidad de preservar la muestra hasta su análisis molecular por RT-PCR. Otra porción de 100 mg de hígado se almacenó a -80 °C para su análisis por Western blot. El resto del hígado se destinó para el análisis de marcadores de estrés oxidativo y se almacenó de igual manera en tubos para microcentrífuga de 2 mL a -80°C.

#### **6.2.3.1 Cuantificación de glutatión reducido (GSH)**

La concentración de glutatión reducido (GSH) se realizó siguiendo las instrucciones del kit 38185 (Sigma Aldrich) el cual se basa en la reacción colorimétrica de DNTB (5'5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)) junto con el sistema de reciclaje enzimático cuya absorción máxima se mide a 412 nm. La concentración se realizó a partir de la siguiente ecuación:  $GSH = (glutatio\acute{n} \text{ total} - GSSG) \times 2$ . Las muestras se leyeron por triplicado y se determinó el ratio GSSG/GSH.

#### **6.2.3.2 Cuantificación de malondialdehído (MDA)**

El malondialdehído es un producto de peroxidación lipídica que es utilizado como marcador de estrés oxidativo. Esta técnica se realizó siguiendo lo descrito por (Uchiyama & Mihara, 1978), con ligeras modificaciones. Se homogenizaron 100 mg de tejido hepático en 1 mL de ácido buffer de fosfatos pH 7.4. Posteriormente se colocaron en tubos para centrífuga 1.5 mL de ácido

fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 1% en ácido clorhídrico (HCl) 0.1N, 0.5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 6% y 200 µL de muestra homogenizada. Se taparon bien los tubos y se llevaron a ebullición por 45 min. Transcurrido el tiempo se dejaron enfriar y se les añadió 2 mL de n-butanol, se mezcló con ayuda de un vórtex y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Una vez centrifugadas las muestras, se separó la fase orgánica y se leyó a 530 nm utilizando n-butanol como blanco. Para determinar la concentración de MDA se siguió la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/100 mg de MDA} = \text{abs de la muestra} \times 1018$$

donde:

Abs: absorbancia de la muestra

1018: factor obtenido del estándar

### 6.2.3.3 Expresión génica relativa

Se evaluó la expresión de genes que codifican para enzimas de defensa antioxidante y la respuesta antioxidante inducible así como de daño y reparación al DNA y muerte celular a partir de la técnica de qPCR. Los datos obtenidos se analizaron mediante el método  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  y se presentaron como veces de inducción con respecto al control.

#### 6.2.3.3.1 Extracción de mRNA

La extracción de mRNA se realizó siguiendo el protocolo de extracción del kit SV Total RNA Isolation System de Promega Z3100. Durante todo el procedimiento se mantuvo la cadena de frío de las muestras. Se homogenizaron 30 mg de tejido hepático en 500 µL de TRIzol®, en seguida, se centrifugó el lisado a 10,000 rpm a 4 °C durante 5 min, se transfirió el sobrenadante a otro tubo con ayuda de micropipeta y se adicionaron 200 µL de etanol al 95%. Se transfirió la muestra a una columna dentro de un tubo de desecho y se centrifugó por 1 min, se descartó el desecho y se agregaron 600 µL de RNA Wash Solution (diluído con etanol) a la columna, se centrifugó por 1 min y se descartó el desecho. Se preparó el mix de incubación “Dnase incubation mix” que que contenía los siguientes reactivos por muestra:

Reactivo	Volumen	Número de preparaciones	Total
Yellow Core Buffer	40 µL		1080 µL
MnCl <sub>2</sub> 0.09 M	5 µL	27	135 µL
Enzima DNasa 1	5 µL		135 µL

Se agregaron 50 µL de Dnase incubation mix recién preparado directamente a la membrana dentro de la columna y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Una vez

transcurrido el tiempo se realizaron los lavados de la membrana añadiendo 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Dnase Stop Solution y se centrifugó por 1 min, se descartaron los desechos y se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Solution, se centrifugó por 1 min y se descartó el desecho, por último se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de RNA Wash Solution y se centrifugó por 2 min, se descartó el desecho. Se volvió a centrifugar la membrana sin reactivo durante 2 min y se transfirió la columna a un tubo de elución, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a la membrana asegurándose de hidratar por completo la superficie de esta, se centrifugó por 1 min. Finalmente se desechó la columna y se transfirieron 30  $\mu\text{L}$  de mRNA a un tubo libre de Rnasas y se almacenó de inmediato a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Con los 20  $\mu\text{L}$  restantes se realizó la cuantificación de mRNA.

#### 6.2.3.3.2 Retrotranscripción

Se realizó la cuantificación de mRNA tomando 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se leyó en un Biodrop (Isogen Life Science, Barcelona, España) ajustando el blanco con agua libre de DNAsas. Se ajustó el volumen de mRNA de todas las muestras a 1  $\mu\text{g}$  y se colocaron en tubos para PCR junto con 1  $\mu\text{L}$  de Primer [Oligo(dT)<sub>15</sub>] y agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen total de 5  $\mu\text{L}$  el cual se incubó a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Inmediatamente se dejó reposar en hielo por al menos 5 min, se centrifugó por 10 s en una microcentrífuga y se almacenó en hielo hasta que se agregó el mix de transcripción reversa, el cual se preparó conforme a la siguiente tabla:

Componente	Volumen por muestra
GoScript™ 5× Reaction Buffer	4 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu\text{L}$
PCR Nucleotide Mix	1 $\mu\text{L}$
Recombimant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.5 $\mu\text{L}$
GoScript™ Reverse Transcriptase	1 $\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	7 $\mu\text{L}$
Volumen final	15 $\mu\text{L}$

Una vez añadido el mix, se colocaron en el termociclador y se programaron ciclos de amplificación de la siguiente manera:

- $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min (alineación de los primers con el templado de mRNA)
- $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h (transcripción inversa de una de RNA en DNA complementario)
- $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min (inactivación de la enzima transcriptasa)

6.2.3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa-cuantitativa (qPCR)

Para realizar la PCR en tiempo real, tanto los oligos como las muestras se diluyeron 1:20 en agua libre de nucleasas para obtener 50 ng de cDNA. Se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (K0221, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para preparar el master mix que por muestra contiene:

Componente	Volumen
SYBR Green	5 µL
Agua libre de nucleasas	2 µL
Oligo Forward	1 µL
Oligo Reverse	1 µL
Muestra diluía	1 µL

La lista de oligos utilizados se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Secuencias de los primers para la qPCR. Todos los primers fueron diseñados usando PRIMERPLUS3 (Cambridge, MA, USA) y blasted en NCBI Nucleotide Database (BETHESDA, MD,USA)

Gen	Secuencia (5' → 3')
<i>Actb</i>	Fw: TGTCACCAACTGGGACGATA
	Rv: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
<i>Sod1</i>	Fw: CGGATGAAGAGAGGCATGTT
	Rv: CACCTTTGCCCAAGTCATCT
<i>Sod2</i>	Fw: CCGAGGAGAAGTACCACGAG
	Rv: GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
<i>Cat</i>	Fw: CACCTGAAGACCCTGACAT
	Rv: CCATTCGCATTAACCAGCTT
<i>Nrf2</i>	Fw: GTCAGCTACTCCCAGGTTGC
	Rv: ATCAGGGGTGGTGAAGACTG
<i>Hmox-1</i>	Fw: GAAGAAGATTGCGCAGAAGG
	Rv: GAAGGCGGTCTTAGCCTCTT
<i>Gclc</i>	Fw: CACTGAGCTGGGAAGAGACC
	Rv: GCCGCCATTCAGTAACAAC



<i>Gadd45</i>	Fw:	TCTGTTGCGAGAACGACATC
	Rv:	TCCCGGCAAAAACAAATAAG
<i>Nqo1</i>	Fw:	CCAATCAGCGCTTGACACTA
	Rv:	ACCACCTCCCATCCTTTCTT

---

En una placa de 96 pozos, se agregaron 10 µL de mix de reacción en cada pocillo (las muestras se montaron por duplicado). Se cubrió la placa con un adhesivo y se fijó por compresión. Se centrifugó para precipitar el contenido al fondo del pozo y se realizó el análisis de qPCR en un equipo StepOne (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

- 50 °C durante 2 min
- 95 °C durante 3 min
- 40 ciclos de:
  - 95 °C durante 45 s y 59 °C durante 35 s para el alimeamiento
  - 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 95 °C durante 15 s para la curva melt

Se obtuvieron los valores  $C_t$  de cada muestra para cada gen, por duplicado. Dichos valores se normalizaron usando el gen constitutivo  $\beta$ -actina y se analizaron por el método  $\Delta\Delta C_t$ , que sigue la ecuación:

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

en donde:

$\Delta C_t$  muestra = valor de la muestra normalizada con el gen constitutivo interno

$\Delta C_t$  referencia = valor de la muestra control normalizada con el gen constitutivo interno

Los reportados se reportaron como expresión génica relativa.

#### **6.2.3.4 Análisis de Western blot**

Se analizó la expresión de la proteína Nrf2 en los grupos experimentales utilizando la técnica de Western blot. Se homogenizaron 50 mg de tejido hepático en buffer RIPA (R0278, Sigma-Aldrich) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (11836153001, Roche) en hielo. Se cuantificó la concentración de proteína mediante el método Bradford utilizando albúmina sérica como estándar. Se separaron 40 µg de proteína extraída mediante electroforesis SDS-PAGE (gel concentrador al 4%, gel separador al 10%) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; #1620177, Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA). Las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con TRIS (TBS) y leche en polvo descremada al 5% durante 2 h a temperatura ambiente. Para la inmunodetección, se cortaron las membranas y se incubaron durante

la noche a 4 °C con el anticuerpo primario, anti-Nrf2 policlonal (PA5-88084; Thermo Fisher Scientific) diluído 1:1000 en leche descremada al 5%-TBS. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron las membranas con TBS 1x y se incubaron con el anticuerpo chivo anti-conejo (PA5-88084) diluído 1:5000 en leche descremada al 5%-TBS por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 2 veces de 15 min y 5 veces de 5 min con TBS-Tween 20. Finalmente, se visualizaron las bandas usando el reactivo Enhanced Chemiluminescence Western blotting (#1705060, Bio-Rad). Para detectar la quimioluminiscencia se utilizó el lector Lycor C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology) y el análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó usando el software ImageJ2 version 2.3.0/1.530. La intensidad de las bandas se normalizó con la proteína constitutiva interna GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich; dilución 1:10,000) y se expresó como expresión relativa protéica.

#### **6.2.3.5 Inmunohistoquímica (IHQ) para casapasa-3 activa**

Para visualizar la presencia de la caspasa-3 activa en el tejido hepático de los grupos experimentales, los cortes de hígado se sometieron al análisis inmunohistoquímico siguiendo el método descrito (Munro, 1971). Los cortes de hígado se colocaron en portaobjetos silanizados. Las secciones de tejido se desparafinizaron en xilol y se rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de etanol hasta agua destilada y se sometieron al desenmascaramiento de epítomos en olla exprés con buffer de citratos 0.1 M pH 6.0. La inactivación de peroxidasa endógenas se realizó con peróxido de hidrógeno al 0.2% en metanol durante 30 min. La permeabilización de las membranas se realizó incubando los tejidos en una solución de PBD-0.2% con Tritón X-100 durante 30 min seguido de la solución de bloqueo que contenía Suero Fetal Bovino al 20% en PBD-0.2%-Tritón X-100 durante 1 h a temperatura ambiente. Enseguida, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario monoclonal para caspasa-3 activa (BSM-33199M, Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo (Suero Fetal Bovino al 3% en PBS-0.2%-Tritón X-100) durante la noche a 4 °C. Después de lavar 3 veces durante 5 min con PBS-0.2 Tritón X100 se incubaron los cortes con 3-3'-diaminobenzidina (DAB, Thermo Fisher) durante 5 min, se lavaron con PBS 1x. Se realizó la contraincubación con hematoxilina (diluída 1:10 en agua destilada) por 5 min se lavó con agua destilada y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Después de la deshidratación, se sometieron los tejidos en dos baños de xilol y se cubrieron con portaobjetos para su observación. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario. Las imágenes se tomaron en un microscopio Leica ICC50W (Leica Microsystems, USA) a 400 aumentos totales (AT) y se procesaron usando el software Leica LAS EZ.

La cuantificación de la caspasa-3 activa se realizó contando el número de células positivas (reacción positiva del citoplasma) y se reportó la media por 1 mm<sup>2</sup>. Además, se evaluó la intensidad del área de reacción por valores de densidad óptica de DAB y reportado como porcentaje de área de reacción. Al menos se evaluaron 18 campos por grupo (1.25 mm<sup>2</sup>).

### 6.3 Análisis estadístico

Se analizó la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se evaluó la significancia estadística con una prueba ANOVA de 1-vía para los datos paramétricos y con una prueba Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos.

Para el análisis del extracto los resultados se presentan como la media de cada determinación ± la desviación estándar (DE). Los resultados *in vivo* se presentan como la media de cada grupo ( $n = 3$  para los marcadores de daño hepático, estrés oxidativo y expresión génica,  $n = 4$  para el análisis de Western blot e IHQ) ± el error estándar de la media (EEM). Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Colecta de frutos, extracto y almacenamiento

Se obtuvieron 17.04 kg de tunas de *O. robusta* (Figura 22), de ellos 10.8 kg se destinaron para la obtención de la porción soluble del jugo que fue 2.391 L, mientras que 6.231 kg se destinaron para la obtención de la porción insoluble (pulpa) que fue 1.340 L. El volumen obtenido se almacenó en alícuotas de 25 mL en tubos falcon oscuros de 50 mL a -80°C. Todas las muestras se liofilizaron y se mantienen a -80°C.



**Figura 22.** Fruto de *O. robusta*. Se muestra el fruto entero. (A) Corte transversal. (B) Se aprecia el límite entre el mesocarpio (pulpa) y pericarpio (cáscara). Colectados en la comunidad Soledad de Abajo, El Llano, Aguascalientes, México.

El contenido de humedad de la muestra del extracto de *O. robusta* fue de 91.82%, el peso de la muestra húmeda extraída fue de 3.1369 g, el contenido de sólidos fue de 8.18% y el factor de sólidos fue de 0.0818 gramo de muestra seca por gramo de muestra húmeda.

### 7.2 Determinación de las propiedades antioxidantes del extracto de OR

Se obtuvo una mayor cantidad de fenoles ( $1330 \pm 1.7$  mg GAE/100 g ms) que de flavonoides ( $1090 \pm 0.9$  mg CATE/100 g ms), como se muestra en la tabla 3. Mientras que el contenido de betalaínas ( $641.1 \pm 12.7$ ) fue mayor para las betacianinas ( $452.2 \pm 9.0$  mg EB/L) que para las betaxantinas ( $188.9 \pm 3.7$  EI/L) (Tabla 3)

**Tabla 3.** Valores de fenoles totales, flavonoides, betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales en el extracto de *O. robusta*.

Extracción con MMA		Extracción con H <sub>2</sub> O		
Fenoles totales (mg EAG/100 g ms)	Flavonoides totales (mg ECAT/100 g ms)	Betacianinas (mg EB/L)	Betaxantinas (mg EI/L)	Betalaínas Totales (mg Betalaínas/L)
$1330 \pm 1.7$	$1090 \pm 0.9$	$452.2 \pm 9.0$	$188.9 \pm 3.7$	$641.1 \pm 12.7$

Los valores representan la media  $\pm$  SD de las tres mediciones  
 EAG – Equivalentes de Ácido Gálico  
 ECAT – Equivalentes de Catequina  
 EB – Equivalentes de Betanina  
 EI – Equivalentes de Indicaxantina  
 ms – muestra seca

La capacidad antioxidante del extracto de OR para eliminar los radicales DPPH y ABTS<sup>•+</sup> fue de  $30.9 \pm 1.3$  y  $102.6 \pm 5.2$   $\mu$ mol TE/g dw, respectivamente, y la capacidad de reducir los iones férricos fue de  $95.8 \pm 7.3$   $\mu$ mol TE/g ms, de acuerdo con el ensayo FRAP (Tabla 4).

**Tabla 4.** Actividad antioxidante del extracto de *O. robusta* determinada por los ensayos DPPH, ABTS<sup>•+</sup> y FRAP.

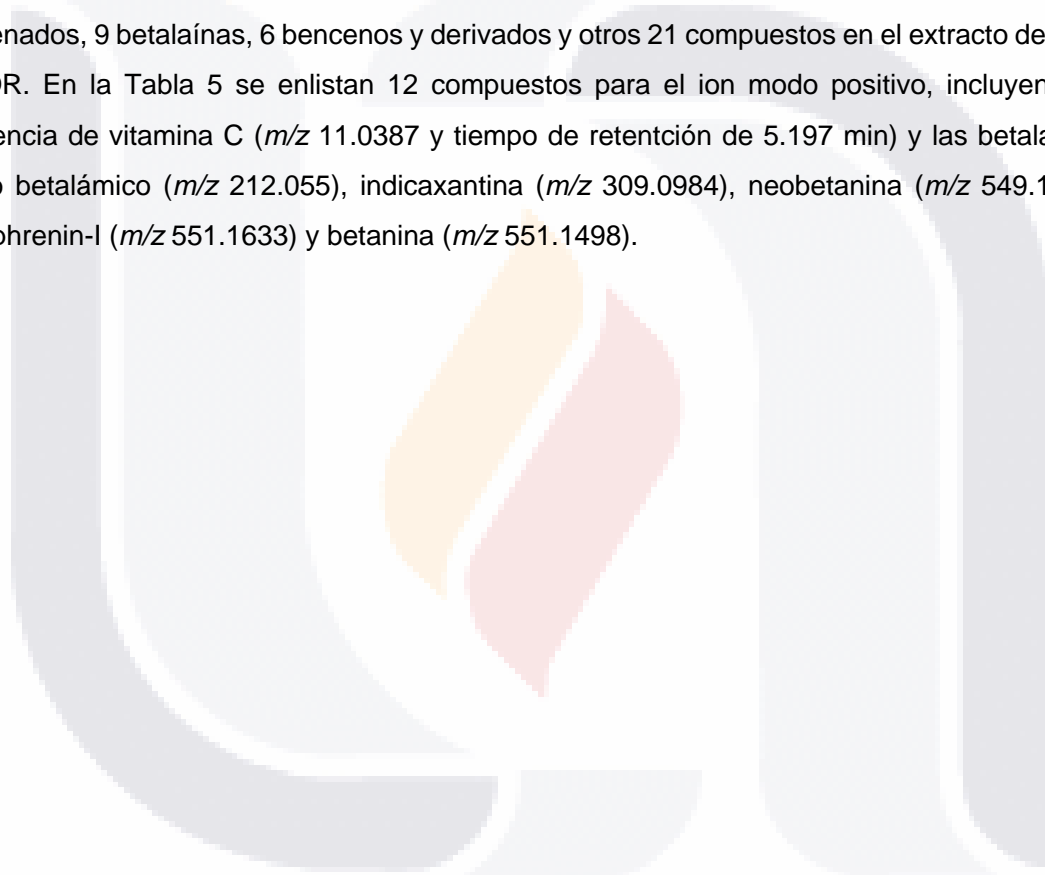
Extracción en MMA ( $\mu$ mol ET/g ms)		
DPPH	ABTS <sup>•+</sup>	FRAP
$30.9 \pm 1.3$	$102.6 \pm 5.2$	$95.8 \pm 7.3$

Los valores representan la media  $\pm$  SD de las tres mediciones  
 ET – Equivalentes Trolox  
 ms – muestra seca

### 7.3 Identificación de los principales compuestos bioactivos del extracto del fruto de *O. robusta*

La figura 23-A muestra el espectro de masas de betanina con un pico  $[M+H]^+$  de  $m/z$  551.19 a un tiempo de retención de 9.10 min, así como el cromatograma del ion extraído (EIC). Para el análisis MS/MS, el precursor del ion molecular de la betanina  $[M+H]^+$  se filtró para obtener el espectro y el ion molecular de  $m/z$  389.13. La figura 23-B muestra el espectro de masas del extracto del fruto de OR con el mismo patrón de fragmentación que el estándar de betanina. Este resultado confirma la presencia de betanina en el extracto del fruto de OR.

Por otra parte, se identificaron 50 compuestos tentativos, incluyendo 15 compuestos organo-oxigenados, 9 betalaínas, 6 bencenos y derivados y otros 21 compuestos en el extracto del fruto de OR. En la Tabla 5 se enlistan 12 compuestos para el ion modo positivo, incluyendo la presencia de vitamina C ( $m/z$  11.0387 y tiempo de retención de 5.197 min) y las betalaínas: ácido betalámico ( $m/z$  212.055), indicaxantina ( $m/z$  309.0984), neobetanina ( $m/z$  549.1382), gomphrenin-I ( $m/z$  551.1633) y betanina ( $m/z$  551.1498).







<b>Oxanes</b>				
1,5-Anhydro-D-fructose	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	M+H-H <sub>2</sub> O	145.0488	0.919
<b>Cinnamic acids and derivatives</b>				
Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	M+H-H <sub>2</sub> O	131.0495	14.037
<b>Phenylpropanoic acids</b>				
Hydrocinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	M+H-H <sub>2</sub> O	133.0641	16.460
<b>Benzene and derivatives</b>				
3,4-O-Dimethylgallic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	M+NH <sub>4</sub>	216.0867	5.119
<b>Indanes</b>				
1-Indanone	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	M+H	133.0634	11.692
<b>Vitamins</b>				
Vitamin C	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	M+H	177.0397	5.197
<b>Carboxylic acids and derivatives</b>				
Betaine	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	M+H	118.0821	0.919
<b>Betalains</b>				
Betalamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	M+H	212.055	1.048
Indicaxanthin	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	M+H	309.0984	8.830
Neobetanin	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	M+H	549.1382	11.613
Gomphrenin-I	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	M+H	551.1633	10.764
Betanin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	M+H	551.1498	9.887

En la tabla 6 se enlistan 22 compuestos para el ion modo negativo incluyendo fenoles como alcohol 5-hydroxyconiferil ( $m/z$  195.382), flavonoides como hesperetina 5-O-glucósido ( $m/z$  463.1337) y betalaínas como vulgaxantina I ( $m/z$  384.1014). En los anexos se enlistan compuestos con posible actividad biológica que aún no han sido explorados.

**Tabla 6.** Compuestos con actividad biológica identificados en el extracto de *O. robusta* en el ion modo negativo

Compuesto	Fórmula	Aducto	$m/z$	Tiempo de retención (min)
<b>Lactones</b>				
D-Glucaro-1,4-lactone	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	M-H	191.0223	1.616
<b>Cinnamic acids and derivatives</b>				
1-O-Sinapoylglucose	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	M-H	385.1205	11.743
<b>Benzene and derivatives</b>				
Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	M-H	167.0382	7.284
2-O-Galloyl-1,4-galactarolactone	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	M+K-2H	380.9824	21.898

**Carboxylic acids and derivatives**

2-O-Caffeoylhydroxycitric acid	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>11</sub>	M+Na-2H	391.0282	1.486
--------------------------------	---	---------	----------	-------

**Organooxygen compounds**

Cis-5-Caffeoylquinic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	M+K-2H	391.0376	1.099
trans-o-Coumaric acid 2-glucoside	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	M+H-H <sub>2</sub> O	309.0968	6.176
trans-p-Coumaric acid 4-glucoside	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	M+H-H <sub>2</sub> O	309.0969	6.176
6-Caffeoylsucrose	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	M-H	503.138	7.902
Gentiobiosyl 2-methyl-6-oxo-2E,4E-heptadienoate	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	M-H	477.159	9.398
Glucocaffeic acid	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	M-H	341.0926	10.455

**Coumarins and derivatives**

Rutaretin 9-rutinoside	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	M+FA-H	615.202	6.665
------------------------	---	--------	---------	-------

**Fatty acyls**

1-Hexanol arabinosylglucoside	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	M+Na-2H	417.171	7.902
-------------------------------	---	---------	---------	-------

**Flavonoids**

Hesperetin 5-O-glucoside	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	M-H	463.1337	9.038
--------------------------	---	-----	----------	-------

**Phenol lipids**

Caryoptosidic acid	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	M-H <sub>2</sub> O-H	373.119	9.578
Hydroxyisonobilin	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	M-H	361.1717	17.079

**Furanoid lignans**

Divanillyltetrahydrofuran ferulate	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	M+FA-H	565.197	16.022
------------------------------------	--	--------	---------	--------

**Phenols**

5-Hydroxyconiferyl alcohol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	M-H	195.0701	16.382
----------------------------	--	-----	----------	--------

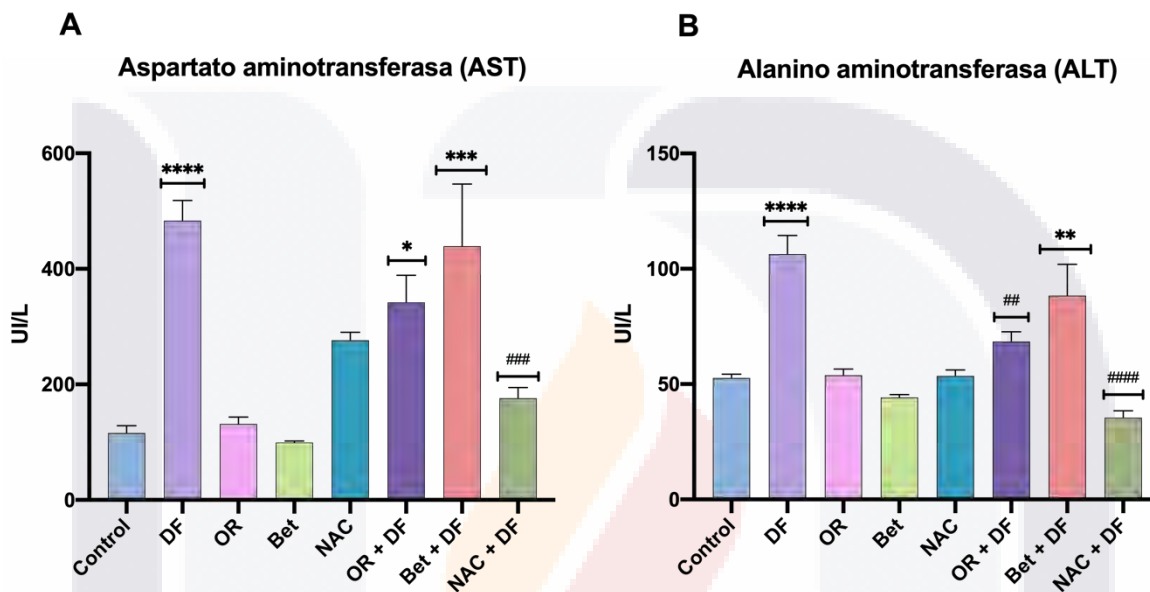
**Betalains**

Betalamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	2M-H	211.0525	4.321
Vulgaxanthin I	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	M+FA-H	384.1014	6.744
Betanin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	2M-H	1099.287	7.852
Betalamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	M-H <sub>2</sub> O-H	192.0344	8.909

**7.4 Análisis de enzimas aminotransferasas (AST y ALT)**

La Figura 24 muestra los valores séricos de los biomarcadores de daño hepático, para AST se observó un aumento significativo en los tratamientos DF (p<0.0001), OR+DF (p<0.05) y Bet+DF (p<0.001) en comparación con el grupo Control. Por otra parte, el grupo que recibió el tratamiento profiláctico de NAC+DF (p<0.0001) mostró una disminución significativa en los

niveles séricos de esta enzima en comparación con el grupo tratado con DF. En los niveles de ALT, los grupos que recibieron los tratamientos con DF ( $p < 0.0001$ ) y Bet+DF ( $p < 0.001$ ) mostraron un aumento significativo en comparación con el control, mientras que los grupos OR+DF ( $p < 0.001$ ) y NAC+DF ( $p < 0.0001$ ) mostraron una disminución significativa en comparación con el grupo DF, lo que indica que hay protección por parte de estos antioxidantes en el daño inducido con este fármaco.



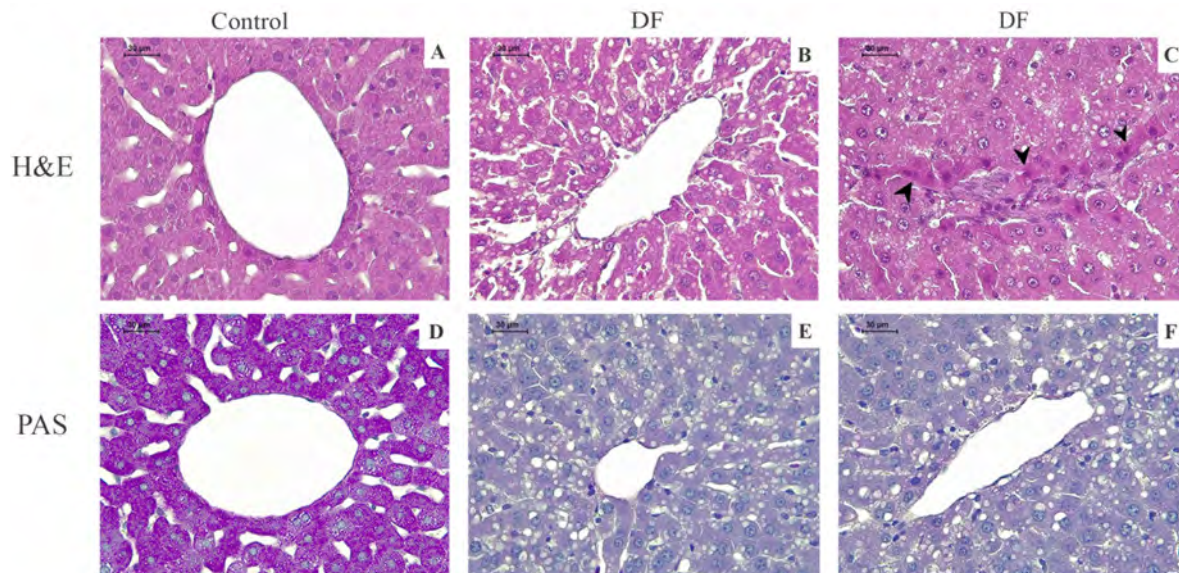
**Figura 24.** Concentraciones séricas de los marcadores de lesión hepática AST (A) y ALT (B). Se observa un incremento significativo en el grupo tratado con DF para ambas enzimas, así como en el grupo que recibió la dosis profiláctica de Bet en comparación con el grupo control. Respecto al grupo tratado profilácticamente con OR, se observa una disminución significativa en comparación con el grupo DF. Los valores se expresan como U/L. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar la media (EEM) ( $n = 6$ ). \* :  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  vs grupo control. #  $p \leq 0.05$ , ###  $p \leq 0.001$ , ####  $p \leq 0.0001$

### 7.5 Análisis histopatológico

La citoarquitectura del parénquima hepático se evaluó a partir de la tinción de rutina hematoxilina-eosina. Los hígados del grupo control (Figura 25-A) mostraron una organización normal del parénquima con los cordones de hepatocitos dispuestos de manera radial a la vénula centrolobulillar, los lobulillos hepáticos con su característica geometría hexagonal y hepatocitos con tamaño y forma regular, con relación núcleo/citoplasma normal.

En cuanto a la intoxicación con DF (Figura 25-B), se observó una marcada vacuolización de los hepatocitos en la zona centrolobulillar, con un aumento en el tamaño que ocluyó en algunas zonas de la luz del sinusoides, provocando una pérdida en la citoarquitectura. También se observó necrosis focalizada (Figura 25-C) en donde los hepatocitos necróticos mostraron un

incremento en la eosinofilia citoplásmica con aspecto hialino y cambios nucleares como disminución en el tamaño y aumento en la basofilia (picnosis).

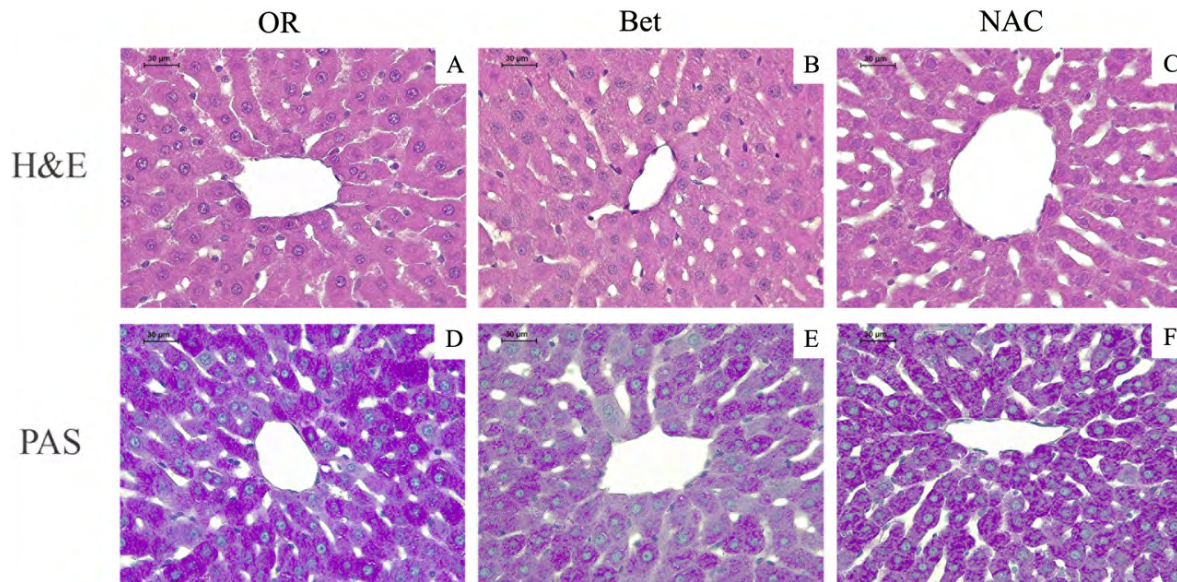


**Figura 25.** Histopatología de los hígados de rata del grupo control y el grupo tratado con DF. Paneles superiores: tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Paneles inferiores: tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Panel A: grupo control mostrando arquitectura hepática normal y hepatocitos normales cerca de la vénula centrolobulillar. Paneles B y C: tratamiento con DF que indujo vacuolización central y focos de necrosis (flechas negras). Panel D: reacción PAS positiva en el grupo control. Paneles E y F: tratamiento con DF mostrando reacción PAS negativa y vacuolización central vacuolización. Magnificación 400x.

Los grupos tratados con OR, Bet y NAC mostraron una organización del parénquima hepático parecido al grupo Control (Figura 26-A, B, C). La administración profiláctica de OR y NAC previno el daño hepático causado por DF al observarse una considerable reducción en la vacuolización y necrosis de hepatocitos (Figura 26-A, D), mientras que el tratamiento profiláctico con OS y NAC (Figura 26-B, C) mostró presencia de algunas células con vacuolización en el área centrolobulillar.

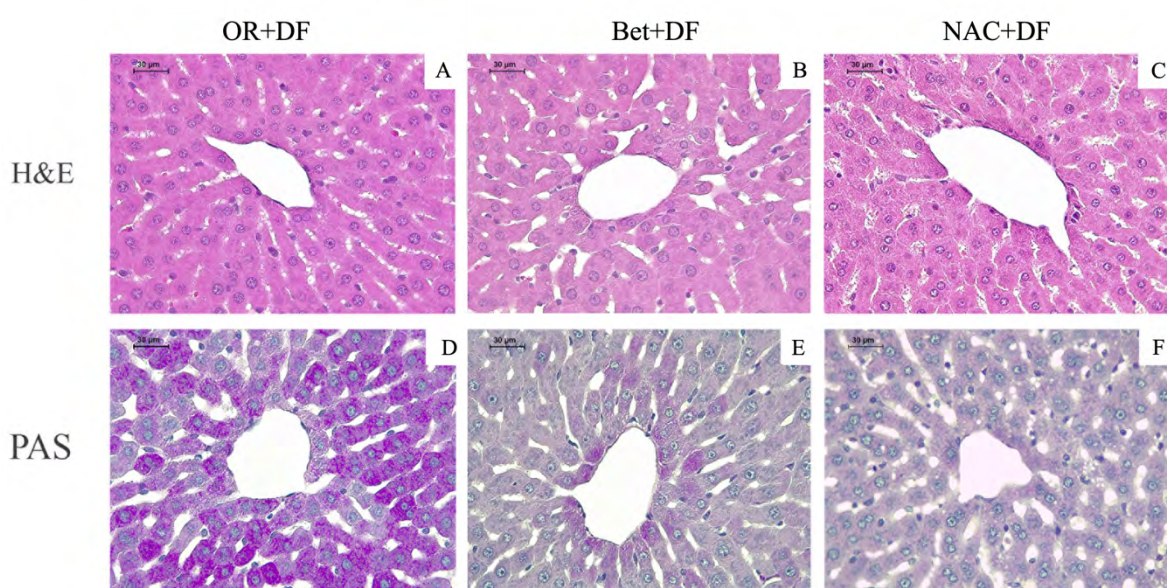
Para evidenciar la presencia de gránulos de glucógeno citoplasmático se realizó la tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS). Los hígados del grupo Control (Figura-25 E) mostraron una citoarquitectura normal del parénquima hepático y tinción PAS positiva de los gránulos de glucógeno. Por otra parte, en los hígados de los individuos que recibieron la dosis aguda de DF (Figura-25 E, F), los hepatocitos no presentaron reacción PAS positiva de glucógeno debido a una pérdida considerable del glucógeno citoplasmático y con los cambios estructurales descritos en la tinción H&E. Los hepatocitos de los hígados tratados con. NAC y los extractos de OR y OS (Figura 26-E, F, H) mostraron reacción PAS positiva y con citoarquitectura parecida al grupo Control. Los hígados tratados con Bet (Figura 26-G) mostraron una ligera disminución en la reactividad a la tinción PAS.





**Figura 26.** Histopatología de tejido hepático de ratas tratadas con OR, Bet y NAC. Paneles superiores: tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Paneles inferiores: tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Paneles A, B, C y D: grupos OR, Bet y NAC, respectivamente, mostrando arquitectura del hígado normal y hepatocitos normales cerca de la véula centrolobulillar, similar al grupo control. Paneles D, E y F: grupos OR, Bet y NAC, respectivamente, mostrando tinción PAS positiva. Magnificación 400x.

Los hígados que recibieron el tratamiento profiláctico del extracto de OR e intoxicados con DF (Figura 27-E), mostraron reacción PAS positiva indicando que no se requirió el uso de las reservas de glucógeno, mientras que los que recibieron el tratamiento profiláctico de OS, B y NAC (Figura 27-F, G, H) mostraron menor reactividad a la tinción con PAS, sin embargo, no se observaron cambios estructurales en ninguno de los grupos, lo que indica que la citoarquitectura se mantuvo íntegra.

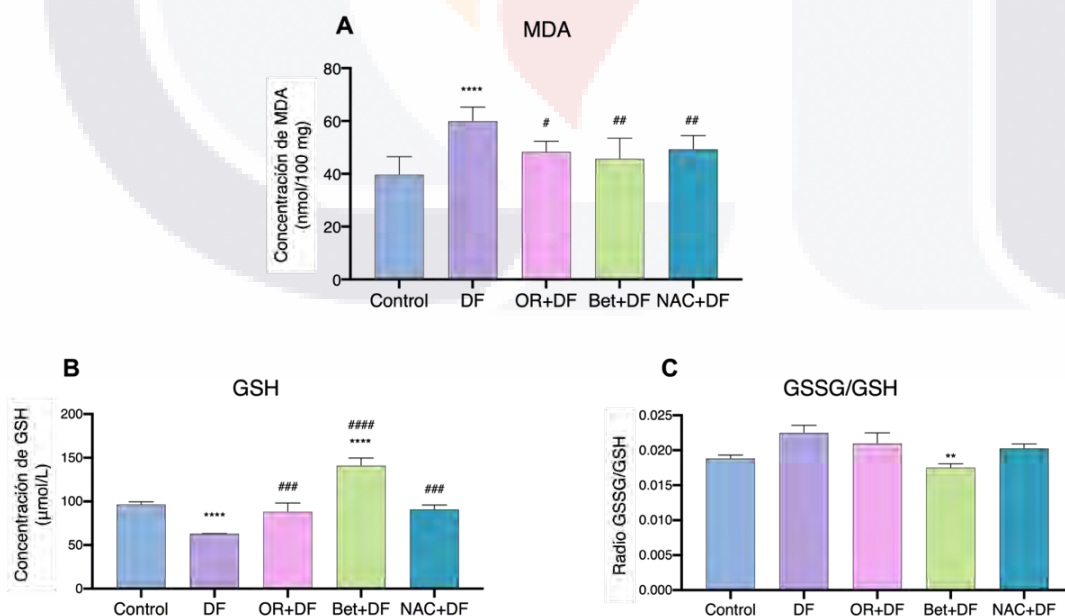


**Figura 27.** Histopatología de tejido hepático de ratas tratadas con OR, Bet y NAC. Paneles superiores: tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Paneles inferiores: tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Paneles A, B y C: tratamiento con DF después de los tratamientos OR, Bet and NAC, respectivamente, mostrando arquitectura normal del hígado y hepatocitos normales cerca de la vena centrolobulillar. Panel D: grupo OR+DF mostrando reacción positiva a la tinción PAS. Paneles E y F: grupos OS+DF, Bet+DF y NAC+DF, respectivamente, mostrando disminución de la tinción PAS comparada con los correspondientes grupos controles. Magnificación 400x.

## 7.6 Biomarcadores de estrés oxidativo

La figura 28-A muestra los biomarcadores de estrés oxidativo en los homogenizados de tejido hepático. Se observó un incremento significativo del 50.85% de niveles de MDA en el grupo tratado con DF ( $59.92 \pm 5.33$  nmol/100 mg) comparado con el grupo control ( $39.72 \pm 6.75$  nmol/100 mg) ( $p < 0.05$ ). El pretratamiento con el extracto de OR, Bet y NAC seguido de la administración de DF redujo significativamente los niveles de MDA (19.43% para OR+DF, 23.79% para Bet+DF y 17.84% para NAC+DF) comparado con DF solo ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, la administración de DF indujo una disminución significativa en la concentración de GSH (Figura 28-B) del 65% ( $62.90 \pm 0.42$   $\mu$ mol/L) comparado con el grupo control ( $96.21 \pm 3.31$   $\mu$ mol/L) ( $p < 0.05$ ), mientras que la administración profiláctica de OR, Bet y NAC mantuvo los niveles de GSH similares al control sin mostrar diferencias significativas comparados con el control, sin embargo, se observó un aumento significativo en comparación con la administración de DF solo ( $p < 0.05$ ) (40.23, 124.2 and 44.25 % respectivamente). También se analizó el ratio de GSSG/GSH (Figura 28-B) con lo que se observó un aumento significativo en el grupo pretratado con Bet ( $141.03 \pm 8.63$   $\mu$ mol/L) en comparación con el grupo tratado con DF.

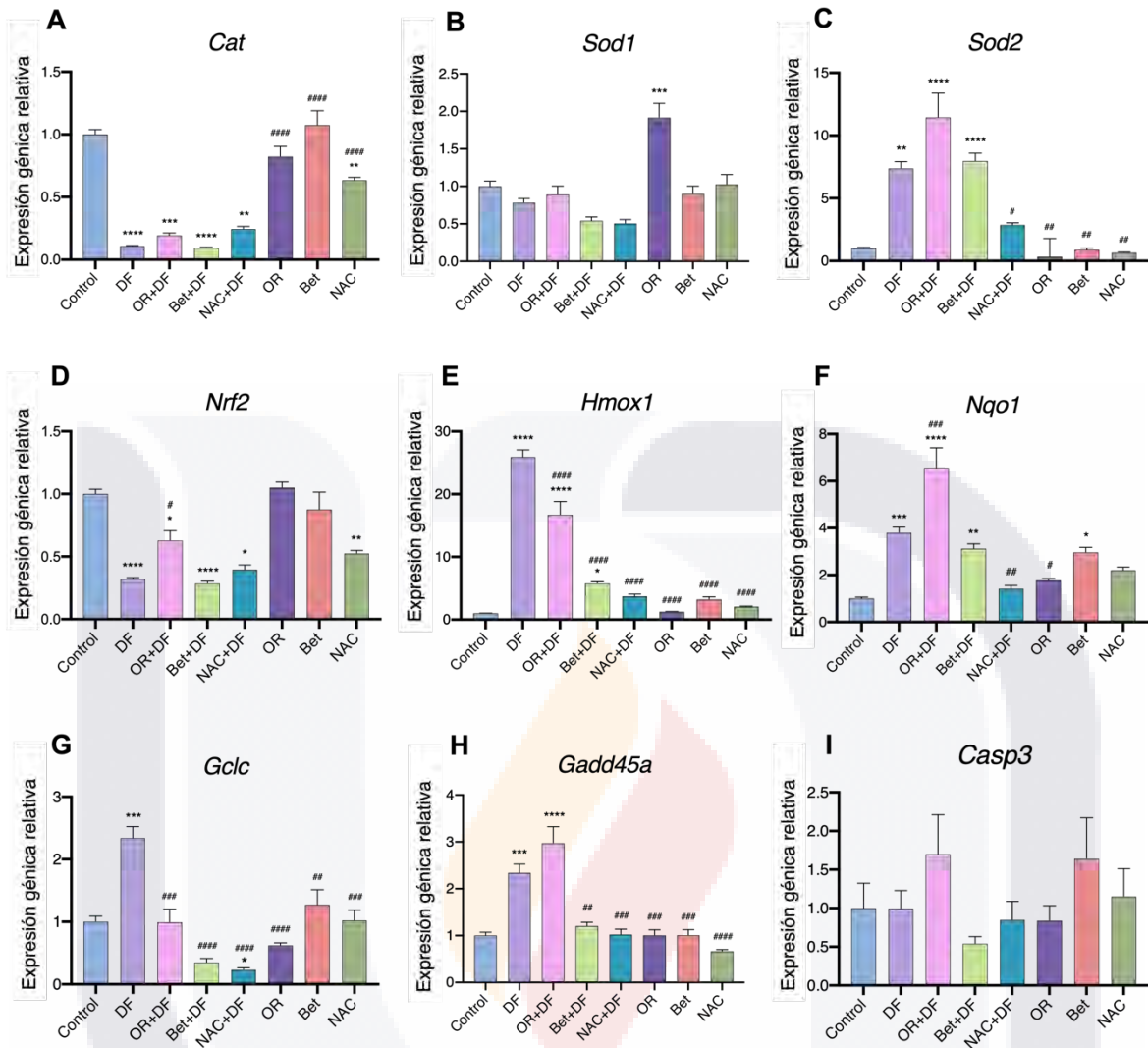




**Figura 28.** Marcadores de estrés oxidativo en hígados de ratas que recibieron una dosis aguda de DF y los pretratamientos con el extracto de OR (OR+DF), betanina (Bet+DF) y N-acetilcisteína (NAC+DF). (A) Concentraciones de MDA, (B) niveles de GSH y (C) radio de GSSG/GSH. Las barras muestran la media ( $n = 3$ )  $\pm$  error estándar de la media (EEM);  $p > 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs grupo control. ##:  $p \leq 0.01$ , ###:  $p \leq 0.001$ , ####:  $p \leq 0.0001$  vs grupo DF.

### **7.7 Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta antioxidante constitutiva e inducible**

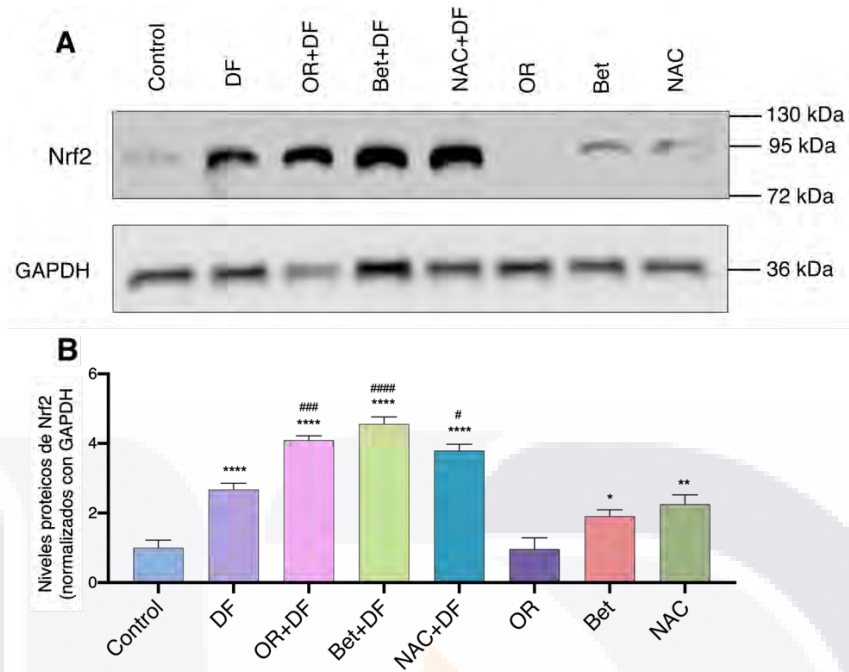
La expresión génica relativa de la catalasa incrementó significativamente en los siguientes grupos (Figura 29-A): DF (0.8 veces;  $p < 0.0001$ ), OR+DF (0.8 veces;  $p < 0.001$ ), Bet+DF (0.9 veces;  $p < 0.0001$ ), NAC+DF (0.7 veces;  $p < 0.01$ ) y NAC (0.3 veces;  $p < 0.01$ ), en comparación con el grupo control. *Sod1* mostró un aumento significativo únicamente en el grupo OR (Figura 29-B) (0.9 veces mayor;  $p < 0.001$ : Control vs OR). La expresión de *Sod2* incrementó significativamente en los siguientes grupos (Figura 29-C): DF (6.3 veces;  $p < 0.01$ : Control vs DF), OR+DF (10.4 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs OR+DF) y Bet+DF (6.9 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs Bet+DF). La expresión de *Nrf2* disminuyó significativamente en los siguientes grupos (Figura 29-D): DF (0.3 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs DF), OR+DF (0.6 veces;  $p < 0.05$ : Control vs OR+DF), Bet+DF (0.7 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs Bet+DF), NAC+DF (0.6 veces;  $p < 0.05$ : Control vs NAC+DF) y NAC (0.4 veces;  $p < 0.01$ : Control vs NAC). La expresión de *hmx1* fue significativamente inducida en los siguientes grupos (Figura 29-E): DF (24.9 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs DF), OR+DF (15.7 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs OR+DF), y Bet +DF (4.7 veces;  $p < 0.05$ : Control vs Bet+DF). La expresión de NAD(P)H dehidrogenasa [quinona] 1 (*Nqo1*) fue significativamente incrementada en los siguientes grupos (Figura 29-F) : DF (2.7 veces;  $p < 0.001$ : Control vs DF), OR+DF (5.5 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs OR+DF), Bet+DF (2 veces;  $p < 0.01$ : Control vs Bet+DF) y Bet (2 veces;  $p < 0.05$ : Control vs Bet). La expresión génica de la subunidad catalítica glutamato-cistein ligasa (*Gclc*) incrementó significativamente únicamente en el grupo tratado con DF (Figura 29-G) (1.3 veces;  $p < 0.001$ : Control vs DF). Finalmente, la expresión del gen inducible por daño al DNA y arresto de crecimiento (*Gadd45a*) incremento significativamente en los siguientes grupos (Figura 29-H): (2.3 veces;  $p < 0.001$ : Control vs DF) and OR+DF (2.9 veces;  $p < 0.0001$ : Control vs OR+DF). No hubo diferencias significativas en la expresión de caspasa-3 (gen *Casp3*).



**Figura 29.** Expresión génica relativa de genes antioxidantes: (A) *Cat*, (B) *Sod1*, (C) *Sod2*, genes detoxicantes: (D) *Nrf2*, (E) *Hmox1*, (F) *Nqo1*, (G) *Gclc*, el gen inducible por daño al DNA: (H) *Gadd45a* y el gen de muerte celular (I): *Casp3* después de los tratamientos y pretratamientos con DF y OR, Bet y NAC en hígados de rata. Las barras muestran la media ( $n = 3$ )  $\pm$  error estándar de la media (EEM);  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs grupo control. #:  $p \leq 0.05$ , ##:  $p \leq 0.01$ , ###:  $p \leq 0.001$ , ####:  $p \leq 0.0001$  vs grupo DF.

### 7.8 Expresión de la proteína Nrf2

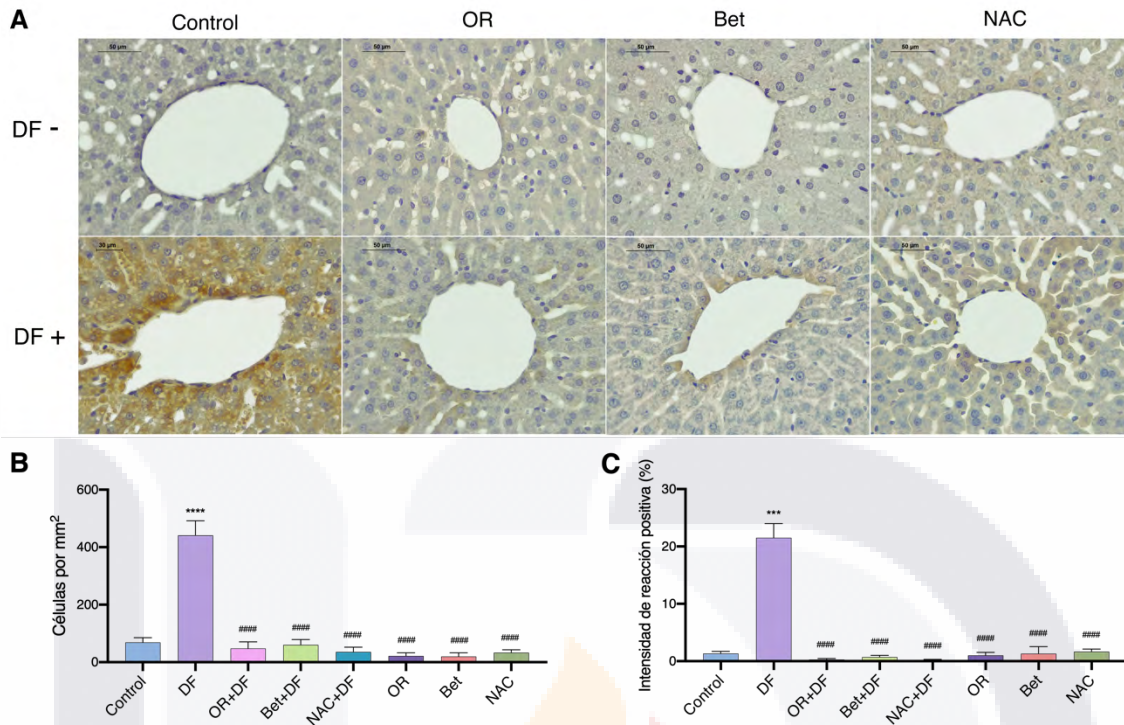
La Figura 30-A muestra la expresión proteica de Nrf2 por Western blot en hígado de ratas de los grupos experimentales. El análisis densitométrico (Figura 30-B) mostró un aumento significativo en la expresión de la proteína Nrf2 en los grupos DF (1.6 veces;  $p < 0.0001$ ), OR+DF (3 veces;  $p < 0.0001$ ), Bet+DF (3.5 veces;  $p < 0.0001$ ), NAC+DF (2.7 veces;  $p < 0.0001$ ), Bet (0.9 veces;  $p < 0.05$ ) y NAC (1.2 veces;  $p < 0.001$ ), comparado con el grupo control. Cabe mencionar que la expresión más alta se observó en los grupos OR+DF (1.4 veces,  $p < 0.001$ ), Bet+DF (1.8 veces,  $p < 0.0001$ ) y NAC+DF (1.1 veces,  $p < 0.05$ ) cuando se comparan con el grupo DF.



**Figura 30.** Análisis de Western blot y cuantificación de la expresión de Nrf2 en hígado de rata después del tratamiento con DF y los tratamientos y pretratamientos con OR, Bet y NAC. (A) Blots de Nrf2 y GAPDH, (B) las gráficas muestran los niveles de expresión proteica relativa de Nrf2 normalizados con la proteína constitutiva GAPDH de las muestras por triplicado. Las barras de las gráficas muestran la media (n=4) ± el error estándar de la media (EEM);  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs grupo control. #:  $p \leq 0.05$ , ###:  $p \leq 0.001$ , ####:  $p \leq 0.0001$  vs grupo DF.

### 7.9 Evaluación de caspasa-3 activa y apoptosis

Se realizó un análisis inmunohistoquímico en donde se observó un aumento significativo en el número de células positivas para caspasa-3 activa (641%) en el grupo que recibió la dosis aguda de diclofenaco, equivalente a 441 células en promedio por  $\text{mm}^2$  ( $p < 0.0001$ ) (Figura 31-A-B), con un incremento en la intensidad de reacción del 20.15% ( $p < 0.0001$ ) (Figura 31-C) con respecto al control (69 células/ $\text{mm}^2$ ). Los grupos tratados profilácticamente con el extracto del fruto de OR, Bet y NAC mostraron un número de células positivas similar al controla con una media de 48, 60 y 36 células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente.



**Figura 31.** Tinción inmunohistoquímica y cuantificación de la caspasa-3 activa en hígado de rata después del tratamiento con DF y los tratamientos y pretratamientos con OR, Bet y NAC. (A) Se observan cortes representativos. 400x. Barra de escala = 30  $\mu$ m. (B) Se tomaron fotografías de 18 a 22 campos (1.25 mm<sup>2</sup>) por grupo y se contó el número de hepatocitos positivos así con la intensidad de área de reacción usando el software NIH ImageJ ver 2.3.0/1.530. Las barras muestran la media (n=4)  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) \*P < 0.05 comparado con el grupo control. p > 0.05, \*\*\*: p  $\leq$  0.001, \*\*\*\*: p  $\leq$  0.0001 vs grupo control. #####: p  $\leq$  0.0001 vs grupo DF.

## 8. DISCUSIÓN

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos de interés que presentan efectos benéficos para la salud. Su actividad biológica depende de su estructura química y se presentan en una variedad de alimentos. El valor nutracéutico de un alimento está en función de la cantidad y tipo de fitoquímicos que presenta (Patil et al., 2009). Se ha reportado en estudios *in vitro* que OR presenta compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico (vitamina C) y betalaínas, siendo las betacianinas las más abundantes (H. A. González-Ponce et al., 2016, 2020; Stintzing et al., 2005b; Sumaya-Martínez et al., 2011b).

En nuestro estudio, la cantidad de compuestos fenólicos obtenida (1330  $\pm$  172.9 mg EAG /100 g ms) en el extracto de OR fue similar a la reportada por Pulido-Hornedo et al. (Pulido-Hornedo et al., 2022), quienes cuantificaron 1118.0 mg EAG/100 g en la pulpa de OR. Estos compuestos se encuentran en mayor concentración que en otras especies de coloración morada: *O. ficus-indica*, 89.2  $\pm$  3.6 mg EGA/100 g (Albano et al., 2015), *O. streptacantha*, 104.66  $\pm$  1.51 mg GAE/100 g (Mabrouki et al., 2015) y *O. dillenii*, 117  $\pm$  10 mg EGA/100 g (Medina et al., 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos que poseen un anillo aromático con al menos un sustituyente hidroxilo (fenol) lo que les confiere características antioxidantes importantes, los tres mecanismos principales de acción derivan de su reacción directa con los radicales libres a partir de 1) la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), 2) la transferencia de un solo electrón (SET) y 3) la quelación de iones metálicos libres como Fe(III). A partir de estas interacciones, un antioxidante puede actuar como *scavenger* cuando el producto final genera a otro radical menos reactivo, o como *quencher* cuando neutraliza por completo al radical generando moléculas estables (Leopoldini et al., 2011).

Los flavonoides son un grupo grande de fenoles que se distribuyen ampliamente en los alimentos vegetales. La concentración de flavonoides ( $1090 \pm 0.864$  mg ECAT/g ms) en el extracto de OR fue mayor a la reportada para la pulpa de OR (793 mg CAE/100 g dw) (Pulido-Hornedo et al., 2022) y a la reportada para *O. ficus indica* coloración roja,  $35.19 \pm 2.08$  mg ECAT/100 g (Bargougui et al., 2019). La estructura básica de estos compuestos es el núcleo de flavano (2-fenil-benzo-c-pirano), un sistema de dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo de pirano que contiene oxígeno (C) el cual se oxida y da lugar a las subclases: flavonas, isoflavononas, flavanoles, flavonoles, y flavanonas (Leopoldini et al., 2011). Estos fitoquímicos son capaces de inhibir la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que genera al radical óxido nítrico (NO•), previniendo la formación de radicales como peroxinitrito que es altamente reactivo con las principales biomoléculas (Shutenko et al., 1999).

Las altas concentraciones de betacianinas ( $452.3 \pm 20$  mg EB/L) (H. A. González-Ponce et al., 2020; Pulido-Hornedo et al., 2022; Stintzing et al., 2005b) y betaxantinas ( $187.3 \pm 8.3$  mg EI/L) (H. A. González-Ponce et al., 2016; Stintzing et al., 2005c) en el extracto de OR coinciden con lo reportado. Las betalaínas son pigmentos que se dividen en betacianinas, responsables de la coloración rojo-púrpura ( $\lambda \approx 435$  nm), y betaxantinas, responsables de la coloración amarilla ( $\lambda \approx 480$  nm) (Esatbeyoglu et al., 2015); son los pigmentos más abundantes en los frutos de coloraciones rojo-púrpura dentro de la familia de las cactáceas. Nuestros resultados confirman que el fruto de OR presenta las concentraciones más altas de betalaínas, principalmente betacianinas, dentro de la familia de las cactáceas (H. A. González-Ponce et al., 2020). Czapski et al. (Czapski, Mikołajczyk-Bator, et al., 2009) observaron que existe una fuerte correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de pigmentos rojos, por lo tanto, el fruto de OR representa una fuente rica en pigmentos antioxidantes. Estos contrastes pueden estar relacionados con las condiciones ambientales (exposición a la luz, al agua, presencia de



hervíboros) en las que crecen y se desarrollan las plantas ya que afecta la síntesis de sus fitoquímicos (Leopoldini et al., 2011).

Debido a que el análisis inicial de los fitoquímicos mostró que las betalainas son los compuestos más abundantes en el extracto de OR, se realizó el análisis molecular por UPLC-QTOF-MS/MS en donde se identificó al ácido betalámico que ha sido reportado en *O. ficus-indica* (García-Cayuela et al., 2019) y *O. stricta* (Castellar et al., 2003), y cuya actividad antioxidante se debe a que reduce dos Fe(III) a Fe(II) (Gandía-Herrera, 2012), evitando la reacción de Fenton y con ello la generación del radical hidroxilo OH<sup>•</sup>. Se identificaron también dos betaxantinas, la indicaxantina que se encuentra en grandes cantidades en *O. ficus-indica* (Butera et al., 2002) y que además de su actividad antioxidante, en estudios *in vitro* ha mostrado que modula la expresión de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 en células endoteliales de la vena umbilical humana (Gentile et al., 2004), previene la formación aterogénica mediante la inhibición de la sobreexpresión de NADPH oxidasa 4 (NOX-4), inhibe de la activación de factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) y evita la apoptosis de células de la línea celular monocítica humana (THP-1) (Tesoriere et al., 2013). Vulgaxantina I se ha encontrado en *O. ficus-Indica* y *B. vulgaris* (remolacha amarilla), ambos pigmentos son responsables de la coloración amarilla (Stintzing et al., 2002a, 2005a).

Las betacianinas se dividen en las tipo betanina, tipo gomfrenina y tipo amaranthina. Gomphrenina I se ha reportado en especies como *Gomphrena globosa* (Cai et al., 2001) y fue reportada por primera vez en *O. robusta* por (Stintzing et al., 2005b), presenta una estructura química muy parecida a la de la betanina y hay estudios que mencionan que su alta capacidad antioxidante se debe a la presencia del grupo -OH en el carbono 5 de la betanidina (estructura general de las betacianinas), a diferencia de la betanina que lo presenta en el C-6 (Cai et al., 2003b; Gandía-Herrero et al., 2010b). Así mismo, el análisis UPLC-QTOF-MS/MS mostró la presencia de betanina en el extracto de OR, lo cual es consistente con lo reportado por (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008b; H. A. González-Ponce et al., 2020; Stintzing et al., 2002b). Otros reportes muestran el mismo patrón de fragmentación (ion padre *m/z* 551.1998 e ion hijo *m/z* 389.1379) para especies como *Beta vulgaris* (da Silva et al., 2019), *Hylocereus polyrhizus* (Taira et al., 2015) y *O. ficus-indica* (García-Cayuela et al., 2019; Slimen et al., 2017). Este pigmento es el que se ha llevado la atención de la mayoría de los estudios, se aisló por primera vez del betabel (*B. vulgaris*) y actualmente se han descrito como efectos antioxidantes: la inhibición de la lipoperoxidación y de LDL (Butera et al., 2002; Kanner et al., 2001a; Tesoriere, Allegra, et al., 2004b; Tesoriere et al., 2009b), así como la inducción de la síntesis de GSH

(Esatbeyoglu et al., 2015). Además, se identificó la presencia de vitamina C, lo que coincide con lo que ha sido reportado para OR (H. A. González-Ponce et al., 2016; Pulido-Hornedo et al., 2022). Recientemente, Pulido-Hornedo et al. (Pulido-Hornedo et al., 2022) cuantificaron las vitaminas C (141.14 mg/100 g) y E (429.9 µg/100 g) en el extracto de OR mediante HPLC-UV. La vitamina C forma parte de una serie de ciclos redox donde participan reductores no enzimáticos (vitamina E, glutatión y NADPH) y enzimáticos (glutaredoxina y glutatión reductasa) que detienen la propagación de los procesos peroxidativos y repara lípidos peroxidados de las membranas biológicas (van Kuijk et al., 1987; Winkler et al., 1994). Por otra parte, neutraliza a ROS como el anión superóxido y el radical hidroxilo (Pehlivan, 2017).

Los ácidos fenólicos son otro grupo de fenoles que poseen una funcionalidad de ácido carboxílico que dependiendo del marco de carbono constitutivo que contienen se dividen en ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzóicos (Robbins, 2003). En nuestro estudio se identificaron ácidos fenólicos como 3,4-O-Dimethylgallic acid, cinnamic acid, 2-O-Galloyl-1,4-galactarolactone y ácido vanílico que son compuestos cuya capacidad antioxidante se debe al número y posición de los grupos hidroxilo fenólico, además de los grupos metoxi y ácido carboxílico (Chen et al., 2020). Asimismo, se identificó 5-Hydroxyconiferyl alcohol que es un intermediario en la síntesis de lignanos, se ha descrito su actividad antioxidante, sin embargo es poco lo que se ha explorado de este grupo (L. Li et al., 2000; Prasad, 1997; Touré & Xueming, 2010). El flavonoide Hesperetin 5-O-glucoside presenta actividad antidiabética gracias a su porción glicosilada en la posición C-5 (Ali et al., 2021).

La actividad antioxidante es uno de los efectos biológicos más descritos de los fitoquímicos, determinada en ensayos *in vitro* en donde se mide su capacidad de extinguir radicales como ABTS<sup>•</sup> y DPPH (Butera et al., 2002; Cai et al., 2003b), así como de reducir iones férricos (Gulcin, 2020). En el presente estudio, para el ensayo ABTS el extracto de OR mostró una mayor capacidad antioxidante ( $102.6 \pm 5.2$  µmol ET/g dw) en comparación con lo reportado para la pulpa de OR,  $62.2 \pm 5.0$  µmol ET/g dw (Pulido-Hornedo et al., 2022), la tuna Siciliana (*O. ficus-indica*) variedad morada,  $4.20 \pm 0.51$  µmol ET/g (Butera et al., 2002) y la tuna española (*O. ficus-indica*),  $6.70 \pm 0.73$  µmol ET/g (Fernández-López et al., 2010). Así mismo en el ensayo DPPH se obtuvieron  $30.09 \pm 1.4$  µmol ET/g dw, mayor a lo reportado para la tuna española variedad morada ( $5.22 \pm 0.89$  µmol ET/g) (Fernández-López et al., 2010). Estos resultados indican que los fitoquímicos del extracto de OR son capaces de transferir electrones y átomos de hidrógeno. En cuanto a la capacidad reductora de iones férricos (FRAP) del extracto de OR ( $95.8 \pm 7.3$  µmol TE/g dw) fue mayor que la pulpa de OR (Pulido-Hornedo et al., 2022),  $62.2 \pm$

5.0  $\mu\text{mol TE/g}$  y menor que el extracto etil etanólico de la mora azul (*Rubus spp.*),  $258.9 \pm 11.69 \mu\text{mol TE/g}$  (Zhen-huaet al., 2012).

Nuestros resultados sugieren que gran parte del efecto nutracéutico del extracto de OR se atribuye al potencial biológico de la diversidad de fitoquímicos presentes en el fruto como pigmentos betaláinicos, ácidos fenólicos y un grupo importante de compuestos bioactivos que no han sido estudiados (Anexo 1).

En nuestro modelo *in vivo*, el extracto de OR protegió al hígado del daño provocado por la dosis alta de DF. La hidroxilación del DF mediada por las enzimas del citocromo P450, CYP2C9 y CYP3A4 generan los metabolitos 4'-OH-DF y 5-OH-DF, respectivamente, que pueden ser oxidados a los intermediarios electrofílicos DF-1'4'-iminoquina y DF-2,5-iminoquinona (Tang, 2003b). También, se generan los compuestos reactivos DF radical catión y DF radical nitróxido que, en conjunto, generan ciclos redox que incrementan ROS, RNS y el estrés oxidativo celular (Boelsterli, 2003b; Syed et al., 2016b; Tang, 2003b). Como resultado, los hepatocitos comienzan a sufrir lesión celular, lo que conlleva a cambios metabólicos que comprometen su omeostasis. La actividad sérica de las enzimas transaminasas (AST y ALT) es frecuentemente usada como indicador de daño hepático (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016). Se considera a estas enzimas como biomarcadores de muerte celular asociada a necrosis debido a que se liberan al torrente sanguíneo tras la presencia de daño en la membrana celular del hepatocito (Daza et al., 2008; Ozer et al., 2008). Los hallazgos encontrados *in vivo* en este estudio confirman el daño hepático causado por DF, dado el aumento significativo en los niveles séricos de AST y ALT en comparación con el grupo control, asociado con un aumento en la producción de moléculas reactivas (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016). Considerando los altos valores que mostró este grupo para AST ( $p < 0.0001$ ), coincide con lo reportado por (Woreta & Alqahtani, 2014), quienes mencionan que las alteraciones donde los niveles de AST sobrepasan los de ALT son típicos de lesión hepática temprana. La administración de Bet mantuvo los niveles de estas enzimas muy parecidos al grupo control, sin embargo, la administración previa a la dosis aguda de DF (grupo Bet+DF) presenta diferencias significativas contra el control, pero no contra DF, a pesar de ello, se observa una reducción en sus niveles y una protección de 24.7% para AST y 84.88% para ALT. Se sabe que los antioxidantes pueden actuar como prooxidantes dependiendo de la dosis administrada, en este trabajo se realizó una curva dosis-respuesta a partir de dosis previas reportadas (Han et al., 2015; Han, Zhang, et al., 2014; Indumathi et al., 2017; Motawi et al., 2020) para establecer la dosis protectora para este modelo, siendo de 25 mg/kg. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo

reportado por (Motawi et al., 2020), quienes evalúan el daño hepático utilizando la misma dosis de Bet en un modelo crónico de DF (10 mg/kg, i.p.), lo que demuestra que es un modelo reproducible.

De manera similar, el grupo tratado profilácticamente con OR (OR+DF) mostró un aumento significativo para AST en comparación con el grupo Control, pero con un porcentaje de protección de 41.44%. En cuanto a ALT, no se observaron diferencias significativas con un porcentaje de protección de 88.27%. Esta enzima se encuentra presente en diversos tejidos, pero se expresa en concentraciones considerablemente mayores en el hígado, por lo que es considerada como una enzima hepatoespecífica, utilizada para evaluar diversas afecciones hepáticas (Helfgott et al., 1990). Por otra parte, observamos que los tratamientos profilácticos de OS+DF y NAC+DF al ser significativamente diferentes contra el grupo tratado con DF, se muestra que ambos antioxidantes son eficaces hepatoprotectores para las enzimas transaminasas. (H. González-Ponce et al., 2016) compararon en un modelo de daño hepático agudo inducido con acetaminofén (APAP) ambas especies de *Opuntia*, y reportan que OR es más efectiva que OS para ese modelo.

Los resultados observados respecto a las enzimas transaminasas coinciden con lo encontrado en la estructura histológica, ya que el grupo tratado con DF mostró en el área centrolobulillar una vacuolización marcada en los hepatocitos (edema celular) que generó una pérdida en la organización cordonal del parénquima hepático, además de la presencia de necrosis focalizada como se ha reportado anteriormente (Aljuhani et al., 2019; Baravalia et al., 2011), asimismo, la pérdida de las reservas del glucógeno hepático observado en la tinción PAS negativa puede relacionarse con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, con la subsecuente depleción en la síntesis de ATP, que altera los procesos dependientes de energía (Boelsterli, 2003a), lo que induce a la célula a obtener energía por la vía glicolítica.

A pesar de que los biomarcadores de lesión hepática mostraron daño en el tratamiento profiláctico con Bet (grupo Bet+DF), es importante señalar que el análisis histopatológico no mostró cambios en la citoarquitectura de los hepatocitos, a pesar de presentarse mínima vacuolización se sabe que este daño es reversible, además, el resultado con la tinción PAS positiva a glucógeno demuestra que hay un efecto protector en la intoxicación con DF. Estas discrepancias pueden explicarse por las interacciones químicas entre ambas sustancias, lo que provocaría que Bet actúe como prooxidante en algunos de los individuos, además de la idiosincrasia propia de cada individuo (Boelsterli, 2003a). Existen diversos reportes que apoyan el potencial protector de Bet en estudios *in vitro* e *in vivo* como en la lipoperoxidación y oxidación

de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kanner et al., 2001b; Livrea & Tesoriere, 2012; Reddy et al., 2005; Tesoriere, Butera, et al., 2004; Tesoriere et al., 2009a), la prevención del daño al DNA por el radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Esatbeyoglu et al., 2014a; Sakihama et al., 2012); en la atenuación en la intoxicación hepática por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en la carpa común (Han, Gao, et al., 2014b), y la protección de la aterogénesis y enfermedades vasculares (Vieira Teixeira da Silva et al., 2019). Respecto al efecto hepatoprotector del extracto de OR, observamos que la estructura del parénquima hepático se mantuvo parecido al control, además de que mantuvo su positividad a la tición de PAS.

Existen otros mecanismos de daño explorados como el daño a lípidos a partir de la abstracción de un átomo de hidrógeno de un grupo acilo graso (-CH<sub>2</sub>-) por parte del radical hidroxilo (OH<sup>\*</sup>), formando radicales lipídicos, radical peroxilo (LOO<sup>\*</sup>) e hidroperóxidos lipídicos que dan lugar a especies químicas como radicales alcoxilo lipídicos y aldehídos como el malondialdehído (MDA) (Islas-Flores et al., 2013). En nuestro modelo, la administración profiláctica con los antioxidantes OR, Bet y NAC disminuyeron la concentración de MDA a un nivel comparable con el grupo control, que indica que previenen la lipoperoxidación provocada por los radicales generados en la hidroxilación del DF. En otros estudio se demostró de igual manera una disminución en los niveles hepáticos de MDA en el pretratamiento con OR en la hepatotoxicidad aguda inducida con APAP (H. A. González-Ponce et al., 2020). El éxito de las betacianinas y la betanina en la protección contra la oxidación lipídica se debe a que son compuestos cationizados que presentan afinidad a las cargas negativas de las membranas celulares, además, la posición orto del -OH (C-5) en su estructura molecular ayuda prevenir que el grupo fenólico interactúe con el radical lipídico (Kanner et al., 2001a).

La primer línea de defensa antioxidante celular está representada por el sistema no enzimático como glutatión y las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa 1 (Cu/ZnSOD) y 2 (MnSOD). El GSH mantiene el balance redox (Minich & Brown, 2019). En condiciones fisiopatológicas provocadas por un incremento en el estrés oxidativo se incrementa la concentración de su forma oxidada (GSSG), en este contexto los compuestos bioactivos del extracto de OR tienen la capacidad de interactuar directamente con GSSG y reducirlo a GSH. Esatbeyoglu et al. en un estudio *in vitro* en la línea celular Huh7 de hepatoma humano, sugieren que la betanina induce la síntesis de GSH mediante la vía de Nrf2 (Esatbeyoglu et al., 2014b), lo que explica las altas concentraciones hepáticas en el grupo pretratado con betanina en nuestro modelo de daño. Este antioxidante juega un papel importante en los ciclos redox para



la reparación de los fosfolípidos de membrana ya que participa como sustrato para que la glutatión peroxidasa (GPx) reduzca radicales hidropéroxido lipídicos a hidroxi-ácidos grasos, así mismo, esta reacción provoca la reducción de la vitamina C que, a su vez, ha reducido a la vitamina E (Forman et al., 2009; van Kuijk et al., 1987).

Las enzimas antioxidantes CAT, SOD1 y SOD2 se expresan de forma constitutiva contrarrestando los ROS generados en los mecanismos metabólicos celulares basales, como los que ocurren durante la oxidación fosforilativa en la mitocondria. En nuestro estudio, el aumento en la expresión génica de la enzima mitocondrial *Sod2* en el grupo tratado con DF muestra que este fármaco puede provocar lesión mitocondrial a partir del aumento en las concentraciones del anión superóxido, generado por los ciclos redox establecidos por sus metabolitos reactivos (Boelsterli, 2003b; Tang, 2003b), así mismo, se demuestra que el extracto de OR protege contra este daño oxidativo al incrementar con mayor significancia la expresión de este mismo gen, lo que coincide con lo observado *in vitro* (Villa-Jaimes et al., 2022). La expresión génica de *Sod2* es regulada por factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2) que modula la respuesta antioxidante inducible. Nrf2 se encuentra de forma inactiva en el citosol unido a Keap1. Keap 1 modula su ubiquitinización para su degradación proteasomal y/o su liberación a través de la interacción con inductores oxidativos y cinasas PKC, MAPK, PI3K-Akt (Jaiswal, 2004). Los inductores de Nrf2 provocan su desacoplamiento de Keap1 mediante diferentes vías, la principal es a partir de la oxidación de los residuos de cisteína de Keap1 por parte de compuestos electrofílicos y otros oxidantes (Robledinos-Antón et al., 2019), como los generados por la biotransformación del DF. A pesar de que se observó una disminución en la expresión génica de Nrf2, nuestros resultados de western blot evidencian su activación postraducciona, esto se debe a que nuestro modelo de daño obedece a un estrés celular agudo. Una vez desacoplado de Keap1, Nrf2 se trasloca al núcleo en donde se heterodimeriza con proteínas sMaf y se une con los motivos de los genes de respuesta a electrofílicos (EpRE) que codifican para proteínas detoxicantes (e.g. *Nqo1*), enzimas antioxidantes (e.g. *Sod2*, *Cat*), enzimas de detoxicación del grupo hemo (e.g. *Hmox1*) y enzimas involucradas en la síntesis de GSH (e.g. *Gclc*) (Ghanim et al., 2021; Jaiswal, 2004).

Los compuestos bioactivos también son capaces de activar y potenciar la defensa antioxidante celular, se ha reportado que la betanina induce la respuesta antioxidante mediada por la vía de Nrf2, activando la expresión de genes que codifican para las proteínas NAD (P) H deshidrogenasa [quinona] 1 (*Nqo1*) y hemooxigenasa 1 HO-1 (gen *Hmox1*) en cultivos celulares de hepatoma HepG2 (Esatbeyoglu et al., 2014b) y en las líneas celulares THLE-2 y en células

HepG2 derivadas de hepatoma (Krajka-Kuźniak et al., 2013b), respectivamente. En otro estudio se extrajeron polisacáridos del cladodio de *O. milpa alta* en cultivos de células- $\beta$  pancreáticas tratadas con aloxano y observaron que estos compuestos protegen contra la apoptosis celular a partir de la disminución del estrés oxidativo mediada por Nrf2 y el gen que codifica para la enzima  $\gamma$ -glutamyl-cisteín sintetasa ( $\gamma$ -GCSc) (W. Li et al., 2020). Anteriormente hemos monitoreado el efecto del extracto de OR en la expresión génica de *Sod2*, *Hmox1* y *Gclc* en contra de la hepatotoxicidad aguda inducida con APAP en un modelo *in vivo* (H. A. González-Ponce et al., 2020). En nuestro modelo, se observó que el extracto de OR regula (upregulates) la expresión de los genes *Sod2*, *Hmox1*, *Nqo1* y *Gadd45a* a partir de la activación postraduccional de Nrf2. Como era de esperarse, la dosis aguda de DF indujo la activación de Nrf2 la cual está mediada por la acumulación de los metabolitos reactivos derivados del fármaco, sin embargo los niveles proteicos de Nrf2 fueron más altos en los tratamientos profilácticos con OR, Bet y NAC, siendo Bet el antioxidante que mostró los niveles de mayor expresión.

Nuestros resultados sobre la expresión génica responden a las demandas metabólicas que sufren los hepatocitos por parte del aumento en el estrés oxidativo causado por la dosis aguda de DF y al tratamiento preventivo por parte de nuestros antioxidantes. *Hmox1* es considerado el gen downstream blanco de Nrf2 por excelencia, la proteína que codifica cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo y su activación se relaciona con efectos antiinflamatorios y otras funciones citoprotectoras (Esatbeyoglu et al., 2014b). En nuestro estudio, el pretratamiento con extracto de OR mostró los niveles de expresión más altos para *Nqo1*, que indica que las iminoquinonas son unos de los principales metabolitos generados a partir de la administración aguda con DF y que el extracto de OR ayuda a amortiguar este estrés celular. Estas iminoquinonas son capaces de dañar proteínas y otras biomoléculas, mientras que la proteína que codifica *Nqo1* se encarga de catalizar la reducción de quinonas a hidroquinonas facilitando su excreción (Krajka-Kuźniak et al., 2013b).

Con la finalidad de elucidar si nuestros antioxidantes inducen la expresión de GSH, se monitoreó *Gclc* cuya proteína participa en la síntesis de GSH, (Franklin et al., 2009), sin embargo no se observaron cambios considerables en su expresión génica. Estos resultados nos indican que el extracto de OR presenta diferentes mecanismos de acción y que los biocomponentes que contiene actúan directamente sobre las especies químicas reactivas y/o restablecen directamente al GSSG a su estado reducido (GSH). Por otra parte, debido a que la administración profiláctica con Bet mostró un aumento significativo en las concentraciones

hepáticas de GSH, se sugiere que induce su síntesis (Esatbeyoglu et al., 2014b), sin embargo aún hacen falta estudios que nos ayuden a comprender este mecanismo.

Nuestros hallazgos confirman que el extracto de OR promueve la detoxificación, protege contra el daño mitocondrial y, en general, presenta actividad citoprotectora. Recientemente reportamos la muerte celular por apoptosis y necrosis en cultivo primario de hepatocitos y observamos que el extracto de OR disminuye la actividad de la caspasa-3 en el mismo modelo de daño (Villa-Jaimes et al., 2022), que coincide con lo encontrado en el presente estudio *in vivo*, a pesar de que no se observaron diferencias en la expresión génica de caspasa-3 en los grupos experimentales, nuestro análisis inmunohistoquímico mostró un incremento significativo en el número de células positivas a caspasa-3 activa en el grupo tratado con DF. Cabe señalar que las proteínas caspasas se encuentran inactivas de forma basal como procaspasas (C.-C. Wu & Bratton, 2012) y el incremento del número de células positivas se debe a la activación de la caspasa-3 por la vía intrínseca debido al daño mitocondrial provocado por los mecanismos prooxidantes del DF. Uno de los mecanismos en que se activa la apoptosis es a partir del daño al DNA, el cual puede ser causado por el radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que es un RNS generado por la reacción del NO con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y que oxida tanto bases nitrogenadas como el esqueleto de azúcar fosfato (Tamura et al., 2012). La célula presenta mecanismos sensores de daño al DNA, uno de ellos es el gen de arresto de crecimiento e inducible por daño al DNA (*GADD45a*), el cual fue activado (upregulated) por la administración profiláctica del extracto de OR. La expresión de *GADD45a* es rápida y dosis dependiente, se ha reportado que actúa reparando al DNA ya que previene la eliminación de 5-metilcitosina del DNA en loci de genes específicos (Chandramouly, 2022; Zhan, 2005).

## **9. CONCLUSIONES**

Observamos que el extracto del fruto de OR es un nutracéutico que contiene una rica variedad de compuestos bioactivos antioxidantes con efecto citoprotector contra el daño mitocondrial y el estrés oxidativo generado por el DF. Tanto la Bet como el extracto de OR, ejercen sus efectos mediante su interacción directa con las especies reactivas, restablecen a GSH y presentan efecto nutrigenómico mediante la modulación de la respuesta antioxidante a cargo de eNrf2. El potencial antioxidante del extracto del fruto de OR y betanina presentaron un comportamiento citoprotector similar a NAC.

## 11. REFERENCIAS:

- Aithal, G. P., Guha, N., Fallowfield, J., Castera, L., & Jackson, A. P. (2012). Biomarkers in Liver Disease: Emerging Methods and Potential Applications. *International Journal of Hepatology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/437508>
- Akbar Hussain, E., Sadiq, Z., & Zia-Ul-Haq, M. (2018). Bioavailability of Betalains. In E. Akbar Hussain, Z. Sadiq, & M. Zia-Ul-Haq (Eds.), *Betalains: Biomolecular Aspects* (pp. 165–183). Springer International Publishing.
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., de Bellis, L., & Blando, F. (2015). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 4(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Ali, M. Y., Jannat, S., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2021). Structural bases for hesperetin derivatives: Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B, kinetics mechanism and molecular docking study. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247433>
- Aljuhani, N., Elkablawy, M. A., Elbadawy, H. M., Alahmadi, A. M., Aloufi, A. M., Farsi, S. H., Alhubayshi, B. S., Alhejaili, S. S., Alhejaili, J. M., & Abdel-Halim, O. B. (2019). Protective effects of Ajwa date extract against tissue damage induced by acute diclofenac toxicity. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 14(6), 553–559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2019.10.002>
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Aniya, Y., & Imaizumi, N. (2011). Mitochondrial glutathione transferases involving a new function for membrane permeability transition pore regulation. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 292–299. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552913>
- 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/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Azzi, A. (2007). Molecular mechanism of  $\alpha$ -tocopherol action. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.013>
- Baravalia, Y., Vaghasiya, Y., & Chanda, S. (2011). Hepatoprotective effect of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers on diclofenac sodium induced liver toxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(5), 342–346. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60100-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60100-4)
- Bargougui, A., Tag, H. M., Bouaziz, M., & Triki, S. (2019). Antimicrobial, antioxidant, total phenols and flavonoids content of four cactus (*Opuntia ficus-indica*) cultivars.

*Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1353–1368.

<https://doi.org/10.13005/bpj/1764>

- Benzie, I. 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/10.1006/abio.1996.0292>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Board, P. G. (1981). Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *American Journal of Human Genetics*, 33(1), 36–43.
- Boelsterli, U. A. (2003a). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3), 307–322. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00368-5](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00368-5)
- Boelsterli, U. A. (2003b). Diclofenac-induced liver injury: A paradigm of idiosyncratic drug toxicity. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 192, Issue 3, pp. 307–322). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00368-5](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00368-5)
- Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M. J., Pfeifer, A., & Castell, J. (1999). Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology*, 58(5), 787–796. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00167-7)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Bruni, C., & Porter, K. R. (1965). The Fine Structure of the Parenchymal Cell of the Normal Rat Liver. *The American Journal of Pathology*, 46(5), 691–755.
- 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/10.1054/plef.2001.0287>
- 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>



- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2001). Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1971–1978. <https://doi.org/10.1021/jf000963h>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003a). Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003b). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 113, pp. 484–490). Academic Press.
- Carr, A. C., & Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(6), 1086–1107. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.6.1086>
- Casaña, Y. C., & Forment, G. R. (2014). *Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. Cytosolic superoxide dismutase and genetic diseases*. 7.
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008a). *Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. 5758–5764.
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008b). 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>
- Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color Properties and Stability of Betacyanins from Opuntia Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2772–2776. <https://doi.org/10.1021/jf021045h>
- Chandramouly, G. (2022). Gadd45 in DNA Demethylation and DNA Repair. In M. R. Zaidi & D. A. Liebermann (Eds.), *Gadd45 Stress Sensor Genes* (pp. 55–67). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-94804-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94804-7_4)
- Chatgililoglu, C., & O'Neill, P. (2001). Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1459–1471. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00132-2)
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>

- Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, *10*(1), 2611. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59451-z>
- Conaghan, P. G. (2012). A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatology International*, *32*(6), 1491–1502. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2263-6>
- Contreras-Zentella, M. L., & Hernández-Muñoz, R. (2016). Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 3529149. <https://doi.org/10.1155/2016/3529149>
- Czapski, J., Mikołajczyk, K., & Kaczmarek, M. (2009). RELATIONSHIP BETWEEN ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED BEET JUICE AND CONTENTS OF ITS BETALAIN PIGMENTS. *59*(2), 4.
- 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.
- da Silva, D. V. T., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., del Aguila, E. M., & Flosi Paschoalin, V. M. (2019). Betanin, a natural food additive: Stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments. *Molecules*, *24*(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030458>
- Davies, N. M., & Anderson, K. E. (1997). Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clinical Pharmacokinetics*, *33*(3), 184–213. <https://doi.org/10.2165/00003088-199733030-00003>
- Davis, J. S., Lee, H. Y., Kim, J., Advani, S. M., Peng, H.-L., Banfield, E., Hawk, E. T., Chang, S., & Frazier-Wood, A. C. (2017). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in US adults: changes over time and by demographic. *Open Heart*, *4*(1), e000550. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000550>
- Daza, E., Juan, E. F., Mejía, I. A. M., & Mejía, M. (2008). *Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico*.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12 - Phenolic Compounds. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 253–271). Woodhead Publishing.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, *324*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj3240001>

Diplock, A. T. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1 Suppl), 189S-193S.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/53.1.189Sb>

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement<sup>1, 2</sup> This article is part of a series of reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. <sup>2</sup>Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00826-2)

Doubova, S. V., Mino-León, D., Torres-Arreola, L. del P., & Romero-Quechol, G. (2007). Conocimiento básico de los riesgos del uso de analgésicos no opioides en pacientes ambulatorios. *Salud Pública de México*, 49(6), 429–436.

Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 421–431). Academic Press.

Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>

Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6). <https://doi.org/10.4321/S0212-71992001000600010>

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui-malki, M., Kharrassi, Y. El, Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., Saïd, M. H., Kebbaj, E., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-malki, M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, 19(9), 14879–14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>

Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., & Rimbach, G. (2014a). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 73, 119–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.007>

Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., & Rimbach, G. (2014b). 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/https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.007>

- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2015). Betanin-A food colorant with biological activity. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 59, Issue 1, pp. 36–47). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Escribano, J., Pedreño, M. A., García-Carmona, F., & Muñoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9(3), 124–127. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199805/06\)9:3<124::AID-PCA401>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199805/06)9:3<124::AID-PCA401>3.0.CO;2-0)
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- 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>
- Figueroa, Cares., I., Martínez, Damián, Ma. T., Rodríguez, Pérez, J. E., Colinas, & León, Ma. T. (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (. *Agrociencia*, 44, 764–771.
- Figueroa-Cares, I., Martínez-Damián, M. T., Rodríguez-Pérez, E., Colinas-León, M. T., Valle-Guadarrama, S., Ramírez-Ramírez, S., & Gallegos-Vázquez, C. (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia*, 44(7), 763–771.
- Flores Hernández, A., Peña Valdivia, C., Hernández Montiel, L., Ramírez-Serrano, R., Trejo Calzada, R., Meza Herrera, C., Preciado Rangel, P., & Murillo Amador, B. (2016). Caracterización isoenzimática de cultivares de nopal (*Opuntia* spp.). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(7), 75–89.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Folin, O., & denis, W. (1912a). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 12, 239–243.
- Folin, O., & denis, W. (1912b). Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *Journal of Biological Chemistry*, 12, 245–251.
- Folin, O., & Denis, W. (1915). A COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHENOLS (AND PHENOL DERIVATIVES) IN URINE. *Journal of Biological Chemistry*, 22(2), 305–308.
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issues 1–2, pp. 1–12). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

- Frank, T., Stintzing, F. C., Carle, R., Bitsch, I., Quaas, D., Straß, G., Bitsch, R., & Netzel, M. (2005). Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacological Research*, 52(4), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.04.005>
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 30, Issues 1–2, pp. 86–98). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, 97(3, Supplement 1), S5–S13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90292-5)
- Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44(1), 147–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.001051>
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875–880. <https://doi.org/10.1126/science.210504>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010a). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232(2), 449–460. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1191-0>
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010b). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232(2), 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., Gandía Herrero, F., & Escribano, J. (2011). Flores Fluorescentes. *Investigación y Ciencia*, 415, 50–57.



- García Morales, O. H., Pereira Roche, N., & Flores Sánchez, R. M. (1998). Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 17(3), 190–197.
- García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.11.002>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & D'Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 481–486. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.057>
- Ghanim, B. Y., Ahmad, M. I., Abdallah, Q. M., Qatouseh, L. A., & Qinna, N. A. (2021). Modulation of NRF2/ARE pathway- and cell death-related genes during drug-induced liver injury. *Human and Experimental Toxicology*, 40(12), 2223–2236. <https://doi.org/10.1177/09603271211027947>
- Gillette, J. R. (1963). Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds by Enzymatic Mechanisms. In J. R. Gillette, R. V Heinzelman, J. Szmuszkovicz, H. G. Leemann, K. Stich, M. Thomas, M. Martin-Smith, T. Khatoon, W. Kunz, & E. Jucker (Eds.), *Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques* (pp. 11–73). Birkhäuser.
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87–95. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90011-X)
- Gliszczyńska-Świgło, 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>
- Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Jover, R., & Castell, J. V. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 17(5–6), 675–680. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00105-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00105-X)
- 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).  
<https://doi.org/10.3390/nu8100607>

González-Ponce, H. A., Martínez-Saldaña, M. C., Tepper, P. G., Quax, W. J., Buist-Homan, M., Faber, K. N., & Moshage, H. (2020). Betacyanins, major components in *Opuntia* red-purple fruits, protect against acetaminophen-induced acute liver failure. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109461>

González-Ponce, H., Martínez-Saldaña, M., Rincón-Sánchez, A., Sumaya-Martínez, M., Buist-Homan, M., Faber, K., 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>

González-Stuart, A. E., & Rivera, J. O. (2019). Nutritional and Therapeutic Applications of Prickly Pear Cacti. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, 349–360.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00023-0>

González-Torres, M. C., Bentacourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). *Daño Oxidativo y Antioxidantes*. 25(1), 8.

Grillo, M. P., Knutson, C. G., Sanders, P. E., Waldon, D. J., Hua, F., & Ware, J. A. (2003). STUDIES ON THE CHEMICAL REACTIVITY OF DICLOFENAC ACYL GLUCURONIDE WITH GLUTATHIONE: IDENTIFICATION OF DICLOFENAC- S - ACYL-GLUTATHIONE IN RAT BILE. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(11), 1327–1336. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.11.1327>

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. C. N.-R. . H. 2015. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (Fifth edit). Oxford University Press.

Han, J., Gao, C., Yang, S., Wang, J., & Tan, D. (2014a). *Betanin attenuates carbon tetrachloride ( CCl 4 ) -induced liver injury in common carp ( Cyprinus carpio L .)*. 865–874. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9892-5>

Han, J., Gao, C., Yang, S., Wang, J., & Tan, D. (2014b). Betanin attenuates carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-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., Tan, C., Wang, Y., Yang, S., & Tan, D. (2015). Betanin reduces the accumulation and cross-links of collagen in high-fructose-fed rat heart through inhibiting non-enzymatic glycation. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 37–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.032>

- Han, J., Zhang, Z., Yang, S., Wang, J., Yang, X., & Tan, D. (2014). Betanin attenuates paraquat-induced liver toxicity through a mitochondrial pathway. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, *70*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.038>
- Hassan, F. A., Ismail, A., Abdulhamid, A., & Azlan, A. (2011). Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Bambang (Mangifera pajang Kort.) Peels and Their Free Radical Scavenging Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(17), 9102–9111. <https://doi.org/10.1021/jf201270n>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*(1), 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, *99*(3), 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.057>
- Helfgott, S. M., Sandberg-Cook, J., Zakim, D., & Nestler, J. (1990). Diclofenac-Associated Hepatotoxicity. *JAMA*, *264*(20), 2660–2662. <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03450200068033>
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*, *2017*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>
- Iloldi-Rangel, P., Ciarleglio, M., Sheinvar, L., Linaje, M., Sánchez-Cordero, V., & Sarkar, S. (2012). Opuntia in México: Identifying Priority Areas for Conserving Biodiversity in a Multi-Use Landscape. *PLoS ONE*, *7*(5), e36650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036650>
- Indumathi, D., Sujithra, K., Srinivasan, S., & Vinothkumar, V. (2017). *Protective effect of betanin against streptozotocin - nicotinamide induced liver, kidney and pancreas damage by attenuating lipid byproducts and improving renal biomarkers in Wistar rats*. 11.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *92*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025>
- Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 36, Issue 10, pp. 1199–1207). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>
- Jones, R. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *The American Journal of Medicine*, *110*(1), S4–S7. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00627-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00627-6)

- Kagan, V. E., Serbinova, E. A., Forte, T., Scita, G., & Packer, L. (1992). Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 33(3), 385–397.
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci*, 5(3), 27–28. <https://doi.org/10.1208/ps050325>
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001a). Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001b). Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453–464. <https://doi.org/10.1080/10408690490886683>
- Kaur, G., Thawkar, B., Dubey, S., & Jadhav, P. (2018). Pharmacological potentials of betalains. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(3). <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0063>
- Kh, Z., El-Ashmawy, I. M., & Arabia, S. (2013). *Hepato-Renal and Hematological Effects of Diclofenac Sodium in Rats*.
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Kim, S. H., Jeon, B. J., Kim, D. H., Kim, T. il, Lee, H. K., Han, D. S., Lee, J. H., Kim, T. B., Kim, J. W., & Sung, S. H. (2012). Prickly Pear Cactus (*Opuntia ficus indica* var. *saboten*) Protects Against Stress-Induced Acute Gastric Lesions in Rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(11), 968–973. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2282>
- King, C., Tang, W., Ngui, J., Tephly, T., & Braun, M. (2001). Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 61(1), 49–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.49>
- Korc', D. I., & Martell, M. (1995). *Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal*. 15.
- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., & Baer-Dubowska, W. (2013a). Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *The British Journal of Nutrition*, 110(12), 2138–2149. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001645>

- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., & Baer-Dubowska, W. (2013b). 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/10.1017/S0007114513001645>
- Kretz-Rommel, A., & Boelsterli, U. A. (1993). Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 120(1), 155–161. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1097>
- Kumar, S., Samuel, K., Subramanian, R., Braun, M. P., Stearns, R. A., Chiu, S.-H. L., Evans, D. C., & Baillie, T. A. (2002). Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(3), 969–978. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.038992>
- La, D. K., & Swenberg, J. A. (1996). DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1–3), 129–146. [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90017-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90017-2)
- Leonard, P. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA: Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 40(3), 20–28.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>
- Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T., & Chiang, V. L. (2000). 5-Hydroxyconiferyl Aldehyde Modulates Enzymatic Methylation for Syringyl Monolignol Formation, a New View of Monolignol Biosynthesis in Angiosperms \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6537–6545. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6537>
- Li, W., Lin, K., Zhou, M., Xiong, Q., Li, C., & Ru, Q. (2020). Polysaccharides from *Opuntia milpa alta* alleviate alloxan-induced INS-1 cells apoptosis via reducing oxidative stress and upregulating Nrf2 expression. *Nutrition Research*, 77, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.02.004>
- Lill, J. S., O'Sullivan, T., Bauer, L. A., Horn, J. R., Carithers, R., Strandness, D. E., Lau, H., Chan, K., & Thakker, K. (2000). Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. *Journal of Clinical Pharmacology*, 40(3), 250–257. <https://doi.org/10.1177/00912700022008919>
- Linster, C. L., & Schaffingen, E. Van. (2007). Vitamin C. *The FEBS Journal*, 274(1), 1–22. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x>
- Livrea, M. A., & Tesoriere, L. (2012). Lipoperoxyl Radical Scavenging and Antioxidative Effects of Red Beet Pigments. In B. Neelwarne (Ed.), *Red Beet Biotechnology: Food*



and *Pharmaceutical Applications* (pp. 105–124). Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0_6)

- Loban, A., Kime, R., & Powers, H. (1997). Iron-Binding Antioxidant Potential of Plasma Albumin. *Clinical Science*, 93(5), 445–451. <https://doi.org/10.1042/cs0930445>
- Mabrouki, L., Boutheina, Z., Bendhifi, M., & Borgi, M. A. (2015). *Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of Opuntia streptacantha and Opuntia ficus indica fruits pulp* Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of *Opuntia streptacantha* and *Opuntia ficus indica* fruits pulp.
- Maiorino, M., Conrad, M., & Ursini, F. (2017). GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(1), 61–74. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7115>
- Maki-Díaz, G., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Arévalo-Galarza, M. L., Calderón-Zavala, G., & Anaya-Rosales, S. (2015). Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional. *Agrociencia*, 49(1), 31–51.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., & Maronpot, R. R. (2005). New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 27–34. <https://doi.org/10.1080/01926230590881826>
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959–3970. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernández-Checa, J. C. (2013). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830(5), 3317–3328. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.018>
- Mccord, J., & Fridovich, I. (1969). McCOrd, J. M., and Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem. The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.
- Medina, E. M. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, 103(1), 38–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.064>
- Meister, A. (1988). *Glutathione Metabolism and Its Selective Modification*. 4.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>

- Meunier, L., & Larrey, D. (2019). Drug-Induced Liver Injury: Biomarkers, Requirements, Candidates, and Validation. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1482. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01482>
- Minich, D. M., & Brown, B. I. (2019). A review of dietary (Phyto)nutrients for glutathione support. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11092073>
- Moron, M., Depierre, J., & Mannervik, B. (1979). Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 582(1), 67–78. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(79\)90289-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(79)90289-7)
- Motawi, T. K., Ahmed, S. A., El-Boghdady, N. A., Metwally, N. S., & Nasr, N. N. (2019). Protective effects of betanin against paracetamol and diclofenac induced neurotoxicity and endocrine disruption in rats. *Biomarkers*, 24(7), 645–651. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1642958>
- Motawi, T. K., Ahmed, S. A., El-Boghdady, N. A., Metwally, N. S., & Nasr, N. N. (2020). Impact of betanin against paracetamol and diclofenac induced hepato-renal damage in rats. *Biomarkers*, 25(1), 86–93. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1697365>
- Mueller, D., Müller-Vieira, U., Biemel, K. M., Tascher, G., Nüssler, A. K., & Noor, F. (2012). Biotransformation of diclofenac and effects on the metabolome of primary human hepatocytes upon repeated dose exposure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(5), 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.014>
- Munro, B. H. (1971). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Pathology*, 3(3), 249. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)39410-7](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)39410-7)
- Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(12), 1487–1499.
- Neelwarne, B. (2012). Red Beet Biotechnology. In B. Neelwarne (Ed.), *Red Beet Biotechnology*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0>
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503–515. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.04.016>
- Nishikimi, M., & Yagi, K. (1996). Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Sub-Cellular Biochemistry*, 25, 17–39. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0325-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0325-1_2)
- Nissar, A. U., Farrukh, M. R., Kaiser, P. J., Rafiq, R. A., Afnan, Q., Bhushan, S., Adil, H. S., Subhash, B. C., & Tasduq, S. A. (2013). Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from Allium plants, on experimentally induced hepatic

prefibrogenic events in wistar rat. *Phytomedicine*, 20(10), 828–833.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.03.009>

Nouri, A., Heidarian, E., & Nikoukar, M. (2017). Effects of *N*-acetyl cysteine on oxidative stress and *TNF- $\alpha$*  gene expression in diclofenac-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(8), 561–567.

<https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1334732>

Oa, O., Eo, O., Oi, O., Od, A., & Mab, O. (2018). *Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Carica papaya (Papaw Leaf) and Loranthus bengwensis (Cocoa Mistletoes) against Diclofenac Induced Hepatotoxicity in Rats.*

<https://doi.org/10.21276/ijlssr.2018.4.5.3>

Ortiz, D. G., & Van Der Meer, P. (2007). *UN NUEVO TAXÓN ALÓCTONO NATURALIZADO EN CATALUÑA: OPUNTIA ROBUSTA WENDLAND A new alien taxa naturalized in Catalonia: Opuntia robusta Wendland.* 4.

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194–205.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>

Paiva, S. A. R., & Russell, R. M. (1999).  $\beta$ -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 426–433.

<https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718880>

Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., & Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160.

<https://doi.org/10.1021/jf9000132>

Patrono, C., & Baigent, C. (2017). Coxibs, Traditional NSAIDs, and Cardiovascular Safety Post-PRECISION: What We Thought We Knew Then and What We Think We Know Now. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(2), 238–245.

<https://doi.org/10.1002/cpt.696>

Pedreño, M. A., & Escribano, J. (2000). Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. *Journal of Biological Education*, 35(1), 49–51.

<https://doi.org/10.1080/00219266.2000.9655736>

Pehlivan, F. (2017). *Vitamin C: An Antioxidant Agent.*

<https://doi.org/10.5772/intechopen.69660>

- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Piga, A. (2004). *Piga\_A\_Articolo\_2004\_Cactus. February*, 9–22.
- Pimienta-Barrios, E. (1994). Prickly pear (*Opuntia* spp.): A valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments*, 28(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(05\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(05)80016-3)
- Prasad, K. (1997). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168(1), 117–123. <https://doi.org/10.1023/A:1006847310741>
- Pulido-Hornedo, N. A., Ventura-Juárez, J., Guevara-Lara, F., Antonio González-Ponce, H., Sánchez-Alemán, E., Buist-Homan, M., Moshage, H., & Consolación Martínez-Saldaña, M. (2022). *Hepatoprotective Effect of Opuntia robusta Fruit Biocomponents in a Rat Model of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis*. <https://doi.org/10.3390/plants>
- Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., & Rafieian, M. (2013). Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *Journal of Nephropathology*, 2(2), 152–153. <https://doi.org/10.12860/JNP.2013.26>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 2014, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Ramírez-Ramos, M., Ybarra-Moncada, C., García-Mateos, M. del R., Corrales-García, J., Ybarra-Moncada, C., & Castillo-González, A. M. (2015). COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN VARIEDADES PIGMENTADAS DE TUNA (*Opuntia* sp.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(4), 9.
- Rappaport, A. M. (1958). The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *The Anatomical Record*, 130(4), 673–689. <https://doi.org/10.1002/ar.1091300405>
- Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., & Nair, M. G. (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>
- Reed, D. J. (1990). *Glutathione: Toxicological Implications*. 29.
- Reyes-Agüero, J. A., Rivera, J. R. A., & Flores, J. L. F. (2005). *VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE Opuntia (CACTACEAE) EN RELACIÓN CON SU ...* 12.
- Reynoso, R. C., Giner, T. V., & Gonza, E. (1999). *Safety of a Filtrate of Fermented Garambullo Fruit: Biotransformation and Toxicity Studies*. 37, 825–830.

- Ríos-Quintana, R., & Estrada-Hernández, L. O. (2018). Descripción y cuantificación de riesgos atribuidos a analgésicos antiinflamatorios no esteroideos no selectivos consumidos por la población mexicana. *Medicina interna de México*, 34(2), 173–187. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.2073>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., & Cuadrado, A. (2019). Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/9372182>
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Roemmelt, A. T., Franckenberg, S., Steuer, A. E., & Kraemer, T. (2014). Purple discoloration of the colon found during autopsy: Identification of betanin, its aglycone and metabolites by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Forensic Science International*, 240, e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.016>
- Sakihama, Y., Maeda, M., Hashimoto, M., Tahara, S., & Hashidoko, Y. (2012). 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>
- San-Miguel, A., & Martin-Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106–113.
- Sarkar, U., Ravindra, K. C., Large, E., Young, C. L., Rivera-Burgos, D., Yu, J., Cirit, M., Hughes, D. J., Wishnok, J. S., Lauffenburger, D. A., Griffith, L. G., & Tannenbaum, S. R. (2017). Integrated Assessment of Diclofenac Biotransformation, Pharmacokinetics, and Omics-Based Toxicity in a Three-Dimensional Human Liver-Immunocompetent Coculture System. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(7), 855–866. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.074005>
- Sawicki, T., Topolska, J., Romaszko, E., & Wiczowski, W. (2018). Profile and Content of Betalains in Plasma and Urine of Volunteers after Long-Term Exposure to Fermented Red Beet Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(16), 4155–4163. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00925>



- Saxena, M., Saxena, D. J., & Pradhan, D. A. (2012). *FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS AS ANTIOXIDANTS IN PLANTS AND HUMAN HEALTH*. 5.
- Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1), 7–30. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400049>
- Schüssel, K., & Schulz, M. (2006). Prescribing of COX-2 inhibitors in Germany after safety warnings and market withdrawals. *Die Pharmazie*, 61(10), 878–886.
- Seefeldt, T., Zhao, Y., Chen, W., Raza, A. S., Carlson, L., Herman, J., Stoebner, A., Hanson, S., Foll, R., & Guan, X. (2009). Characterization of a Novel Dithiocarbamate Glutathione Reductase Inhibitor and Its Use as a Tool to Modulate Intracellular Glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2729–2737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802683200>
- Serrano, M. E. D., López, M. L., & Espuñes, T. del R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58–68.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9–10), 916–921. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00177-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00177-x)
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press.
- Skoutakis, V. A., Carter, C. A., Mickle, T. R., Smith, V. H., Arkin, C. R., Alissandratos, J., & Petty, D. E. (1988). Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy*, 22(11), 850–859. <https://doi.org/10.1177/106002808802201102>
- Slimen, I., Mabrouk, M., Hanene, C., Najjar, T., & Abderrabba, M. (2017). LC-MS Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Betanin from Spineless *Opuntia ficus-indica* Fruits. *Cell Biology*, 2017; 5(2): 17-28, 17–28. <https://doi.org/10.11648/j.cb.20170502.12>
- Small, R. E. (1989). Diclofenac sodium. *Clinical Pharmacy*, 8(8), 545–558.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Stierlin, H., Faigle, J. W., Sallmann, A., Küng, W., Richter, W. J., Kriemler, H. P., Alt, K. O., & Winkler, T. (1979). Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 9(10), 601–610. <https://doi.org/10.3109/00498257909042327>

- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & Felker, P. (2005a). 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>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & Felker, P. (2005b). 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>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & Felker, P. (2005c). 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>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002a). Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(8), 2302–2307. <https://doi.org/10.1021/jf011305f>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002b). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(8), 2302–2307. <https://doi.org/10.1021/jf011305f>
- 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. (2011a). 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>
- 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. (2011b). 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>
- Syed, M., Skonberg, C., & Hansen, S. H. (2016a). Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, *31*, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.020>

- Syed, M., Skonberg, C., & Hansen, S. H. (2016b). Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro*, *31*, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.020>
- Taira, J., Tsuchida, E., Katoh, M. C., Uehara, M., & Ogi, T. (2015). Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chemistry*, *166*, 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.102>
- Tamura, R. E., Ferreira De Vasconcellos, J., Sarkar, D., Libermann, T. A., Fisher, P. B., & Zerbini, L. F. (2012). *GADD45 proteins: central players in tumorigenesis*.
- Tan, D., Wang, Y., Bai, B., Yang, X., & Han, J. (2015). Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. *Food and Chemical Toxicology*, *78*, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.018>
- Tang, W. (2003a). The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Current Drug Metabolism*, *4*(4), 319–329. <https://doi.org/10.2174/1389200033489398>
- Tang, W. (2003b). The Metabolism of Diclofenac-Enzymology and Toxicology Perspectives. In *Current Drug Metabolism* (Vol. 4).
- Tejada Cifuentes, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, *3*(3), 177–191.
- Tenenbaum, J. (1999). The Epidemiology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Canadian Journal of Gastroenterology*, *13*(2), 119–122. <https://doi.org/10.1155/1999/361651>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., & Livrea, M. (2004a). Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(4), 941–945. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.4.941>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., & Livrea, M. A. (2004b). *Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans 1-3*. <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/80/4/941/4690400>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2009a). Betacyanins as phenol antioxidants. Chemistry and mechanistic aspects of the lipoperoxyl radical-scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radical Research*, *43*(8), 706–717. <https://doi.org/10.1080/10715760903037681>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2009b). Betacyanins as phenol antioxidants. Chemistry and mechanistic aspects of the lipoperoxyl radical-

scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radical Research*, 43(8), 706–717. <https://doi.org/10.1080/10715760903037681>

Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2013). Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 110(2), 230–240. <https://doi.org/10.1017/S000711451200493X>

Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A. M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 391–395. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.391>

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(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2006.01.003>

Thieme, R., Pai, E. F., Schirmer, R. H., & Schulz, G. E. (1981). Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 152(4), 763–782. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90126-1)

Thöne, K., Kollhorst, B., & Schink, T. (2017). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use and the Risk of Acute Myocardial Infarction in the General German Population: A Nested Case–Control Study. *Drugs - Real World Outcomes*, 4(3), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s40801-017-0113-x>

Tomic, Z., Milijasevic, B., Sabo, A., Dusan, L., Jakovljevic, V., Mikov, M., Majda, S., & Vasovic, V. (2008). Diclofenac and ketoprofen liver toxicity in rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33(4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF03190881>

Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. E. (2008). Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1501–1514. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2057>

Torres, W. H. (2002). *BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS*. 36.

Touré, A., & Xueming, X. (2010). Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 261–269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00105.x>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology: CB*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

- Tucker, J. M., & Townsend, D. M. (2005). Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 59(7), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.06.005>
- 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)
- van Kuijk, F. J. G. M., Sevanian, A., Handelman, G. J., & Dratz, E. A. (1987). A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 31–34. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90014-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90014-4)
- Vieira Teixeira da Silva, D., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., Mere Del Aguila, E., & M. Flosi Paschoalin, V. (2019). Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030458>
- 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>
- Vladimirov, I. A. (1998). [Free radicals and antioxidants]. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 7, 43–51.
- 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(23), 6704–6709. <https://doi.org/10.1021/jf020575a>
- Winkler, B. S., Orselli, S. M., & Rex, T. S. (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(4), 333–349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90019-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90019-1)
- Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E., & Vermoesen, A. (1996). Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. *Toxicologic Pathology*, 24(1), 100–111. <https://doi.org/10.1177/019262339602400114>
- Wisse, E., de Zanger, R. B., Charels, K., van der Smissen, P., & McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology*, 5(4), 683–692. <https://doi.org/10.1002/hep.1840050427>



Woreta, T. A., & Alqahtani, S. A. (2014). Evaluation of Abnormal Liver Tests. *Medical Clinics of North America*, 98(1), 1–16.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.09.005>

Wu, C.-C., & Bratton, S. B. (2012). Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(6), 546–558.

<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4905>

Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492.

<https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>

Zhan, Q. (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vol. 569, Issues 1–2, pp. 133–143).

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.055>





## Biocomponents from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits protect against diclofenac-induced acute liver damage *in vivo* and *in vitro*

Gloria Stephanie Villa-Jaimes<sup>a,1</sup>, Fabio Alejandro Aguilar-Mora<sup>b,1</sup>, Herson Antonio González-Ponce<sup>a,b,1</sup>, Francisco Javier Avelar-González<sup>c</sup>, Ma. Consolación Martínez Saldaña<sup>a</sup>, Manon Buist-Homan<sup>c,d</sup>, Han Moshage<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. Morphology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

<sup>b</sup> Dept. Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands

<sup>c</sup> Dept. Physiology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

<sup>d</sup> Dept. Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Diclofenac  
Hepatocyte  
Apoptosis  
Natural products  
Antioxidants

### ABSTRACT

This study aimed to investigate whether *Opuntia spp.* extracts protect against diclofenac (DF)-induced hepatotoxicity. Rats were pretreated with *Opuntia* extracts, betanin (Bet) and N-acetylcysteine (NAC) followed by a single challenge of diclofenac. Liver tissue was collected for biochemical and histological analysis. Primary rat hepatocytes were treated with diclofenac (400 μmol/L) with and without pretreatment with *Opuntia* extract. Apoptosis was measured by caspase-3 activity and necrosis by Sytox green staining. RNA was isolated, and real-time qPCR was performed to assess mRNA levels of stress and apoptosis-related genes MnSOD (SOD2), GADD45B and P53. ROS production was measured using the fluorescent MitoSOX assay. Results demonstrated that *Opuntia spp.* extracts protect against DF-induced liver toxicity via reducing oxidative stress and the inhibition of P53.

### 1. Introduction

Diclofenac (DF) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) available as an over-the-counter (OTC) drug in most countries. DF inhibits prostaglandin and thromboxane synthesis via inhibition of both isoforms of cyclo-oxygenase (COX-1 and COX-2) (Gan, 2010). NSAIDs like diclofenac, ibuprofen and naproxen are widely used for the relieve of acute and chronic pain due to their relative safety. Elderly people and females are at an increased risk for overconsumption of NSAID (González-Ponce et al., 2020; Heard et al., 2006; Leufkens et al., 1990). The 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS) showed that analgesics

were the most common drugs related to acute overdoses in adult patients (11.0%) (Gummin et al., 2020). Diclofenac overdose can lead to severe hepatic adverse drug reactions (ADRs) and kidney damage (Boelsterli, 2003; Lapeyre-Mestre et al., 2013).

Diclofenac toxicity derives from the uncontrolled accumulation of free radicals resulting from both phase I and phase II metabolism. In phase I metabolism CYP2C9, CYP3A4 and CYP2C8 metabolize diclofenac into 4'-hydroxydiclofenac (4-OH) and 5'-hydroxydiclofenac (5-OH). Both 4-OH and 5-OH are highly reactive. In phase II metabolism, 4-OH and 5-OH are glucuronidated by UGT2B1 (rats) or UGT2B7 (humans) into diclofenac 1-O-β-acyl glucuronide. Finally, in phase III metabolism, metabolites are excreted from the liver by Mrp proteins, mainly Mrp2

**Abbreviations:** ADR, adverse drug reaction; ATP, adenosine triphosphate; AUF, arbitrary units of fluorescence; Bet, betanin; Bet+DF, betanin plus diclofenac; CNG, cyclic nucleotide-gated; CTCF, corrected total cell fluorescence; DF, diclofenac; DILL, drug-induced liver injury; DISC, death-inducing signaling complex; FIC, fold induction vs. control; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HO-1, heme oxygenase-1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NAC, N-acetylcysteine; NAC+DF, N-acetylcysteine plus diclofenac; OR, *Opuntia robusta*; OR+DF, *O. robusta* plus diclofenac; OS, *Opuntia streptacantha*; OS+DF, *O. streptacantha* plus diclofenac; OTC, over the counter; PKA, protein kinase A; MGV, mean gray value; MMP, mitochondrial membrane polarization; MPTP, permeability transition pore; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SOD, Superoxide dismutase; 4-OH, 4'-hydroxydiclofenac; 5-OH, 5'-hydroxydiclofenac.

\* Corresponding author at: University Medical Center Groningen, Dept. Gastroenterology and Hepatology Groningen, Hanzeplein 1 9713 GZ, Groningen, the Netherlands.

E-mail address: [a.j.moshage@umcg.nl](mailto:a.j.moshage@umcg.nl) (H. Moshage).

<sup>1</sup> Authors who contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104960>

Received 19 October 2021; Received in revised form 20 December 2021; Accepted 14 January 2022

Available online 21 January 2022

1756-4646/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

(Boelsterli, 2003; Lapeyre-Mestre et al., 2013). Highly reactive phase I and II metabolites accumulate when GSH and/or NAD(P)H are depleted, causing cell injury and eventually cell death (Boelsterli, 2003). Both 4-OH and 5-OH can induce mitochondrial damage by inducing the mitochondrial membrane permeability transition pore (MPTP) and increasing reactive oxygen species (ROS) generation. Excessive ROS generation leads to the depolarization of the mitochondrial membrane and the inhibition of adenosine triphosphate (ATP) synthesis (Syed et al., 2016), ultimately inducing apoptotic death of hepatocytes (Gan, 2010; Gómez-Lechón et al., 2003).

To counteract excessive ROS and reactive nitrogen species (RNS) production, humans have developed efficient protective antioxidant mechanisms that can be classified into four groups: preventive antioxidants, free radical scavengers, repair antioxidants and adaptive antioxidant agents (Pizzino et al., 2017). Antioxidant defenses are a complex array of enzymatic (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, peroxiredoxins, thioredoxins) and non-enzymatic antioxidants. The latter group can be further sub-divided into endogenous antioxidants like glutathione, melatonin, uric acid, bilirubin and coenzyme Q and exogenous antioxidants such as vitamins A, C and E, carotenoids, flavonoids, betalains and other phenolic compounds (Ighodaro & Akinloye, 2018; Marí et al., 2010; Matés, 2000).

Since ancient times, humans have consumed exogenous antioxidants through natural products such as roots, stems, leaves, flowers, fruits and other products with therapeutic activities (Iso, 2018). Vegetables and fruits play a crucial role in human nutrition as a source of minerals, fibers and vitamins. Besides, they provide phytochemicals with biological activities that prevent cardiovascular, neurological, digestive and metabolic diseases related to oxidative stress (Albuquerque et al., 2020; González-Ponce et al., 2020).

Food derivatives of *Opuntia* spp. plants have been used in traditional medicine to treat acute and chronic diseases related to oxidative stress. *Opuntia* spp. are abundant in America's semiarid regions and Mexico has over 80 species of *Opuntia* spp. cladodes (flattened, photosynthetic shoots) are believed to have hypoglycemic effects (López-Romero et al., 2014). The sweet, edible cactus fruits (cactus pears) are typically consumed as a source of fibers, trace elements, sugars and natural antioxidants such as vitamins and betalains (Coria Cayupán et al., 2011).

Betalains are a group of phytochemical components of roots, flowers and fruits that act as pigments to attract pollinators and protect plants against pathogens and UV light. They are classified into two groups: betacyanins (red-purple) such as betanin (Bet) and betaxanthins (yellow-orange) such as indicaxanthin (Strack et al., 2003). Betacyanins have previously been identified as major components in *Opuntia robusta* (OR) and *Opuntia streptacantha* (OS) fruits (González-Ponce et al., 2020). Betacyanins have an amino group and a phenolic ring that confers their antioxidant properties by acting as a hydrogen donor (amino group, reducing) or electron transfer (phenolic ring, resonance), making them better antioxidants than betaxanthins, which only have the amino group (Kanner et al., 2001). It has been shown that betacyanins are absorbed in the intestine and enter the enterohepatic circulation in humans without modification of their structure (Frank et al., 2005). Furthermore, *in vitro* simulated digestion studies show that betanin maintains its antioxidant activity during gastric digestion (Vieira Teixeira da Silva et al., 2019).

We have previously shown that both OR and OS extracts protect against acetaminophen toxicity. However, *Opuntia* fruit extracts (*Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha*) to treat or prevent diclofenac (DF) intoxication has never been investigated.

Therefore, the present study aimed to investigate whether *Opuntia* fruit extracts protect against diclofenac-induced acute toxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Opuntia*-spp extracts preparation

OR and OS fruits were collected from randomly selected plants in a

semi-arid region of Aguascalientes, México (21°46'55.86" N, 102°6'16.08" O, and 1994 m above sea level). Extracts were obtained from the centrifugation at 5000 rpm for 15 min at 4 °C of the fruit juice, filtered and lyophilized as described previously (González-Ponce et al., 2016). We previously identified the presence of betacyanins as the major biocomponents present in both fruit species, as well as determined the betacyanins content (464.974 ± 10.87 mg of betanin equivalents/L for OR and 148.941 ± 5.49 mg of betanin equivalents/L for OS) (González-Ponce et al., 2020). It is important to remark that the fruit extracts used in the present study are from the same batch used in González-Ponce et al., 2020.

### 2.2. Animals and compliance with requirements for the use of animals

For the *in vivo* experiments adult male Wistar rats (200–230 g) were obtained from the animal facility of Universidad Autónoma de Aguascalientes. For the *in vitro* experiments, specified pathogen-free male adult Wistar rats (200–230 g) were purchased from Charles River Laboratories Inc (Wilmington, MA, USA). All animals were housed in polypropylene cages at room temperature (25 ± 2 °C) with standard bedding, regular cycle (12 h light/12-hour dark) and free access to standard laboratory chow and water. Experiments were approved and performed following the guidelines of the local Committee for Care and Use of laboratory animals of the University of Groningen (permission no. 8073) and Universidad Autónoma de Aguascalientes (permission no. CEADI-UAA-02-2021) as well as Mexican governmental guideline 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).

### 2.3. Rat hepatocyte isolation

Primary rat hepatocytes were isolated using the two-step collagenase perfusion method under anesthesia (isoflurane 5%, followed by 60 mg/kg ketamine (Alfasan, The Netherlands) combined with 0.25 mg/kg medetomidine (Orion Pharma, Finland) as described previously (Moshage et al., 1990). After isolation, hepatocyte viability was assessed using trypan blue and only hepatocyte isolations with viability above 85% were used. Hepatocytes were plated and cultured in collagen-coated (PureCol® Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA, USA) plates in Williams E medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 50 µg/mL gentamicin (Thermo Fisher Scientific), 50 nmol/L dexamethasone (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, the Netherlands), 5% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific) and penicillin, streptomycin and fungizone for 4 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> to allow cell attachment.

### 2.4. Experimental design

#### *In vivo* studies

Male albino Wistar rats were randomly divided into ten groups (n = 10): Control; Diclofenac treated (DF); *Opuntia robusta* treated (OR); *Opuntia streptacantha* treated (OS); Betanin treated (Bet); N-acetylcysteine treated (NAC); *Opuntia robusta* plus diclofenac (OR + DF); *Opuntia streptacantha* plus diclofenac (OS + DF); Betanin plus diclofenac (B + DF) and N-acetylcysteine plus diclofenac (NAC + DF). The doses for the treatments were selected from previously published reports where their hepatoprotective effects were demonstrated. Rats were pretreated with daily oral doses of OR, OS extract (800 mg/kg b.w.) (González-Ponce et al., 2016; González-Ponce et al., 2020; Kim et al., 2012), Bet (25 mg/kg b.w) (Motawi et al., 2020) or NAC (50 mg/kg i.p.) (Nissar et al., 2013) for five days before DF intoxication (75 mg/kg, i.p.). Samples of blood and liver tissue were collected 24 h after DF intoxication for assessment of liver damage markers (n = 6) and histological evaluation (n = 4) (Li et al., 2017). Liver damage was assessed by measurement of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) by dry blood chemistry on the VITROS® 5600 Ortho Clinical Diagnostics

equipment. For histological analysis rats were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused via the portal vein with saline solution (sodium chloride 0.9%), containing 0.5% heparin and 0.1 procaine and fixed *in situ* with neutral formalin (10%). Livers were embedded in paraffin blocks and sections of 5  $\mu\text{m}$  were prepared with a microtome RM2125RT (Leica Biosystems, USA). The liver sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) reagent. Liver tissue images were obtained using ICC50W microscope (Leica Biosystems, USA) and processed using Leica LAS EZ software.

#### *In vitro studies*

Experiments started 4 h after the attachment period. Diclofenac (2-[2,6-dichlorophenyl]amino] benzene acetic acid sodium salt (Sigma-Aldrich Zwijndrecht, the Netherlands) induces apoptotic cell death of hepatocytes (Gan, 2010; Santos-Alves et al., 2014). Diclofenac was used at a concentration of 400  $\mu\text{mol/L}$  and 12 h exposure as described previously (Aguilar Mora et al., 2021). These conditions did not lead to necrotic cell death as assessed by Sytox green staining. *Opuntia* fruit, extract preparation, determination of the fruit's main bioactive compounds, free radical scavenging, chelating activities and the optimal dose were described previously (González-Ponce et al., 2016; González-Ponce et al., 2020). Aliquots (50 mL) of lyophilized fruit juice containing  $6.89 \pm 0.80$  g of OR and  $6.68 \pm 0.63$  g OS were rehydrated with 50 mL of sterile water. A single dose of 125  $\mu\text{L}$  (8% v/v) of OR or OS was added to the culture medium. Experiments with OR and OS were performed in fresh Williams E medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 50  $\mu\text{g/mL}$  gentamycin (Thermo Fisher Scientific), 50 nmol/L dexamethasone (Sigma-Aldrich) and penicillin, streptomycin and fungizone. Samples were randomly labeled to avoid group or treatment identification until after the analysis was completed.

#### 2.5. Caspase-3 enzyme activity assay

Caspase-3 enzyme activity was assayed as described previously (Schoemaker et al., 2002). Fluorescence was quantified using a spectrofluorometer using an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm. The arbitrary fluorescence units were normalized to the control condition and expressed as fold induction vs. control to avoid any unwanted variation source. The results represent at least three independent hepatocyte isolations ( $n = 3$ ) with duplicates for each experimental condition. Mann-Whitney *U* test was used to determine statistical significance ( $n = 6$ ). All samples were included in the analysis.

#### 2.6. Sytox green nuclear staining

Rupture of the plasma membrane distinguishes necrotic from apoptotic cell death. To estimate necrotic cell death in hepatocytes, cells were incubated for 15 min with Sytox Green (Thermo Fisher Scientific®) nucleic acid stain. Sytox Green only penetrates necrotic cells with compromised plasma membranes but does not cross the membrane of viable cells or apoptotic bodies. Hepatocytes exposed to 5 mmol/L hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) for 24 h were used as a positive control for necrosis (Conde de la Rosa et al., 2006). Fluorescent nuclei were visualized in three randomly selected areas from three independent hepatocyte isolations ( $n = 9$ ) for each condition and the images were obtained on a Leica CTR 600 FS fluorescence microscope (Leica Microsystems, Amsterdam, The Netherlands) using a 10X objective.

#### 2.7. RNA isolation and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

According to the manufacturer's instructions, cells were washed with ice-cold PBS and total RNA was isolated with TRI-reagent (Sigma-Aldrich). Reverse transcription (RT) was performed using 2.5  $\mu\text{g}$  of total RNA, 1X RT buffer (500 mmol/L Tris-HCL pH8.3; 500 mmol/L KCl; 30 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mmol/L DTT), 10 mmol/L deoxynucleotides

triphosphate (dNTPs, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO), 10 ng/ $\mu\text{L}$  random nanomers (Sigma Aldrich), 0.6 U/ $\mu\text{L}$  RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 4 U/ $\mu\text{L}$  M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in a final volume of 50  $\mu\text{L}$ . The cDNA synthesis program was 25 °C/10 min, 37 °C/60 min and 95 °C/5 min. Complementary DNA (cDNA) was diluted 20  $\times$  in nuclease-free water. Real-time qPCR was carried out in a QuantStudio 3™ (96-well) PCR System (Thermo Fisher). The assessment of manganese superoxide dismutase (MnSOD; or Superoxide dismutase 2: SOD2), GADD45B and P53 were performed using TaqMan® probes (Thermo Fisher Scientific). For qPCR 2  $\times$  reaction buffer (dNTPs, Hot Gold Star DNA polymerase, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ) (Eurogentec, Maastricht, The Netherlands) and 5  $\mu\text{mol/L}$  of sense and antisense primers (Invitrogen) were used. mRNA levels were normalized to the 18S housekeeping gene and subsequently normalized to the control group's mean expression level. Samples represent at least three independent hepatocyte isolations ( $n = 3$ ). Primer sequences can be found in Supplemental Table (Table S1).

#### 2.8. Determination of mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS)

Mitochondrial superoxide anion generation ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) was detected using the fluorescent MitoSOX probe (Invitrogen). Primary rat hepatocytes ( $4.5 \times 10^5$ ) were seeded on glass coverslips in 12-well plates. After four hours of attachment, cells were treated according to the protocol described above. Three hours after incubation, the cell culture medium was removed, and coverslips were washed three times with PBS. Then cells were incubated in PBS with 200 nmol/L MitoSOX Red for 10 min at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere protected from light. Next, cells were washed three times with a warm buffer. Images were obtained on a Leica CTR 600 FS fluorescence microscope (Leica Microsystems, Amsterdam, the Netherlands) using excitation (EX)/emission, (EM) wavelengths of 460–500/510–580 nm respectively with a 40X objective and at least three areas were randomly imaged using the LAS X software (Leica). The quantification of superoxide anion generation was measured using ImageJ. The quantification was performed by quantifying the intDen and MGv of the red channel to obtain the corrected total cell fluorescence (CTCF), then divided against the background intDen and MGv of each image to avoid image bias. Over-saturated parts of the image were deleted at the time of quantification as they can be a source of artifacts in the interpretation.

$$\text{CTCF} = ((\text{intDen} - \text{Area of the cell}) * (\text{MGV of the background})).$$

Then, CTCF was normalized to the average of CTCF of the control and expressed as:

$$\text{Normalized CTCF} = \text{CTCF} / \text{Average CTCF of the control group}$$

At least three independent experiments using hepatocytes from different isolations were performed.

#### 2.9. Statistical analysis

For *in vivo* experiments, due to the normal distribution of the data (analyzed using the Shapiro-Wilk test), the data were analyzed using a one-way ANOVA test and post-hoc Tukey's multiple comparison test with a confidence level of 95%. Results represent the mean of each group ( $n = 6$ )  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD).

For *in vitro* experiments, results represent at least three independent hepatocyte isolations ( $n = 3$ ). The normality test was done using the Shapiro-Wilk test. Due to the samples' non-normal distribution, statistical significance was analyzed using a two-tailed Mann-Whitney *U* test to compare differences between two groups. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD) unless specified, and the threshold for statistical significance was defined as NS:  $p > 0.05$ , \*:  $p <$



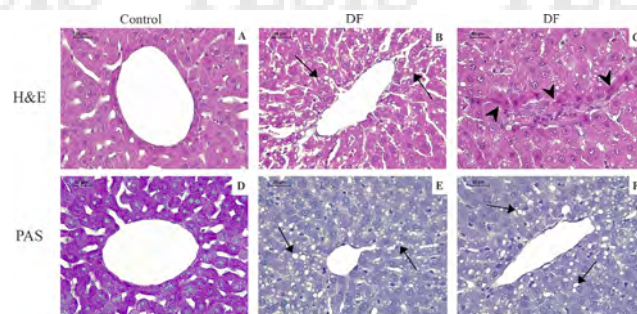
0.05, \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ . Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. *Opuntia* extracts protect against diclofenac-induced liver toxicity

Previously, we have reported that treatment with OR or OS protects against acetaminophen-induced liver toxicity due to OR and OS's antioxidant properties (H. González-Ponce et al., 2018). In the current study, rats were prophylactically treated for five days with OR, OS, Bet or NAC followed by a single DF dose to investigate whether these antioxidants protect against DF-induced acute liver damage. Fig. 1 shows serum values of liver damage biomarkers. DF significantly increased ( $p < 0.0001$ ) the levels of AST ( $584 \pm 112.3$  IU/L) and ALT ( $106.3 \pm 19.9$  IU/L) which represent an increase of 504.2% and 201.9%, respectively, compared to the control group. Values for the control group are  $115.8 \pm 30.9$  IU/L for AST and  $52.7 \pm 3.9$  IU/L for ALT. AST serum levels were similar to controls after treatment with OR, OS, Bet and NAC alone ( $131.5 \pm 28.9$  IU/L,  $107.3 \pm 26.1$  IU/L,  $99.2 \pm 6.9$  IU/L,  $275.8 \pm 33.9$  IU/L respectively) with no significant differences. The same was observed for ALT serum levels ( $53.8 \pm 5.5$  IU/L,  $37.3 \pm 5.4$  IU/L,  $44.2 \pm 3.1$  and  $53.5 \pm 6.6$  IU/L respectively), with no significant differences versus the control group. Regarding the prophylactic administration of OR, OS, Bet and NAC, these treatments all protected against DF-induced liver damage by reducing AST values by 41.4%, 58.7%, 24.8% and 69.9% respectively and ALT values by 88.3%, 92.2%, 84.9% and 93.9% respectively, compared to the DF group. In the group pre-treated with Bet plus DF, the values of AST and ALT showed no significant differences versus the DF group due to the data dispersion.

The architecture of the liver parenchyma was evaluated from routine hematoxylin-eosin stained liver sections. Livers of the control group (Fig. 2 A) showed a normal appearance of the hepatocytes and a normal organization. DF treatment (Fig. 2 B) showed a marked vacuolation of the hepatocytes in the centrilobular area, with an increase in their size that occluded in some areas the sinusoids, causing a loss in the normal architecture. Some hepatocytes showed an increase in hyaline-looking cytoplasmic eosinophilia and nuclear changes such as a decrease in size and increase in basophilia (pynosis). These changes are



**Fig. 2. Liver damage induced by diclofenac.** Histopathology of rat liver tissue. Upper panels: staining with hematoxylin-eosin (H&E). Lower panels: staining with periodic acid-Schiff (PAS). Panel A: Control group showing normal hepatic architecture and normal hepatocytes near the central vein. Panels B and C: DF treatment induces vacuolization in centrilobular hepatocytes (black arrow) and some focal necrosis (arrowheads). Panel D: PAS positive reaction in the Control group. Panels E and F: DF treatment showing PAS negative reaction and central vacuolization. Magnification 400x.

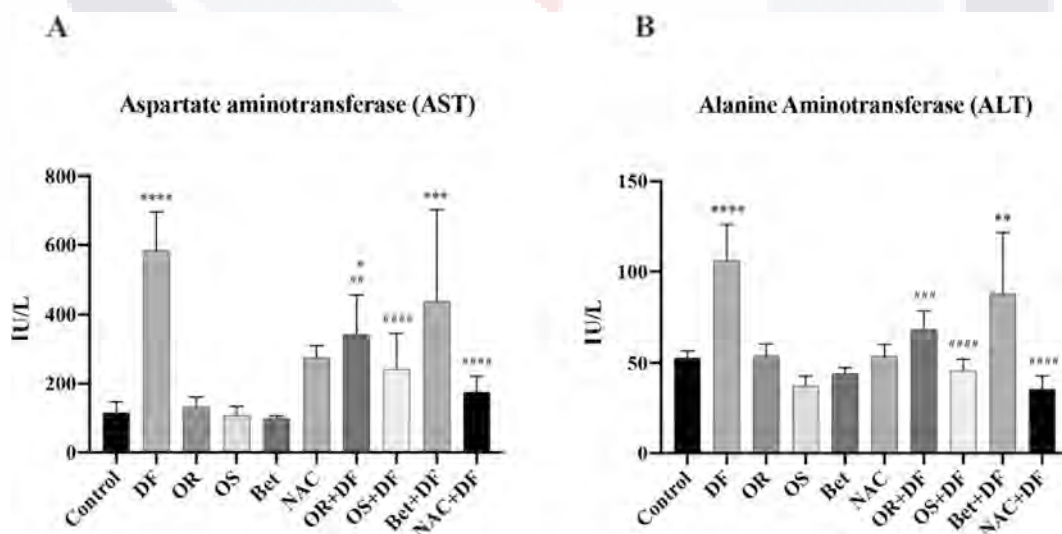
characteristic of liver cell necrosis (Fig. 2 C). To demonstrate the presence of cytoplasmic glycogen, Periodic Acid-Schiff (PAS) staining was performed. Liver of the Control group showed a positive PAS staining while hepatocytes of the DF group (Fig. 2 E, F) were negative for PAS staining due to a considerable loss of cytoplasmic glycogen.

Groups treated with OR, OS, Bet and NAC showed a normal organization of the hepatic parenchyma (Fig. 3 A, B, C, D) and a positive PAS reaction (Fig. 3 E, F, H) with a slight decrease in the group treated with Bet (Fig. 3 G).

Prophylactic administration of OR, OS, Bet and NAC prevented DF-induced liver damage showing a normal hepatic parenchyma with H&E staining (Fig. 3 I, J, K, L) compared to the DF group (Fig. 2 B, C). For PAS staining OR + DF group (Fig. 3 M) showed a positive reaction in contrast to the rest of the prophylactic treatments where a negative PAS reaction was observed.

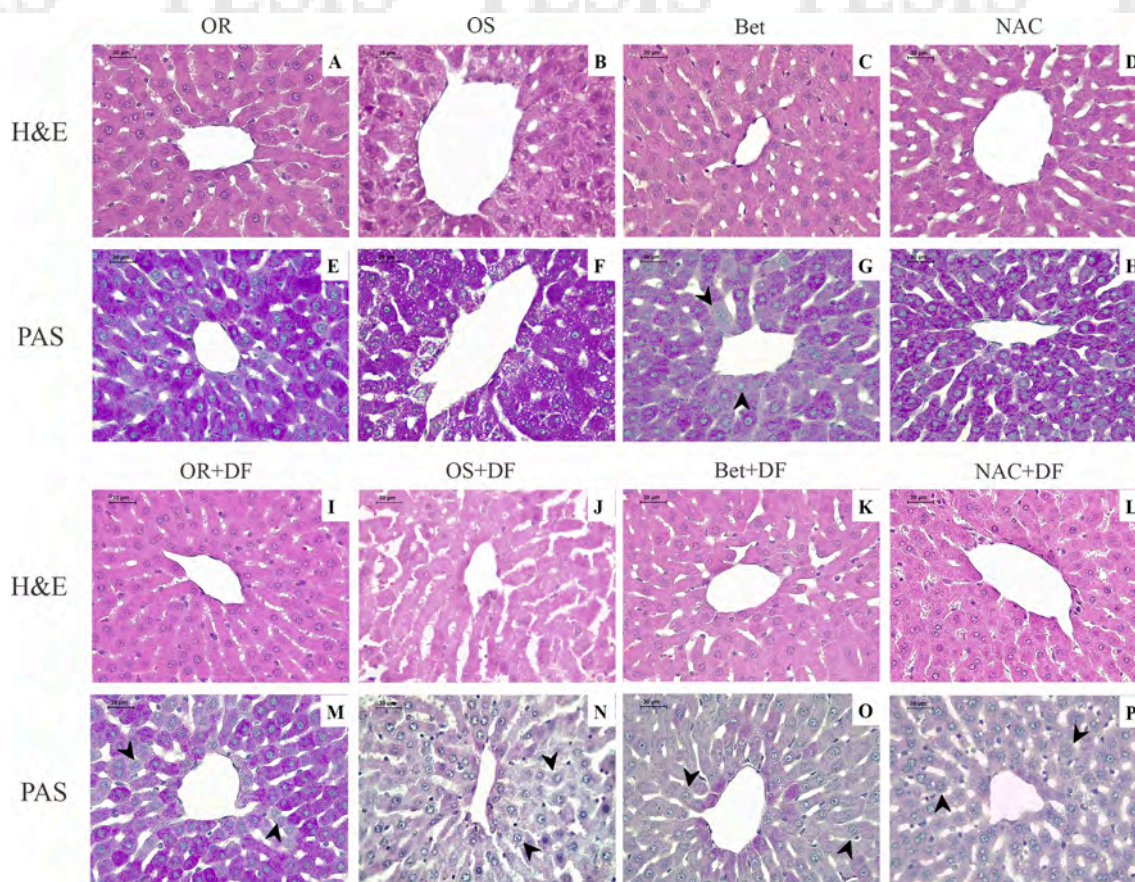
#### 3.2. *Opuntia* extracts protected against diclofenac-induced cell death in primary rat hepatocytes

We next investigated the protective effect of OR and OS *in vitro* in



**Fig. 1. *Opuntia* extracts protect against diclofenac-induced liver damage.** The panels show the levels of the liver injury markers ALT (A) and AST (B) in plasma. Values are expressed as IU/L. Rats were pretreated orally for 5 days with a daily dose of OR, OS (800 mg/kg, b.w.), Bet (25 mg/kg, b.w.) and NAC (50 mg/kg, i.p.), followed by a single challenge of DF. One way ANOVA and a post-hoc Tukey's multiple comparison test was used to determine statistical significance ( $n = 6$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD)  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs Control group. #:  $p \leq 0.01$ , ##:  $p \leq 0.001$ , ###:  $p \leq 0.0001$  vs DF group.





**Fig. 3.** Histopathological (H&E) and histochemical (PAS) analysis of liver tissue of rats. Liver tissue of the experimental groups with H&E (A: OR, B: OS, C: Bet, D: NAC; I: OR + DF, J: OS + DF, K: Bet + DF, and L: NAC + DF) showed normal hepatic architecture and normal hepatocytes near the central vein, similar to the Control group. Liver tissue of experimental groups with PAS (E: OR, F: OS, G: Bet, H: NAC, and M: OR + DF) showed positive reaction to PAS staining. Images N, O and P (OS + DF, Bet + DF and NAC + DF, respectively) showed diminished PAS staining (arrowheads) compared to corresponding control groups. Magnification 400x.

primary cultures of rat hepatocytes. As shown in Fig. 4, DF strongly increased caspase-3 activity in primary rat hepatocytes. Pretreatment with OR or OS prevented the DF-induced increase of caspase-3 activity.

Sytox green staining indicated no increase in necrotic cell death 12 h after DF intoxication but significant necrotic cell death 24 h after DF treatment, indicating secondary necrosis. Secondary necrosis was prevented by pretreatment with OR or OS (Fig. 4 B, Table 1), demonstrating that OR and OS do not shift the mode of cell death from apoptosis to necrosis.

### 3.3. *Opuntia* extracts reduce diclofenac-induced mitochondrial reactive oxygen species production

We have demonstrated that the protective effect of *Opuntia* extracts against acetaminophen toxicity is related to its antioxidant properties (González-Ponce et al., 2018). Our previous research has shown that DF intoxication causes mitochondrial dysfunction (Aguilar Mora et al., 2021). Therefore, we investigated whether *Opuntia* extracts reduce the diclofenac-induced generation of ROS. DF strongly induces superoxide anion production, and both OR and OS decrease DF-induced mitochondrial ROS production (Fig. 5).

### 3.4. *Opuntia* extracts affect both apoptotic and antioxidant gene expression in primary cultures of rat hepatocytes

To further clarify the mechanism by which OR and OS prevent DF-induced damage, antioxidant genes (MnSOD) and apoptosis-related genes (P53 and GADD45B) were measured, as shown in Fig. 6. DF

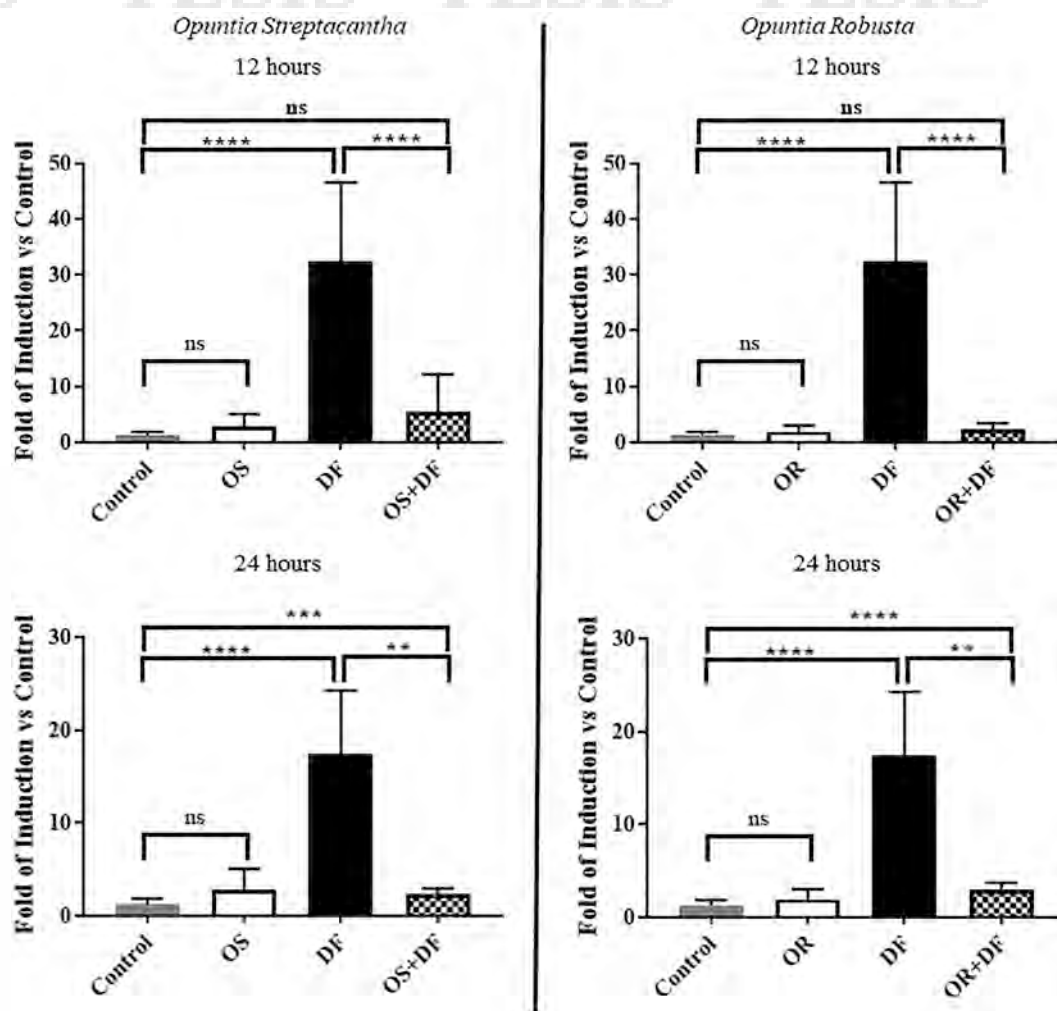
intoxication increased P53 gene expression, which was reduced by both OS and OR pretreatment. DF intoxication also induced GADD45B expression, but OR and OS pretreatment did not reduce the increased expression of GADD45B activity. Finally, OR but not OS increased the expression of the mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD both in the absence and presence of DF intoxication.

## 4. Discussion

The present study shows that *Opuntia* fruits are protective against diclofenac-induced liver injury at a comparable level as known antioxidants. This result supports the use of natural extracts from the *Opuntia* fruit as protection against DILI. We also show that the protective effect is related to the antioxidant properties of *Opuntia* extracts.

*Opuntia* fruits belong to the Cactaceae family. About 200 species are known on the American continent (Iloldi-Rangel et al., 2012). *Opuntia* fruits are generally consumed as snacks and are rich in calcium, phosphorus, iron, potassium, magnesium, ascorbic acid and niacin (Ramírez-Rodríguez et al., 2020).

Also, these fruits contain large and varied amounts of flavonoids and phenolic compounds, primarily betalains. Due to the high concentration of betacyanins present in the extracts, the antioxidant effect is attributed to these compounds. However, additional phytochemicals are present in the extracts such as polyphenols, flavonoids, carotenoids and alkaloids whose biological activity has been demonstrated in different hepatotoxicity models, e.g. antioxidant, and antiproliferative effects (Juaid et al., 2021). Previously we have shown that *Opuntia* extract protects against acetaminophen (APAP)-induced necrotic liver injury. This



**Fig. 4.** *Opuntia* extracts protected against diclofenac-induced cell death in primary rat hepatocytes. Panel A shows the fold induction of caspase-3 activity vs control (FIC). Cells were incubated for 12 or 24 h with diclofenac (400  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence or absence of *Opuntia* extracts (OR/OR) added 30 min after diclofenac exposure. The use of OS or OR only slightly increases caspase 3 activity. Panel B: *Opuntia* extracts do not induce significant necrotic cell death as assessed by Sytox green staining. DF treatment leads to extensive secondary necrosis after 24 h. Scale bar 250  $\mu\text{m}$ . Two-tailed Mann-Whitney *U* test was used to determine statistical significance ( $n = 6$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) ( $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ ).

**Table 1**  
Quantification of cell viability using Sytox green staining.

% cell viability				
12 h				
	Median (Interquartile range)	% Differences vs control	P Value	N
Control	96,06 (95,65–96,73)			
OS	91,09 (89,26–92,38)	4,9%	0,02	4
OR	95,99 (94,91–99,09)	0,07%	>0,999	4
Diclofenac (DF) 400 $\mu\text{M/L}$	52,72 (50,48–54,06)	43,3%	0,02	4
DF + OS	72,48 (71,31–73,04)	23,59%	0,02	4
DF + OR	90,77 (90,08–92,04)	5,29%	0,02	4
24 h				
Control	97,02 (96,70–97,94)			4
OS	96,82 (96,10–97,75)	0,19%	0,68	4
OR	96,46 (93,46–98,71)	0,56%	0,88	4
Diclofenac (DF) 400 $\mu\text{M/L}$	14,44 (11,54–17,40)	82,59%	0,02	4
DF + OS	84,14 (80,24–85,59)	12,88%	0,02	4
DF + OR	85,34 (81,6–86,12)	11,69%	0,02	4
H2O2 5 mmol/L Positive Control	0 (0.1–0.8)			

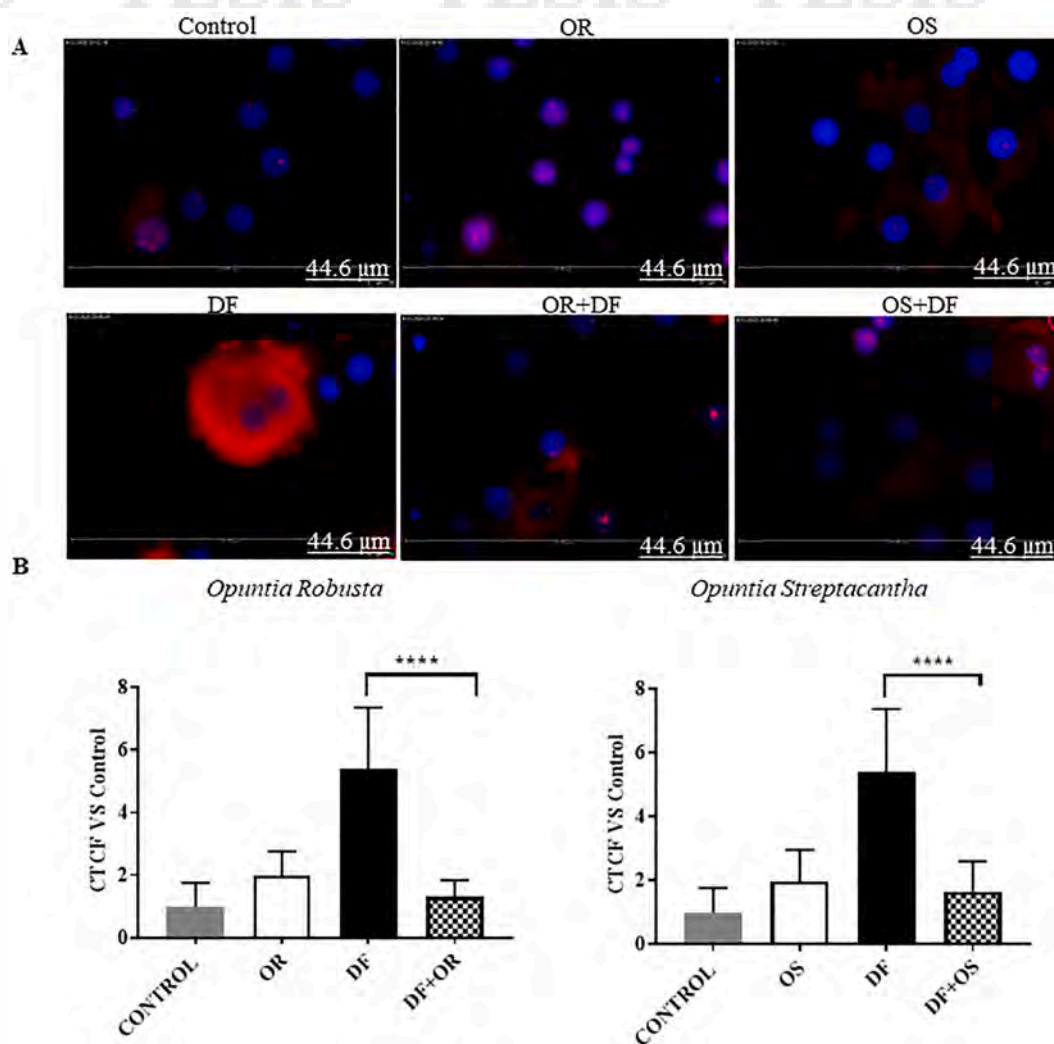
protective effect is due to the high betalain content of *Opuntia* (González-Ponce et al., 2016, 2018; González-Ponce et al., 2020).

In the present study, we show that *Opuntia* extracts also protect against DF-induced liver damage both *in vivo* and *in vitro*. APAP induces liver injury by causing necrotic cell death of hepatocytes. In contrast, DF induces apoptotic cell death of hepatocytes *in vitro*, but necrosis *in vivo*, although this may be secondary necrosis following an initial wave of apoptotic cell death. Although APAP and DF cause different cell death modes, *Opuntia* extracts are protective against toxicity induced by both drugs. Therefore, the *Opuntia* extracts interfere with an injurious pathway common to both apoptotic and necrotic cell death, probably related to the antioxidant capacity of *Opuntia* extracts and the preservation of mitochondrial function.

Oxidative stress (ROS) can induce both necrosis and apoptosis, depending on the cell type, ROS species and oxidative stress level. DF cytotoxicity is related to mitochondrial dysfunction induction, including ROS generation, in hepatocytes (Aguilar Mora et al., 2021). Our results demonstrate that both OR and OS prevent ROS production. Therefore, we propose that *Opuntia* extracts prevent both APAP and DF-induced cell death by scavenging ROS (González-Ponce et al., 2016).

Serum levels of transaminase enzymes (AST and ALT) are used as an indicator of liver damage (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016). These enzymes are considered biomarkers of cell death





**Fig. 5.** *Opuntia* extracts reduce diclofenac-induced mitochondrial reactive oxygen species production. Panel A shows the production of superoxide anion and its mobilization and Panel B shows the quantification of superoxide anion as CTCF vs. Control. Cells were incubated for two hours with diclofenac (400 μmol/L) in the presence or absence of *Opuntia* extracts (OR/OS) added 30 min after diclofenac exposure. Scale bar 44.6 μm. Two-tailed Mann-Whitney *U* test was used to determine statistical significance (n = 6). Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) (p > 0.05, \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01, \*\*\*: p ≤ 0.001, \*\*\*\*: p ≤ 0.0001).

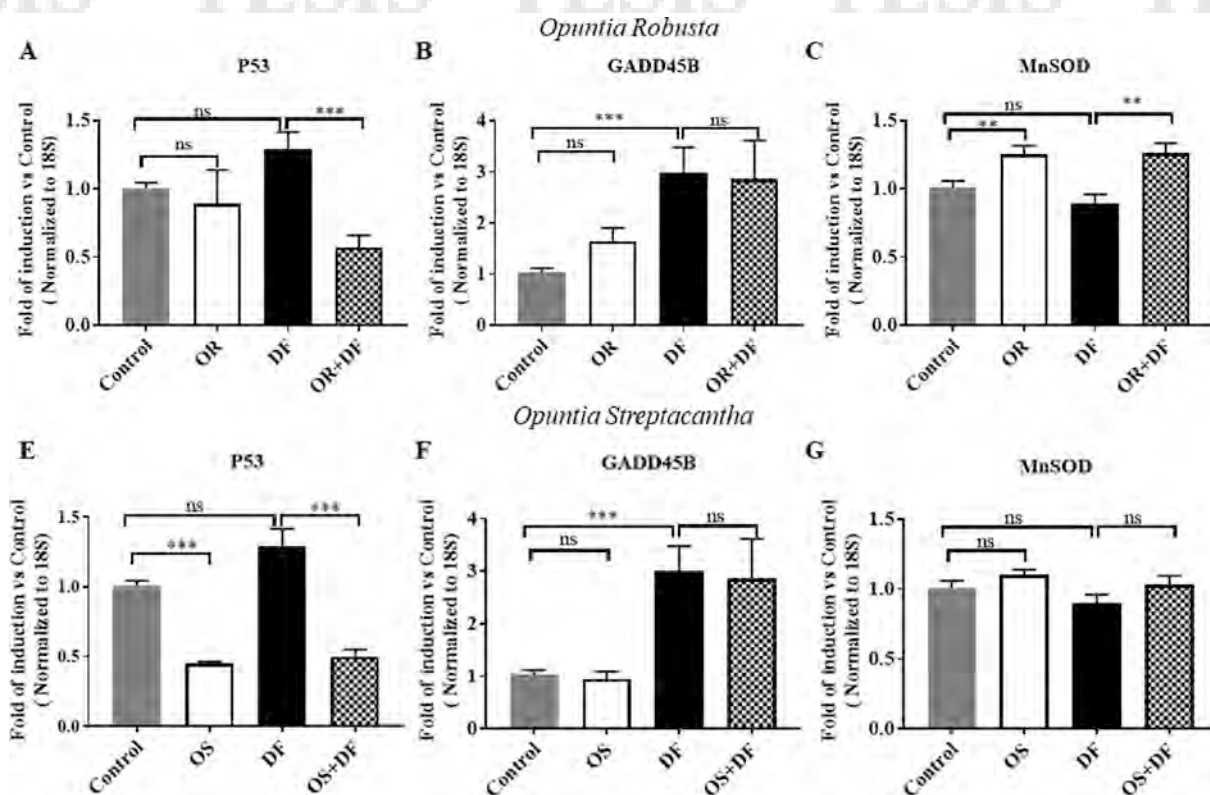
associated with necrosis since they are released into the bloodstream after the presence of damage to the hepatocyte cell membrane (Daza et al., 2008; Ozer et al., 2008). The findings in the *in vivo* experiments confirm liver damage caused by DF, given the significant increase in serum AST and ALT levels, which may be associated with an increase in the production of electrophilic metabolites (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016; González-Ponce et al., 2020). The loss of hepatic glycogen reserves observed in PAS staining with DF administration might be related to the uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation, with the subsequent decrease in ATP synthesis, resulting in ATP depletion, which alters energy-dependent processes (Boelsterli, 2003), promoting cellular generation of energy by the glycolytic pathway.

The exact mechanisms of the protective effects of *Opuntia* extracts have not been fully elucidated yet. It is known that both species of prickly pear fruits contain a wide variety of bioactive components and that OR extracts contain more bioactive compounds and are more protective than OS extracts (González-Ponce et al., 2016). The most outstanding phenolic compounds in these extracts are phenolic acids and flavonoids whose biological activities are due to their characteristic molecular structure, composed of resonance phenolic rings with one or more hydroxyl groups (-OH), which give these compounds high

antioxidant activity and allows them to act as efficient antioxidants via different mechanisms: a) elimination of chemical species that initiate peroxidation; b) transition metal chelators, which prevents the formation of reactive species such as the hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) from the Fenton reaction; c) deactivation of superoxide anion (O<sup>•-</sup>) and d) breaking the oxidative chain reaction. Their efficiency as antioxidants is due to their ability to donate hydrogen atoms (H<sup>•</sup>) from the hydroxyl of the phenolic ring to free radicals, generating stable compounds and in turn forming stable carbonyls (Brewer, 2011; de la Rosa et al., 2019; Rice-Evans et al., 1997).

Regarding betalains, it has been reported that their antioxidant activity is largely due to the electronic resonance system present in betalamic acid, which is the basic structure of both pigments, betaxanthins and betacyanins, however only betacyanins are phenolic compounds and it has been proven that they are good donors of electrons and hydrogen atoms, which is explained by the donation of an electron by phenolic oxygen giving rise to a betacyanin radical that is stabilized by the dislocation of the unpaired electron through the aromatic ring (Gandía-Herrero et al., 2010). We previously demonstrated the high content of these pigments in OR and OS extracts and found a higher concentration in OR than OS (González-Ponce et al., 2020).

Antioxidants like Bet can act as prooxidants depending on the dose



**Fig. 6.** *Opuntia* extracts affect both apoptotic and antioxidant gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. mRNA levels were normalized with respect to housekeeping gene 18S and values of experimental groups are expressed as fold of induction vs. control (FIC). Cells were treated with diclofenac (400  $\mu\text{mol/L}$ ) for two hours in the presence or absence of *Opuntia robusta* (panels A-C) or *Opuntia streptacantha* (panels D-F) added 30 min after diclofenac. Two-tailed Mann-Whitney u test was used to determine statistical significance ( $n = 6$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

administered. The damage biomarkers increased in the Bet + DF group, in line with the results reported by Motawi et al. (2020), who evaluated the effect of betanin against chronic exposure of DF (10 mg/kg, i.p.) in rats. It is important to note that the histopathological analysis did not show any changes in the cytoarchitecture of hepatocytes. In addition, PAS staining demonstrated the protective effect of betanin against DF-induced liver damage since there are no morphological changes although glycogen storage was diminished. These findings suggest that betanin counteracts oxidative damage induced by DF and maintains cellular homeostasis. In experimental *in vitro* and *in vivo* studies the protective potential of betanin in preventing lipoperoxidation and oxidation of low-density lipoproteins (LDL) has been reported (Kanner et al., 2001; Livrea & Tesoriere, 2012; Reddy et al., 2005; Tesoriere et al., 2004, 2009). Besides, it prevents DNA damage induced by the radical peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Esatbeyoglu et al., 2014; Sakihama et al., 2012); it attenuates carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) liver toxicity in common carp (Han et al., 2014) and it protects against atherogenesis and vascular diseases (Vieira Teixeira da Silva et al., 2019). In addition to its ROS scavenging capacity, *Opuntia* may also directly modulate the expression of genes involved in cell death and/or oxidative stress.

NAC is widely used clinically to treat APAP-induced hepatotoxicity, since it is a thiol, a precursor of the amino acid cysteine and a source of sulfhydryl groups. Its main antioxidant mechanisms are to maintain the GSH levels, act as a chelator of metal ions and to detoxify semi-quinone radicals, among others (Samuni et al., 2013; Zafarullah et al., 2003).

We show that *Opuntia* extracts modulate the expression of P53 in primary rat hepatocytes. P53 encodes the protein TP53, which acts as an apoptotic trigger in conditions of cellular stress. Following apoptotic stimuli, P53 is translocated to the mitochondria, resulting in the disruption of the mitochondrial membrane potential and increased

mitochondrial membrane permeability. This facilitates cytochrome C release into the cytoplasm and the Death-Inducing-Signaling-Complex (DISC) formation, ultimately resulting in caspase-3 activation (Amaral et al., 2009; Nayak et al., 2009). P53 also increases gene expression of e. g. PTEN, Apaf-1, PERP and p53AIP1, resulting in increased ROS generation. Inhibition of P53 attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis (Haupt et al., 2003; Hussain et al., 2004; Morita et al., 2014). Our results show that OR and OS inhibit P53 expression in control hepatocytes and during DF intoxication, suggesting that the *Opuntia* extracts inhibit apoptosis, at least in part, via P53 inhibition. The identification of the compounds that decrease P53 expression will be an interesting topic for future studies. It has been demonstrated that antioxidants can downregulate P53 expression in several cell types, thus it is likely that the antioxidants present in OR and OS extracts contribute to the reduced P53 expression (Ibrahim et al., 2021; Man et al., 2020; Ratn et al., 2017).

MnSOD is the primary antioxidant gene in the mitochondria. It converts superoxide anions into hydrogen peroxide, which is subsequently detoxified. We show that OR but not OS increases MnSOD expression alone and in the presence of DF. At present, it is not known which components in the extracts are responsible for this small, but significant increase. It has been shown that protective plant extracts may increase MnSOD expression (Ratn et al., 2017), but the exact nature of these compounds is currently not known. We therefore hypothesize that OR has a higher protective effect than OS. Indeed, our *in vivo* results demonstrate that OR is more protective against DF intoxication than OS, which can be attributed to the higher content of betacyanins in OR extracts than OS extracts (Gonzalez Ponce 2020).

Betalains are a significant constituent of *Opuntia* extracts (González-Ponce et al., 2020). It has been demonstrated that betalain protects against various inducers of liver damage (González-Ponce et al., 2016;

Rahimi et al., 2019). Betalains protective mechanism is thought to be related to its ability to protect mitochondrial function, prevent superoxide dismutase depletion and maintain calcium homeostasis (Luisa Tesoriere et al., 2013). Moreover, betalain and betacyanins can regulate the expression of P53, either promoting or preventing apoptosis (Madadi et al., 2020). Our findings are consistent with these reports and suggest that the protective effect of *Opuntia* extracts is dependent on the betalain content. Indeed, we have previously shown that OR extracts contain higher levels of betacyanins than OS extracts. This study indicates that OR extracts but not OS extracts can increase MnSOD expression and preserve liver histology.

Finally, we show that DF increases the expression of GADD45B in the absence and presence of OR or OS. GADD45B is an early predictor of liver dysfunction (Kastan et al., 1992). Previous studies have shown that the overexpression of GADD45 family proteins induces the activation of MKK4, followed by the activation of c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) and the induction of apoptosis (Cho et al., 2010). In our study, we demonstrate that DF induces the expression of GADD45B, implying the presence of cellular stress and JNK activation. Since the increased expression of GADD45B is not attenuated by OR or OS, we hypothesize that OR and OS act downstream of GADD45B, as previously suggested by Hildesheim and Fornace (Hildesheim & Fornace, 2002).

Interestingly, we have shown that OR and OS decrease GADD45B expression in the APAP model of necrotic liver injury (González-Ponce et al., 2018). Our results suggest that inhibition of either GADD45B or P53 could be targets of intervention to prevent or reduce DILI-induced necrosis or apoptosis.

## 5. Conclusion

In conclusion, in this study, we demonstrate that *Opuntia* extracts protect against diclofenac-induced toxicity. The protective mechanisms of OR and OS involve the inhibition of P53 and the strengthening of mitochondrial antioxidant capacity. These results further support the use of *Opuntia* against DILI and explore the potential of targeting P53 function to prevent mitochondrial damage. We propose that our extracts might be used as an alternative treatment against oxidative liver damage induced by OTC analgesics and NSAIDs with a similar effect as NAC which is widely used clinically. Nevertheless, complementary molecular and nutraceutical studies are needed to elucidate the mechanism of action.

## Ethics statements

Experiments were approved and performed following the guidelines of the local Committee for Care and Use of laboratory animals of the University of Groningen (permission no. 8073), Mexican governmental guideline NOM-062-ZOO-1999, as well as the guidelines of the National Institutes of Health for the care and use of Laboratory animals (NIH publications no. 8023).

## Funding

Fabio Aguilar Mora and Gloria Stephanie Villa Jaimes were supported by a doctoral grant from CONACyT (440129 and 715428, respectively) and an internal support by Universidad Autónoma de Aguascalientes with key project PIT19-2.

## CRedit authorship contribution statement

**Gloria Stephanie Villa-Jaimes:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Fabio Alejandro Aguilar-Mora:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Herson Antonio González-Ponce:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing. **Francisco Javier Avelar-**

**González:** Conceptualization, Formal analysis, Project administration. **Ma. Consolación Martínez Saldaña:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Manon Buist-Homan:** Methodology. **Han Moshage:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

To Sonia Sofia Muñoz Cruz from Morphology Department Basic Science Center for her technical support and to Nayeli Amalinalli Pulido Hornedo from Universidad Autónoma de Aguascalientes for their academic support.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104960>.

## References

- Aguilar Mora, F. A., Musheshe, N., Oun, A., Buist-Homan, M., Lezoualc'h, F., Cheng, X., Schmidt, M., & Moshage, H. (2021). Elevated cAMP protects against diclofenac-induced toxicity in primary rat hepatocytes: a protective effect mediated by EPACs. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000217>. MOLPHARM-AR-2020-000217.
- Albuquerque, T. G., Nunes, M. A., Bessada, S. M. F., Costa, H. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Biologically active and health promoting food components of nuts, oilseeds, fruits, vegetables, cereals, and legumes. In *Chemical analysis of food* (pp. 609–656). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813266-1.00014-0>.
- Amaral, J. D., Castro, R. E., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). p53 and the regulation of hepatocyte apoptosis: Implications for disease pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 15(11), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.09.005>
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: A paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3), 307–322. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00368-5](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00368-5)
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- Cho, H. J., Park, S. M., Hwang, E. M., Baek, K. E., Kim, I. K., Nam, I. K., Im, M. J., Park, S. H., Bae, S., Park, J. Y., & Yoo, J. (2010). Gadd45b mediates Fas-induced apoptosis by enhancing the interaction between p38 and retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25500–25505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091413>
- Conde de la Rosa, L., Schoemaker, M. H., Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Havinga, R., Jansen, P. L. M., & Moshage, H. (2006). Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of JNK and ERK MAP kinases. *Journal of Hepatology*, 44(5), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.034>
- Contreras-Zentella, M. L., & Hernández-Muñoz, R. (2016). Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3529149. <https://doi.org/10.1155/2016/3529149>
- Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J., & Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.033>
- Daza, E., Juan, E. F., Mejía, I. A. M., & Mejía, M. (2008). *Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico*.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12 - Phenolic Compounds. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253–271). Woodhead Publishing.
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerzad, 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: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 73, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.007>



- Frank, T., Stintzing, F. C., Carle, R., Bitsch, I., Quaas, D., Straß, G., Bitsch, R., & Netzel, M. (2005). Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacological Research*, 52(4), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.04.005>
- Gan, T. J. (2010). Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232(2), 449–460. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1191-0>
- Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Castell, J. V., & Jover, R. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology*, 66(11), 2155–2167. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.003>
- González-Ponce, H. A., Martínez-Saldaña, M. C., Tepper, P. G., Quax, W. J., Buist-Homan, M., Faber, K. N., & Moshage, H. (2020). Betacyanins, major components in *Opuntia* red-purple fruits, protect against acetaminophen-induced acute liver failure. *Food Research International*, 137, Article 109461. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109461>
- González-Ponce, H., Martínez-Saldaña, M., Rincón-Sánchez, A., Sumaya-Martínez, M., Buist-Homan, M., Faber, K., 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>
- 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(2), 117. <https://doi.org/10.3390/nu10020117>
- Gummin, D. D., Mowry, J. B., Beuhler, M. C., Spyker, D. A., Brooks, D. E., Dibert, K. W., Rivers, L. J., Pham, N. P. T., & Ryan, M. L. (2020). 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 37th Annual Report. *Clinical Toxicology*, 58(12), 1360–1541. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1834219>
- Han, J., Gao, C., Yang, S., Wang, J., & Tan, D. (2014). *Betain attenuates carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver injury in common carp (Cyprinus carpio L.)*. 865–874. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9892-5>
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - The p53 network. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 20, pp. 4077–4085). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.00739>
- Heard, K., Sloss, D., Weber, S., & Dart, R. C. (2006). Overuse of Over-the-Counter Analgesics by Emergency Department Patients. *Annals of Emergency Medicine*, 48(3), 315–318. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2005.12.012>
- Hildesheim, J., & Fornace, A. J. (2002). Gadd45a: An elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(8), 2475–2479.
- Hussain, S. P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., Hofseth, L. J., Moake, M., Nagashima, M., Forrester, K. S., & Harris, C. C. (2004). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancer Research*, 64(7), 2350–2356. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-2287-2>
- Ibrahim, K. A., Eleyan, M., Khwanes, S. A., Mohamed, R. A., & Abd El-Rahman, H. A. (2021). Quercetin ameliorates the hepatic apoptosis of foetal rats induced by in utero exposure to fenitrothion via the transcriptional regulation of paraoxonase-1 and apoptosis-related genes. *Biomarkers*, 26(2), 152–162. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1875505>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Illoldi-Rangel, P., Ciarleglio, M., Sheinvar, L., Linaje, M., Sánchez-Cordero, V., & Sarkar, S. (2012). *Opuntia* in México: Identifying priority areas for conserving biodiversity in a multi-use landscape. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036650>
- Iso, H. (2018). OBSOLETE: Relationship Between Vegetables and Fruits (Antioxidant Vitamins, Minerals, and Fiber) Intake and Risk of Cardiovascular Disease. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.99601-6>
- Juaid, N., Amin, A., Abdalla, A., Reese, K. A., Alamri, Z., Moulay, M., Abdu, S., & Miled, N. (2021). Anti-Hepatocellular Carcinoma Biomolecules: Molecular Targets Insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910774>
- 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>
- Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., & Fornace, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71(4), 587–597. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90593-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90593-2)
- Kim, S. H., Jeon, B. J., Kim, D. H., Kim, T. I., Lee, H. K., Han, D. S., Lee, J.-H., Kim, T. B., Kim, J. W., & Sung, S. H. (2012). Prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* var. saboten) protects against stress-induced acute gastric lesions in rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(11), 968–973. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2282>
- Lapeyre-Mestre, M., Grolleau, S., & Montastruc, J.-L. (2013). Adverse drug reactions associated with the use of NSAIDs: A case/noncase analysis of spontaneous reports from the French pharmacovigilance database 2002–2006. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 27(2), 223–230. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.00991.x>
- Leufkens, H. G., Ameling, C. B., Hekster, Y. A., & Bakker, A. (1990). Utilization patterns of non-steroidal anti-inflammatory drugs in an open Dutch population. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 12(3), 97–103. <https://doi.org/10.1007/BF01967602>
- Li, L., Zhou, Y. F., Li, Y. L., Wang, L. L., Arai, H., & Xu, Y. (2017). In vitro and in vivo antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Cortex Dictamnii*. *World Journal of Gastroenterology*, 23(16), 2912–2927. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2912>
- Livrea, M. A., & Tesoriere, L. (2012). Lipoperoxyl Radical Scavenging and Antioxidative Effects of Red Beet Pigments. In B. Neelwarne (Ed.), *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications* (pp. 105–124). US: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0_6)
- López-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Avila-Nava, A., Vázquez-Manjarrez, N., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2014). The Effect of Nopal (*Opuntia Ficus Indica*) on Postprandial Blood Glucose, Incretins, and Antioxidant Activity in Mexican Patients with Type 2 Diabetes after Consumption of Two Different Composition Breakfasts. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(11), 1811–1818. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.06.352>
- Madadi, E., Mazloum-Ravasan, S., Yu, J. S., Ha, J. W., Hamishehkar, H., & Kim, K. H. (2020). Therapeutic application of betalains: A review. In *Plants* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants9091219>
- Man, Q., Deng, Y., Li, P., Ma, J., Yang, Z., Yang, X., Zhou, Y., & Yan, X. (2020). Licorice Ameliorates Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Through Antiapoptosis, Antioxidative Stress, Anti-Inflammation, and Acceleration of Metabolism. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 563750. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.563750>
- Marí, M., Colell, A., Morales, A., Von Montfort, C., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2010). Redox control of liver function in health and disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1295–1331). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2634>
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1–3), 83–104. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00306-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00306-1)
- Morita, A., Ariyasu, S., Wang, B., Asanuma, T., Onoda, T., Sawa, A., Tanaka, K., Takahashi, I., Togami, S., Neno, M., Inaba, T., & Aoki, S. (2014). AS-2, a novel inhibitor of p53-dependent apoptosis, prevents apoptotic mitochondrial dysfunction in a transcription-independent manner and protects mice from a lethal dose of ionizing radiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(4), 1498–1504. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.037>
- Moshage, H., Casini, A., & Lieber, C. S. (1990). Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes. *Hepatology*, 12(3), 511–518. <https://doi.org/10.1002/hep.1840120311>
- Motawi, T. K., Ahmed, S. A., El-Boghdady, N. A., Metwally, N. S., & Nasr, N. N. (2020). Impact of betanin against paracetamol and diclofenac induced hepato-renal damage in rats. *Biomarkers*, 25(1), 86–93. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1697365>
- Nayak, S., Panesar, P., & Kumar, H. (2009). p53-Induced Apoptosis and Inhibitors of p53. *Current Medical Chemistry*, 16(21), 2627–2640. <https://doi.org/10.2174/092986709788681976>
- Nissar, A. U., Farrukh, M. R., Kaiser, P. J., Rafiq, R. A., Afnan, Q., Bhushan, S., Adil, H. S., Subhash, B. C., & Tasduq, S. A. (2013). Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from Allium plants, on experimentally induced hepatic preneoplastic events in wistar rat. *Phytomedicine*, 20(10), 828–833. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.03.009>
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Rahimi, P., Abedimanesh, S., Mesbah-Namin, S. A., & Ostadrahimi, A. (2019). Betalains, the nature-inspired pigments, in health and diseases. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 18, pp. 2949–2978). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.147983>
- Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huelamo, M., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagüena, N., & Trujillo, J. (2020). Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. In *Food Chemistry* (Vol. 312). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126073>
- Ratn, A., Awasthi, Y., Kumar, M., Singh, S. K., Tripathi, R., & Trivedi, S. P. (2017). Phorate induced oxidative stress, DNA damage and differential expression of p53, apaf-1 and cat genes in fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Chemosphere*, 182, 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.008>
- Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., & Nair, M. G. (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Sakihama, Y., Maeda, M., Hashimoto, M., Tahara, S., & Hashidoko, Y. (2012). 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>

- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., & Berk, M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(8), 4117–4129.
- Santos-Alves, E., Marques-Aleixo, I., Coxito, P., Balça, M. M., Rizo-Roca, D., Rocha-Rodrigues, S., Martins, S., Torrella, J. R., Oliveira, P. J., Moreno, A. J., Magalhães, J., & Ascensão, A. (2014). Exercise mitigates diclofenac-induced liver mitochondrial dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(7), 668–677. <https://doi.org/10.1111/eci.12285>
- Schoemaker, M. H., Ros, J. E., Homan, M., Trautwein, C., Liston, P., Poelstra, K., van Goor, H., Jansen, P. L. M., & Moshage, H. (2002). Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (ciAP2) prevents apoptosis. *Journal of Hepatology*, 36(6), 742–750. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00063-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00063-6)
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247–269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)
- Syed, M., Skonberg, C., & Hansen, S. H. (2016). Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro*, 31, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.020>
- 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(4), 941–945. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.4.941>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2009). Betacyanins as phenol antioxidants. Chemistry and mechanistic aspects of the liperoxyl radical-scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radical Research*, 43(8), 706–717. <https://doi.org/10.1080/10715760903037681>
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2013). Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 110(2), 230–240. <https://doi.org/10.1017/S000711451200493X>
- Vieira Teixeira da Silva, D., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., Mere Del Aguila, E., & M. Flosi Paschoalin, V. (2019). Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030458>.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(1), 6–20.





Article

# Molecular and Antioxidant Characterization of *Opuntia robusta* Fruit Extract and Its Protective Effect against Diclofenac-Induced Acute Liver Injury in an In Vivo Rat Model

Gloria Stephanie Villa-Jaimes <sup>1</sup>, Han Moshage <sup>2,3</sup>, Francisco Javier Avelar-González <sup>4</sup>,  
Herson Antonio González-Ponce <sup>5</sup>, Manon Buist-Homan <sup>2,3</sup>, Fidel Guevara-Lara <sup>6</sup>,  
Esperanza Sánchez-Alemán <sup>1,7</sup>, Sandra Luz Martínez-Hernández <sup>8</sup>, Javier Ventura-Juárez <sup>1</sup>,  
Martín Humberto Muñoz-Ortega <sup>6</sup> and Ma. Consolación Martínez-Saldaña <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>2</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, 9713 ZP Groningen, The Netherlands
- <sup>3</sup> Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, 9713 ZP Groningen, The Netherlands
- <sup>4</sup> Departamento de Fisiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>5</sup> Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Aguascalientes 20256, Mexico
- <sup>6</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- <sup>7</sup> Unidad de Medicina Familiar 8, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Aguascalientes 20180, Mexico
- <sup>8</sup> Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
- \* Correspondence: mcmtzsal@correo.uaa.mx



**Citation:** Villa-Jaimes, G.S.; Moshage, H.; Avelar-González, F.J.; González-Ponce, H.A.; Buist-Homan, M.; Guevara-Lara, F.; Sánchez-Alemán, E.; Martínez-Hernández, S.L.; Ventura-Juárez, J.; Muñoz-Ortega, M.H.; et al. Molecular and Antioxidant Characterization of *Opuntia robusta* Fruit Extract and Its Protective Effect against Diclofenac-Induced Acute Liver Injury in an In Vivo Rat Model. *Antioxidants* **2023**, *12*, 113. <https://doi.org/10.3390/antiox12010113>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 5 December 2022

Revised: 23 December 2022

Accepted: 27 December 2022

Published: 3 January 2023

**Abstract:** A molecular characterization of the main phytochemicals and antioxidant activity of *Opuntia robusta* (OR) fruit extract was carried out, as well as an evaluation of its hepatoprotective effect against diclofenac (DF)-induced acute liver injury was evaluated. Phenols, flavonoids and betalains were quantified, and antioxidant characterization was performed by means of the ABTS<sup>•+</sup>, DPPH and FRAP assays. UPLC-QTOF-MS/MS was used to identify the main biocompounds present in OR fruit extract was carried out via. In the in vivo model, groups of rats were treated prophylactically with the OR fruit extract, betanin and *N*-acteylcysteine followed by a single dose of DF. Biochemical markers of oxidative stress (MDA and GSH) and relative gene expression of the inducible antioxidant response (*Nrf2*, *Sod2*, *Hmox1*, *Nqo1* and *Gclc*), cell death (*Casp3*) and DNA repair (*Gadd45a*) were analyzed. Western blot analysis was performed to measure protein levels of *Nrf2* and immunohistochemical analysis was used to assess caspase-3 activity in the experimental groups. In our study, the OR fruit extract showed strong antioxidant and cytoprotective capacity due to the presence of bioactive compounds, such as betalain and phenols. We conclude that OR fruit extract or selected components can be used clinically to support patients with acute liver injury.

**Keywords:** oxidative stress biomarkers; bioactive compounds; antioxidant response; dietary antioxidants; diclofenac; liver failure



**Copyright:** © 2023 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/>).

## 1. Introduction

Historically, natural products of plant origin have been used worldwide for medicinal purposes. In Mexico, since pre-Hispanic times, foods, such as corn, maguey and nopal, are part of the population's diet [1,2]. Interest in studying food consumption and its beneficial effects on health has recently increased [3].

The genus *Opuntia* spp. is distributed naturally in the southern United States and Latin America and was introduced in Asia, South Africa, Ethiopia, Australia and countries

of the Mediterranean basin, such as Italy, Spain and Greece [4]. Mexico is considered the center of the origin and diversity of the genus [5]. The fruits of various species of *Opuntia* spp. contain compounds with biological activity, such as vitamins B1, A, E and C [6,7], flavonoids (isorhamnetin, kaempferol, quercetin) [6], phenolic compounds (ferulic acid and synapoyl-diglycoside) [6] and pigments (betacyanins and betaxanthins) [8,9].

Likewise, experimental in vivo [10], in vitro and clinical studies have shown that phytochemicals from the fruit of *Opuntia* spp. have activities, such as: cholesterol-lowering effects (pectin of OR) [11], antiatherogenic effects (betanin and indicaxanthin from *O. ficus-indica*) [12,13], anticarcinogenic effects (phenolics, flavonoids, betalains from *Opuntia* spp.) [14–16], antigenotoxic and hepatoprotective effects (betacyanins, phenolics and flavonoids in *O. ficus-indica*, *O. streptacantha* and *O. robusta*, respectively) [17,18]. The biological effects of *Opuntia* spp. fruit consumption have been associated with the antioxidant capacity of phytochemicals via their interaction with different prooxidant mechanisms and the inducible antioxidant response [18].

The *O. robusta* (OR) species is widely distributed in Mexico, with cultivars in South Africa and the Mediterranean basin [19]. Its fruit (prickly pear) has a purple coloration and contains phenolic compounds, such as p-hydroxy benzoic acid, ferulic acid, pyrogallol [20], vitamins C and E [7] and pigments (betalains, mainly betacyanins) [21].

Diclofenac (DF) is the most widely prescribed over-the-counter (OTC) non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in the world [22] and together with ibuprofen accounts for 40% of sales of NSAIDS for osteoarthritis [23] in people aged between 65–85 years with multiple morbidities [24]. It is also prescribed to treat chronic pain related to rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and acute muscle pain [25]. Its frequent and/or excessive consumption is related to the development of adverse effects in the gastrointestinal tract and liver [26]. Drug-induced liver injury (DILI) is an adverse reaction caused by an increase in cellular oxidative stress, which damages hepatocytes and other liver cells, as a result of drug biotransformation in the liver [27]. This toxicity may be due to the interaction between the drug and special risk factors of the patient (e.g., age, primary pathologies, genetic factors), known as idiosyncrasy (iDILI), or may be dose-dependent, as seen in intrinsic DILI [28,29]. According to Teschke & Danan (2020) [30], diclofenac ranks fifth in the worldwide top ranking of drugs causing DILI cases with a causality assessment performed based on the Roussel Uclaf Causality Assessment Method (RUCAM). Scientometric research reported that of 3312 cases, 46 corresponded to diclofenac iDILI [31–33]. Diclofenac acute liver injury is mediated mainly by the isoforms CYP2C9 and CYP3A4 [34]. It generates reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) and electrophilic compounds, such as iminoquinones, which enter redox cycles and produce mitochondrial injury in hepatocytes [35–37].

The protective effect of OR fruit extract against the hepatotoxicity induced by thioacetamide (TAA) [7], acetaminophen (APAP) [17,38] and diclofenac [39] has been previously reported, where biomarkers of liver injury were monitored, such as the aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes. Moreover, effects on the expression and/or activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) [40], mediated by indicaxanthin, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), mediated by betanin [41], have also been reported.

Therefore, the aim of this study was to complement the characterization of the bio-components of OR and its antioxidant properties against DF-induced acute liver injury.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Gallic acid monohydrate #398225, (+)-catechin hydrate #C1251, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl #D9132), Trolox (( $\pm$ )-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid #238813), ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt #A1888), diclofenac sodium salt #D6899, N-acetyl-L-cysteine #A7250 and betanin #901266 were provided by Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA).



## 2.2. Plant Material and Sample Preparation

Samples of wild *Opuntia robusta* fruits were collected from randomly selected plants in a semi-arid region east of Aguascalientes, México (21°47'04.7" N 102°06'40.1" O). Fruits were washed and disinfected, and the peel was separated from the fruit. Sample preparation was carried out following the method described previously [38]. The fruit juice was centrifuged, filtered, lyophilized and stored at −80 °C in a Labconco FreeZone 18 Liter Freeze Dry System (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA). For the in vivo experiments, lyophilized extracts were reconstituted with 50 mL of distilled water. All samples were handled under dim-light conditions.

## 2.3. Phenolic Compound Extraction

In order to evaluate phenolics, flavonoids and antioxidant capacities, extractions were carried out with an aqueous solution of acidified methanol (50% *v/v*, pH 2.0) and aqueous acetone (70% *v/v*) prepared according to Osorio-Esquivel et al. [42] with modifications. A 0.25 g sample was shaken first with 10 mL of 50% (*v/v*) acidified (pH 2.0; HCl) methanol for 1 h at room temperature using an orbital shaker at 200 rpm. The mixture was centrifuged in an EBA 200 Hettich centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) at 1500× *g* for 10 min, and the supernatant was recovered (extract A). The insoluble residue was then re-extracted (extract B) with 10 mL of aqueous acetone (70% *v/v*) following the same procedure described above. Then, both supernatants were mixed (MAA extract) and stored at −20 °C until analysis. Determinations were performed in triplicate.

## 2.4. Determination of Total Soluble Phenols and Flavonoids

Total phenolics were measured according to the Folin-Ciocalteu method described by Osorio-Esquivel et al. [42] with slight modifications. The absorbance of the reaction was measured at 757 nm using a spectrophotometer (Biomate 3 Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A calibration curve was prepared under similar conditions using gallic acid as the standard, and results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry sample. The total flavonoid determination was performed according to the aluminum chloride colorimetric method described by Osorio-Esquivel et al. [42]; the absorbance of the reaction was measured at 510 nm. Catechin was used as a standard for the calibration curve, and the results were expressed as milligrams of catechin equivalents per gram of dry sample.

## 2.5. Betalain Content

Betacyanin and betaxanthin content was analyzed following the method described by Sumaya-Martínez et al. [43] with slight modifications. Lyophilized extracts were reconstituted in distilled water at a 1:25 dilution and clarified at 12,000× *g* for 15 min at room temperature. For both pigments, determination was carried out photometrically and reported as milligrams of betanin/indicaxanthin equivalents per liter of clarified juice. Absorbances were measured at 535 nm for betacyanins and 484 nm for betaxanthins, and the content was calculated following the equation:

$$\text{Betacyanins or betaxanthins [mg/L]} = [(A \times DF \times MW \times 1000 / \epsilon \times 1)]$$

where: A = absorbance at 535 or 484 nm, DF = dilution factor, MW = molecular weight (550 g/mol for betacyanins and 308 g/mol for betaxanthins), and  $\epsilon$  = extinction coefficient (60,000 L/(mol cm) for betacyanins and 48,000 L/(mol cm) for betaxanthins).

## 2.6. Determination of Anti-Free Radical and Ferric Reducing Activities

The free radical-scavenging activity of MAA extract was determined using different methods. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method was performed according to Yap et al. [44] with modifications. The ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay was performed following the method described by Ramlagan et al. [45]



with modifications. The chelating activity was evaluated using the FRAP (ferric reducing antioxidant power) method as described by Tenore et al. and Yap et al. [44,46]. Antioxidant activities were expressed as micromoles of Trolox equivalents per gram of dry sample.

## 2.7. UPLC-QTOF-MS/MS Analysis

### 2.7.1. Sample Preparation

Betanin standard (Sigma-Aldrich #901266-5G, St. Louis, MO, USA) was prepared at a concentration of 1 mg/mL in ultrapure water. After thawing at 4 °C, 0.11 g of lyophilized extract of OR was resuspended in 1 mL of water with 0.1% formic acid. The sample was vortexed for 60 s and centrifuged for 10 min at 186× g. It was then passed through a 0.22 µm nylon filter and centrifuged again for 5 min at 186× g. Finally, the supernatant was placed in an amber vial for analysis.

### 2.7.2. Liquid Chromatography and Mass Spectrometry

Chromatographic separation was conducted on a Waters ACQUITY UPLC® Class I (Waters Corporation, Milford, MA, USA) using an Acquity HSS T3 column (2.1 × 100 mm; 1.8 µm, Waters Corporation, Milford, MA USA). The conditions for UPLC were set as follows: column and autosampler were maintained at 30 °C and 6 °C, respectively, flow rate of 0.30 mL/min and the injection volume was 3 µL. The mobile phases consisted of (A) 0.1% formic acid in water and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile. The separation of the compounds was in a linear gradient as follows: 1% B (0–3 min), 1–25% B (3–19 min), 25% B (19–20 min), 25–100% B (20–20.10 min), 100% B (20.10–21.10 min), 100–1% B (21.10–21.20 min) and 1% B (21.20–24 min).

In order to explore the main chemical constituents of OR extract, phytochemical profiling was performed. Mass spectrometry analysis was performed on a Waters Synapt G1 Q-TOF mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source operating in both positive and negative ion mode. The MS conditions for the positive ion mode were set as follows: desolvation gas flow of 650 L/h at a temperature of 250 °C. The capillary voltage was 3.5 kV, and the sample and extraction cone voltages were 35 V and 4.5 V, respectively. Trap and transfer collision energies were 6 eV and 4 eV, respectively. For the negative ion mode the conditions were set as follows: desolvation gas flow of 500 L/h at a temperature of 300 °C. The capillary voltage was 2.3 kV, and the sample and extraction cone voltages were 35 V and 3.5 V, respectively. Trap and transfer collision energies were 4 eV and 2 eV, respectively. For both ion modes, the source temperature was 120 °C. The scan interval was 0.1 s, and the range of acquisition was 100–1000 *m/z*. For an accurate determination of mass, leucine-enkephalin was used as the lock mass, with an *m/z* value of 556.2771 for ESI (+) and an *m/z* value of 554.2615 for ESI (–).

Typical chromatograms were processed using the Progenesis QI software to obtain raw data, including precursor and fragment ions. Raw data were compared and classified according to online databases, including The Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca>, accessed on 20 February 2022), ChemSpider (<https://www.chemspider.com>, accessed on 20 February 2022) and PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, Accessed on 20 February 2022). The compounds were classified according to their chemical structure, and their biological activity was analyzed according to the literature reviewed.

## 2.8. Animals

Sixty-four Wistar rats weighing 200–250 g were obtained from the animal facility at the Basic Sciences Center of the Autonomous University of Aguascalientes. Rats were housed in polypropylene cages at room temperature (25 ± 2 °C) under a daily 12 h light/day cycle and with free access to water and food. Experiments were performed following the guidelines of the local Ethics Committee from the Autonomous University of Aguascalientes (permission no. CEADI-UAA-02-2021), according to the Mexican governmental guideline 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).

### 2.9. Experimental Design

After two weeks of adaptation, animals were divided into 8 groups of 8 animals per group: Control group: untreated rats; DF group: rats who received a single dose of diclofenac (75 mg/kg, i.p.) [39]; OR group: rats who were prophylactically treated with *Opuntia robusta* fruit extract (800 mg/kg/5 days, orally) [17]; Bet group: rats who were prophylactically treated with betanin (25 mg/kg/5 days, orally) [47]; NAC group: rats who were prophylactically treated with *N*-acetylcysteine (50 mg/kg/5 days, i.p.) [48]. In the OR + DF, Bet + DF and NAC + DF groups, the antioxidants were administered for 5 days before the induction of acute toxicity with DF on the sixth day. Due to the wide range of doses reported in the literature, a dose–response curve was performed with male Wistar rats (results not shown). The betanin concentration in the administered dose of the OR extract (800 mg/kg) was 4.45 mg of betanin equivalents. Twenty-four hours after the last administration, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg) intraperitoneally, and transcardial perfusion was performed with wash solution (0.9% sodium chloride, 0.5% procaine and 0.1% heparin). Samples of liver tissue were collected, and biomarkers of oxidative stress, gene expression ( $n = 3$ ) and protein expression ( $n = 4$ ) were analyzed. For the histochemical study ( $n = 4$ ), the above procedure was repeated followed by perfusion with 10% formaldehyde buffered to pH 7.0 with phosphate buffer.

### 2.10. Biomarkers of Oxidative Stress

For biochemical and molecular tests, different fragments of 1 cm<sup>3</sup> were isolated and frozen at  $-80$  °C. To determine the concentrations of reduced glutathione (GSH), a colorimetric assay kit was used (#38185, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's instructions. The final concentration of GSH was determined by the equation:

$$\text{GSH} = (\text{total glutathione} - \text{GSSG}) \times 2$$

and the ratio of GSSG to GSH was also determined. Malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, was determined according to the method described by Uchiyama & Mihara [49] with modifications.

### 2.11. Molecular Biomarkers

#### 2.11.1. Quantitative RT-PCR Analysis

After perfusion, total RNA was isolated from 100 mg using the SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA was quantified using a Biodrop (Isogen Life Science, Barcelona, España) and stored at  $-80$  °C until required. Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega A5000, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, qPCR was performed using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (K0221, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using StepOne™ equipment (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) with the following thermocycling conditions: 50 °C for 2 min and 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 45 s and 59 °C for 35 s and finally 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s for the melt curve. The oligonucleotide primers are displayed in Supplementary Table S1. Relative expression levels were normalized to those of  $\beta$ -actin, and the differences were determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [50].

#### 2.11.2. Western Blot

For Western blotting, 40 µg of protein extract was separated on a 10% SDS-PAGE gel, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA). The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) and 5% skimmed milk for 1 h at room temperature. For immunodetection, the membranes were

incubated overnight at 4 °C with the primary antibody, a Nrf2 polyclonal antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Blots were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated HRP antibody (1:500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After the incubation, the membranes were washed with TBST (Tris-buffered saline-0.05% Tween 20), and blots were developed with Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for chemiluminescence imaging. The densitometric analysis of the obtained bands was performed using NIH ImageJ2 version 2.3.0/1.530 software. Intensity values were normalized to those of the internal housekeeping protein GAPDH and expressed as relative protein expression.

### 2.11.3. Immunohistochemistry (IHC) for Active Caspase-3

To visualize the presence of active caspase-3 in liver tissue, sections were subjected to immunohistochemistry as described previously [51]. Samples were incubated with the primary antibody, a monoclonal antibody against active caspase-3 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), overnight at 4 °C. The secondary antibody, goat anti-mouse HRP (1:100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was incubated for 2 h at room temperature. Slides were washed three times with PBS-Tween 20, and peroxidase activity was developed with diaminobenzidine (DAB) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 5 min. Slides were again washed in 1× PBS and counterstained with hematoxylin (diluted 1:10 in tri-distilled water). For the negative control, the primary antibody was not added. Images were taken on a Leica ICC50W (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) microscope at 40× magnification and processed using Leica LAS EZ software. Quantification of active caspase-3 was performed by counting the number of positive cells (positive reaction in the cytoplasm) and reported as the mean number of positive cells per mm<sup>2</sup>. In addition, the reaction area intensity was evaluated based on optical density values of DAB and reported as the reaction area percentage. At least 18 fields per group (1.25 mm<sup>2</sup>) were evaluated.

### 2.12. Statistical Analysis

Statistical significance was evaluated by performing ANOVA 1-way (parametric) or Kruskal-Wallis (nonparametric) tests using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normal distribution of the data was analyzed with the Shapiro-Wilk test.

For antioxidant analysis of the fruit extract, results are presented as the mean of each determination ± standard deviation (SD). In vivo results are presented as the mean of each group (n = 3 for oxidative stress markers and gene expression, n = 4 for Western blot and immunohistochemical analysis) ± standard error of the mean (SEM). *p* < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Determination of Antioxidant Properties of *O. robusta* Fruit Extract

As shown in Table 1, the OR fruit extract showed a higher amount of total phenols (1330 ± 1.7 mg GAE/100 g dw) than flavonoids (1090 ± 0.9 mg CatE/100 g dw). With respect to the betalain content (641.1 ± 12.7), betacyanins showed a higher concentration (452.2 ± 9.0 mg BE/L) compared to that of betaxanthins (188.9 ± 3.7 IxE/L).

**Table 1.** Total phenols, flavonoids, betacyanins, betaxanthins and total betalain values in *O. robusta* extract.

MMA Extraction		H <sub>2</sub> O Extraction		
Total Phenols (mg GAE/100 g dw)	Total Flavonoids (mg CatE/100 g dw)	Betacyanins (mg BE/L)	Betaxanthins (mg IxE/L)	Total Betalains (mg betalains/L)
1330 ± 1.7	1090 ± 0.9	452.2 ± 9.0	188.9 ± 3.7	641.1 ± 12.7

Values represent the mean ± SD of three measurements; GAE—Gallic Acid Equivalents; CatE—Catechin Equivalents; BE—Betacyanin Equivalents; IxE—Indicaxanthin Equivalents; dw—dry weight.





In total, 50 tentative compounds, including 15 organo-oxygen compounds, 9 betalains, 9 betalains and 26 other compounds, were determined in the OR fruit extract. In Table 3, 12 compounds are listed for the positive ion mode, including the presence of vitamin C ( $m/z$  11.0387 and retention time of 5.197 min) and betalains: betalamic acid ( $m/z$  212.055), indicaxanthin ( $m/z$  309.0984), neobetanin ( $m/z$  549.1382), gomphrenin-I ( $m/z$  551.1633) and betanin ( $m/z$  551.1498). In Table 4, 22 compounds are listed for the negative ion mode, including phenols, such as 5-hydroxyconiferyl alcohol ( $m/z$  195.382), flavonoids, such as hesperetin 5-O-glucoside ( $m/z$  463.1337), and betalains, such as vulgaxanthin I ( $m/z$  384.1014).

**Table 3.** Compounds with biological activity identified in *O. robusta* extract in positive ion mode.

Compound	Formula	Adduct	$m/z$	Retention Time (min)
Oxanes				
1,5-Anhydro-D-fructose	$C_6H_{10}O_5$	M+H-H <sub>2</sub> O	145.0488	0.919
Cinnamic acids and derivatives				
Cinnamic acid	$C_9H_8O_2$	M+H-H <sub>2</sub> O	131.0495	14.037
Phenylpropanoic acids				
Hydrocinnamic acid	$C_9H_{10}O_2$	M+H-H <sub>2</sub> O	133.0641	16.460
Benzene and derivatives				
3,4-O-Dimethylgallic acid	$C_9H_{10}O_5$	M+NH <sub>4</sub>	216.0867	5.119
Indanes				
1-Indanone	$C_9H_8O$	M+H	133.0634	11.692
Vitamins				
Vitamin C	$C_6H_8O_6$	M+H	177.0397	5.197
Carboxylic acids and derivatives				
Betaine	$C_5H_{11}NO_2$	M+H	118.0821	0.919
Betalains				
Betalamic acid	$C_9H_9NO_5$	M+H	212.055	1.048
Indicaxanthin	$C_{14}H_{16}N_2O_6$	M+H	309.0984	8.830
Neobetanin	$C_{24}H_{24}N_2O_{13}$	M+H	549.1382	11.613
Gomphrenin-I	$C_{24}H_{26}N_2O_{13}$	M+H	551.1633	10.764
Betanin	$C_{24}H_{26}N_2O_{13}$	M+H	551.1498	9.887

**Table 4.** Compounds with biological activity identified in *O. robusta* extract in negative ion mode.

Compound	Formula	Adduct	$m/z$	Retention Time (min)
Lactones				
D-Glucaro-1,4-lactone	$C_6H_8O_7$	M-H	191.0223	1.616
Cinnamic acids and derivatives				
1-O-Sinapoylglucose	$C_{17}H_{22}O_{10}$	M-H	385.1205	11.743
Benzene and derivatives				
Vanillic acid	$C_8H_8O_4$	M-H	167.0382	7.284
2-O-Galloyl-1,4-galactarolactone	$C_{13}H_{12}O_{11}$	M+K-2H	380.9824	21.898
Carboxylic acids and derivatives				
2-O-Caffeoylhydroxycitric acid	$C_{15}H_{14}O_{11}$	M+Na-2H	391.0282	1.486
Organooxygen compounds				
Cis-5-Caffeoylquinic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	M+K-2H	391.0376	1.099
trans-o-Coumaric acid 2-glucoside	$C_{15}H_{18}O_8$	M+H-H <sub>2</sub> O	309.0968	6.176
trans-p-Coumaric acid 4-glucoside	$C_{15}H_{18}O_8$	M+H-H <sub>2</sub> O	309.0969	6.176
6-Caffeoylsucrose	$C_{21}H_{28}O_{14}$	M-H	503.138	7.902
Gentiobiosyl 2-methyl-6-oxo-2E,4E-heptadienoate	$C_{20}H_{30}O_{13}$	M-H	477.159	9.398
Glucocaffeic acid	$C_{15}H_{18}O_9$	M-H	341.0926	10.455
Coumarins and derivatives				
Rutaretin 9-rutinoside	$C_{26}H_{34}O_{14}$	M+FA-H	615.202	6.665
Fatty acyls				
1-Hexanol arabinosylglucoside	$C_{17}H_{32}O_{10}$	M+Na-2H	417.171	7.902



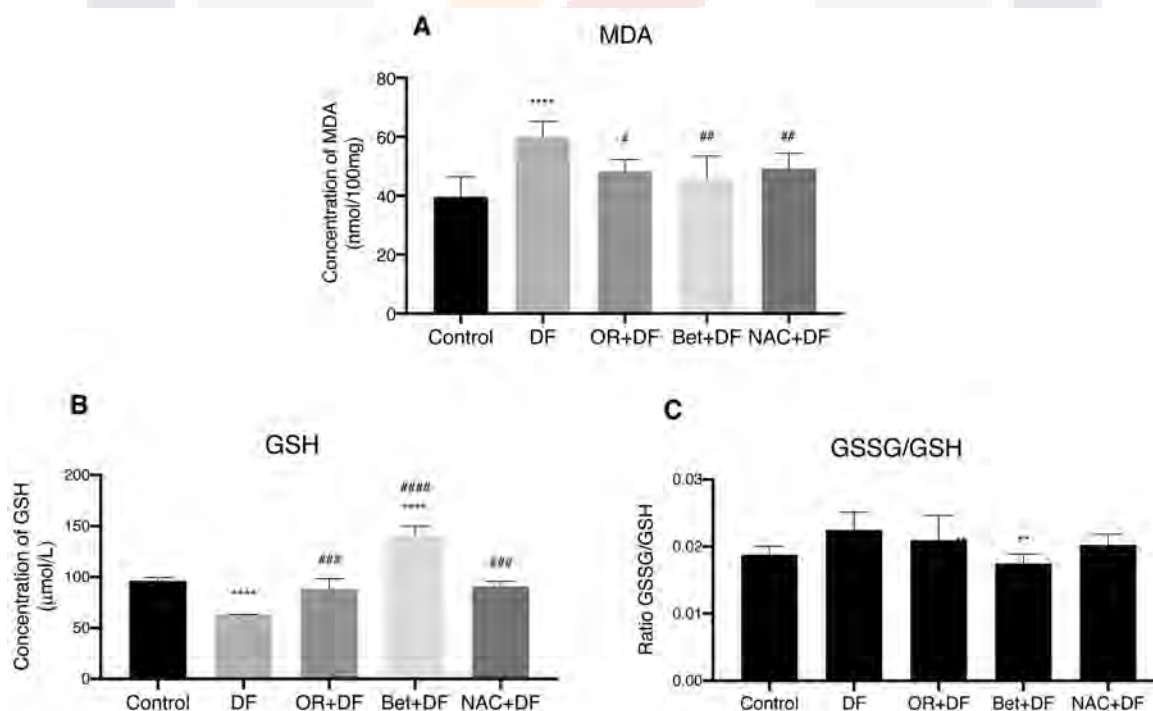
Table 4. Cont.

Compound	Formula	Adduct	<i>m/z</i>	Retention Time (min)
Flavonoids				
Hesperetin 5- <i>O</i> -glucoside	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	M-H	463.1337	9.038
Phenol lipids				
Caryoptosidic acid	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	M-H <sub>2</sub> O-H	373.119	9.578
Hydroxyisonobilin	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	M-H	361.1717	17.079
Furanoid lignans				
Divanillyltetrahydrofuran ferulate	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	M+FA-H	565.197	16.022
Phenols				
5-Hydroxyconiferyl alcohol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	M-H	195.0701	16.382
Betalains				
Betalamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	2M-H	211.0525	4.321
Vulgaxanthin I	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	M+FA-H	384.1014	6.744
Betanin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	2M-H	1099.287	7.852
Betalamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	M-H <sub>2</sub> O-H	192.0344	8.909

Other compounds with possible biological activity are listed in Supplementary Tables S2 and S3.

### 3.3. Biomarkers of Oxidative Stress

Figure 2 shows the oxidative stress biomarkers present in tissue homogenates. There was a significant increase of 50.85% in MDA levels in the group treated with DF (59.92 ± 5.33 nmol/100 mg) compared to those in the control group (39.72 ± 6.75 nmol/100 mg) ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A). Pretreatment with OR fruit extract, Bet and NAC followed by DF administration significantly reduced MDA levels (19.43% for OR + DF, 23.79% for Bet + DF and 17.84% for NAC + DF) compared to those with DF alone ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Oxidative stress biomarkers in livers of rats that received DF treatment and pretreatments with *O. robusta* extract (OR + DF), betanin (Bet + DF) and NAC (NAC + DF). (A) MDA concentrations, (B) GSH levels and (C) GSSG/GSH ratio. Bar graphs show the mean ( $n = 3$ ) ± SEM;  $p > 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs. control group. #:  $p \leq 0.05$ , ###:  $p \leq 0.01$ , ####:  $p \leq 0.001$ , #####:  $p \leq 0.0001$  vs. DF group.

DF administration induced a significant decrease in GSH concentrations (Figure 2B) of 65% ( $62.90 \pm 0.42 \mu\text{mol/L}$ ) compared to those in the control group ( $96.21 \pm 3.31 \mu\text{mol/L}$ ) ( $p < 0.05$ ). The prophylactic administration of OR, Bet and NAC maintained GSH concentrations at levels comparable to those in the control group with no statistical difference, but concentrations were significantly ( $p < 0.05$ ) higher (40.23, 124.2 and 44.25% respectively) when they were administered to the DF groups compared to those with DF alone. We also measured the ratio of GSSG to reduced GSH in the liver after DF challenge (Figure 2B), and there was a significant decrease in the DF group pretreated with Bet ( $141.03 \pm 8.63 \mu\text{mol/L}$ ) compared to that in the DF group.

### 3.4. Relative Expression of Genes Related to the Constitutive and Inducible Antioxidant Response

The relative gene expression of catalase was significantly decreased, compared to that in the control group, in the DF (0.8-fold;  $p < 0.0001$ ), OR + DF (0.8-fold;  $p < 0.001$ ), Bet + DF (0.9-fold;  $p < 0.0001$ ), NAC + DF (0.7-fold;  $p < 0.01$ ) and NAC (0.3-fold;  $p < 0.01$ ) groups (Figure 3A). *Sod1* showed a significant increase in its expression only in the OR group (0.9-fold higher;  $p < 0.001$ : Control vs. OR) (Figure 3B). *Sod2* expression was increased in the DF (6.3-fold;  $p < 0.01$ : Control vs. DF), OR + DF (10.4-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. OR + DF) and Bet + DF (6.9-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. Bet + DF) groups (Figure 3C). *Nrf2* expression was decreased in the DF (0.3-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. DF), OR + DF (0.6-fold;  $p < 0.05$ : Control vs. OR + DF), Bet + DF (0.7-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. Bet + DF), NC + DF (0.6-fold;  $p < 0.05$ : Control vs. NAC + DF) and NAC (0.4-fold;  $p < 0.01$ : Control vs. NAC) groups (Figure 3D). Heme-oxygenase 1 (*Hmox1*) expression was significantly induced in the DF (24.9-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. DF), OR + DF (15.7-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. OR + DF) and Bet + DF (4.7-fold;  $p < 0.05$ : Control vs. Bet + DF) groups (Figure 3E). The expression of NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (*Nqo1*) was significantly increased in the DF (2.7-fold;  $p < 0.001$ : Control vs. DF), OR + DF (5.5-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. OR + DF), Bet + DF (2-fold;  $p < 0.01$ : Control vs. Bet + DF) and Bet (2-fold;  $p < 0.05$ : Control vs. Bet) groups (Figure 3F). The expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*Gclc*) was significantly increased only in the group treated with DF (1.3-fold;  $p < 0.001$ : Control vs. DF). Finally, expression of the DNA damage-inducible growth arrest gene (*Gadd45a*) was significantly increased in the DF (2.3-fold;  $p < 0.001$ : Control vs. DF) and OR + DF (2.9-fold;  $p < 0.0001$ : Control vs. OR + DF) groups. No significant differences were observed in the relative expression of caspase-3 (*Casp3* gene) (Figure 3I).

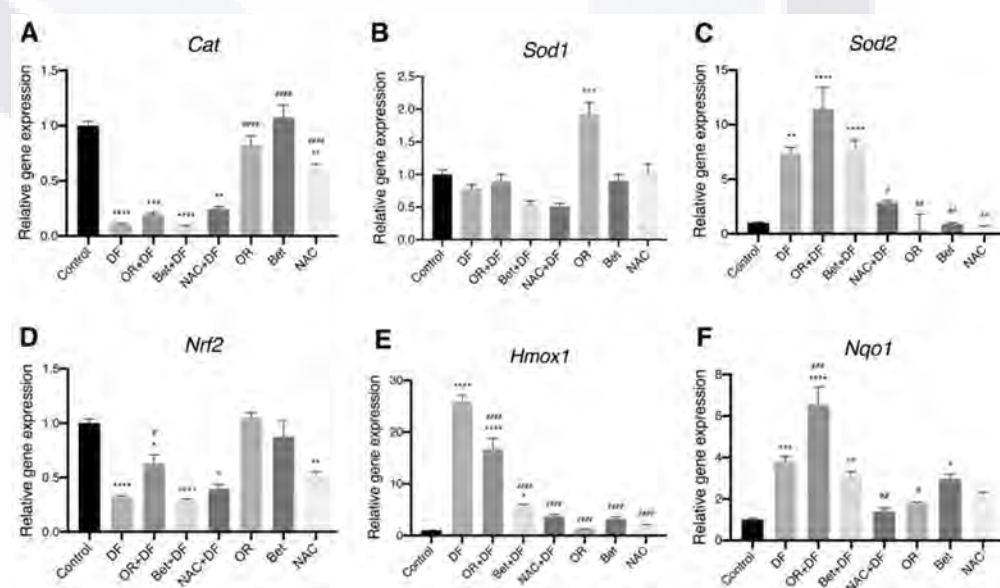
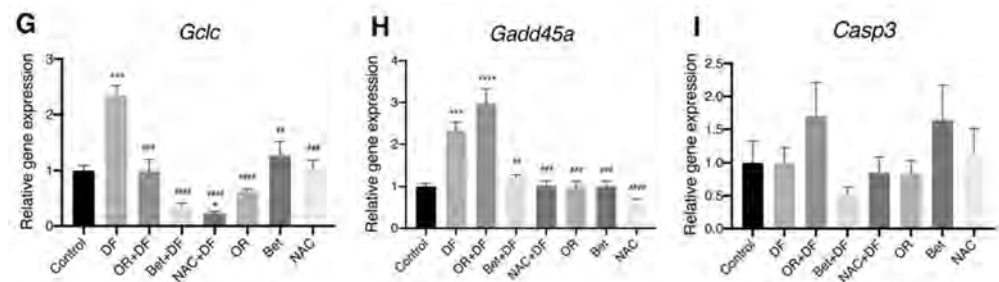


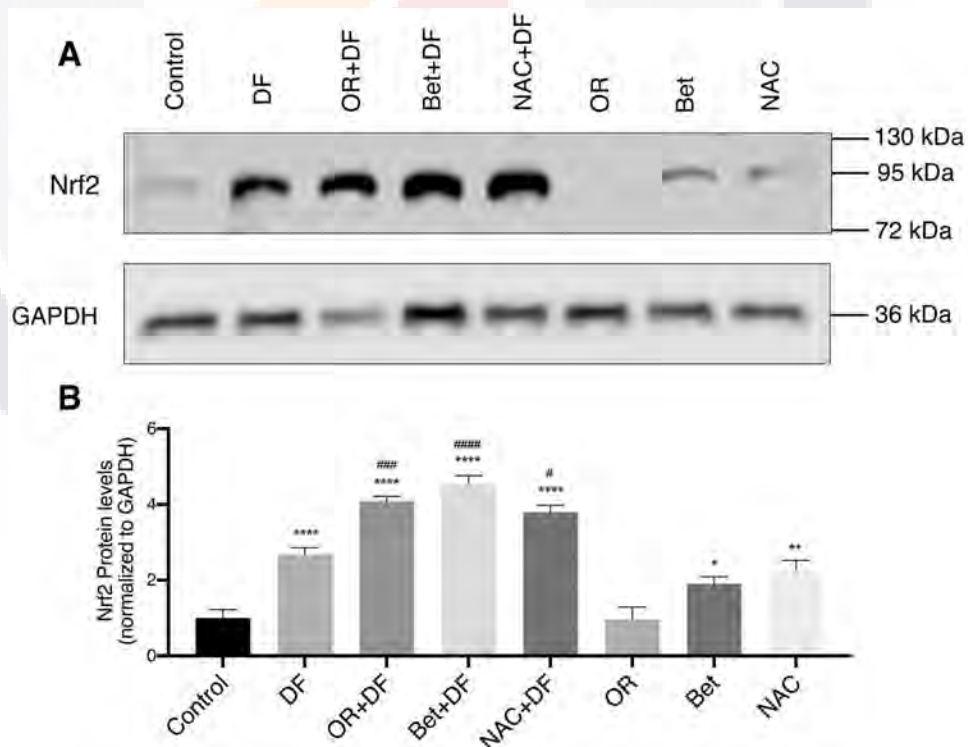
Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Relative gene expression of antioxidant genes: (A) *Cat*, (B) *Sod1*, (C) *Sod2*, detoxifying genes: (D) *Nrf2*, (E) *Hmox1*, (F) *Nqo1* and (G) *Gclc*, the DNA damage-inducible gene: (H) *Gadd45a* and the cell death gene (I): *Casp3* after DF treatment and OR, Bet and NAC treatments and pretreatments in rat livers. Bar graphs show the mean (n = 3) ± SEM;  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs. Control group. #:  $p \leq 0.05$ , ##:  $p \leq 0.01$ , ###:  $p \leq 0.001$ , ####:  $p \leq 0.0001$  vs. DF group.

### 3.5. Nrf2 Protein Expression

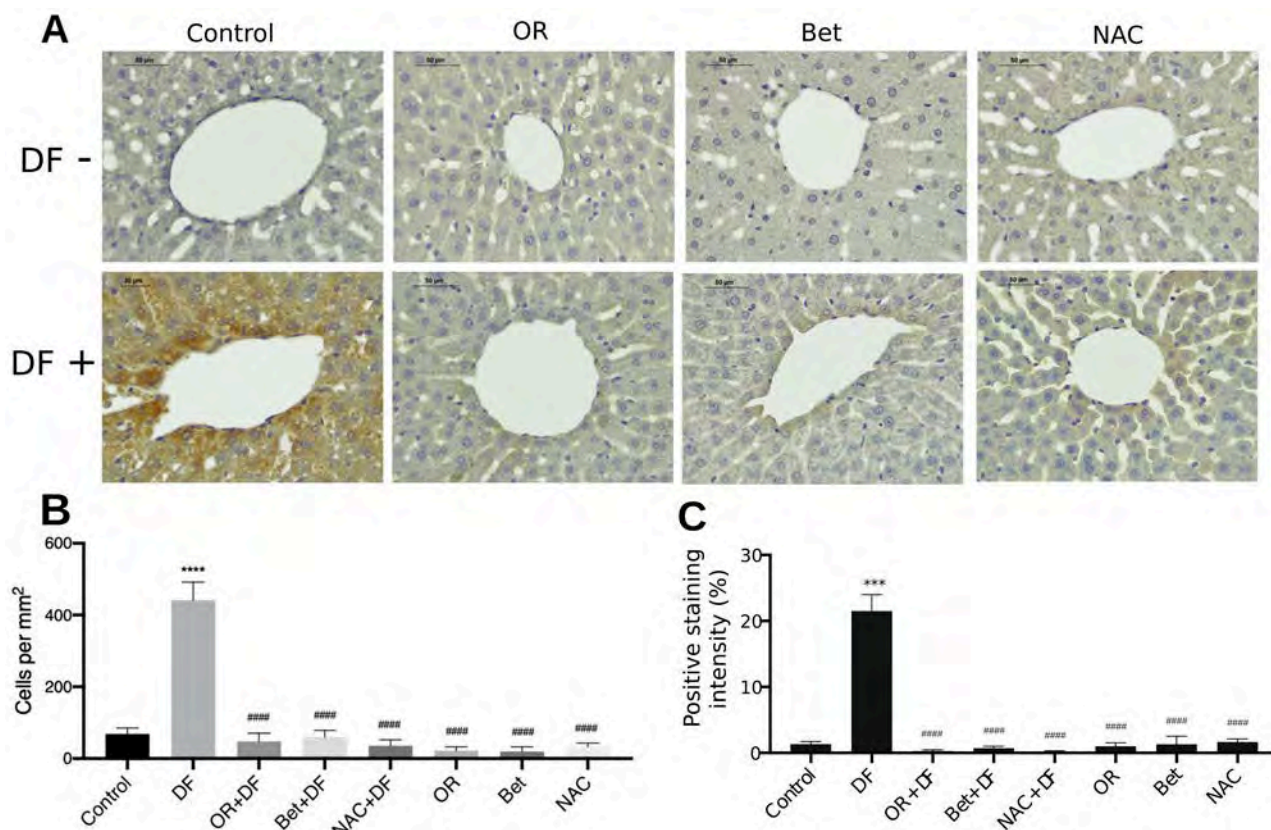
Figure 4A shows the Western blot for the Nrf2 protein in liver tissue. Densitometric analysis (Figure 4B) showed a significant increase in Nrf2 protein expression in the DF (1.6-fold;  $p < 0.0001$ ), OR + DF (3-fold;  $p < 0.0001$ ), Bet + DF (3.5-fold;  $p < 0.0001$ ), NAC + DF (2.7-fold;  $p < 0.0001$ ), Bet (0.9-fold;  $p < 0.05$ ) and NAC (1.2-fold;  $p < 0.001$ ) group, compared to that in the control group. It should be noted that the highest expression was observed in the OR + DF (1.4-fold,  $p < 0.001$ ), Bet + DF (1.8-fold,  $p < 0.0001$ ) and NAC + DF (1.1-fold,  $p < 0.05$ ) groups when compared to that in the DF group.



**Figure 4.** Western blot analysis and quantification of Nrf2 expression in rat liver after DF treatment and OR, Bet and NAC treatments and pretreatments in rat livers. (A) Nrf2 and GAPDH blots; (B) graphs showing the relative Nrf2 protein levels normalized to GAPDH from triplicate samples. Bar graphs show the mean (n = 4) ± SEM;  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs. Control group. #:  $p \leq 0.05$ , ###:  $p \leq 0.001$ , ####:  $p \leq 0.0001$  vs. DF group.

### 3.6. Apoptosis and Active Caspase-3 Evaluation

Immunohistochemical analysis showed a significant increase in the number of active caspase-3-positive cells (641%) in the group treated with diclofenac, equivalent to 441 cells on average/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5A,B), with an increase in reaction intensity of 20.15% ( $p < 0.0001$ ) (Figure 5C) with respect to that in the control group (69 cells/mm<sup>2</sup>). The groups treated prophylactically with OR fruit extract, Bet and NAC showed a number of active caspase-3 positive cells similar to that in the control group, with mean values of 48, 60 and 36 (cells/mm<sup>2</sup>), respectively.



**Figure 5.** Immunohistochemical staining and quantification of active caspase-3 in rat liver after DF treatment and OR, Bet and NAC treatments and pretreatments in rat livers. (A) Representative tissue sections are shown. 400 $\times$ . Scale bar = 30  $\mu$ m. (B,C) Photographs of 18–22 fields (1.25 mm<sup>2</sup>) per group were taken, and the number of positive hepatocytes was determined, in addition to the intensity of the reaction area, using NIH ImageJ ver 2.3.0/1.530 software. Bar graphs show the mean (n = 4)  $\pm$  SEM. Control group.  $p > 0.05$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$  vs. Control group. ####:  $p \leq 0.0001$  vs. DF group.

## 4. Discussion

Phytochemicals are bioactive compounds that have beneficial effects on health. Their biological activity depends on their chemical structure, and they occur in a variety of foods. The nutraceutical value of a food is based on the amount and type of phytochemicals it contains [52]. It has been reported that OR pulp contains antioxidants, such as phenolics, flavonoids, ascorbic acid (vitamin C) and betalains [17,38,43].

In our study, the amount of phenolic compounds obtained (1330  $\pm$  1.7 mg GAE/100 g dw) in the OR fruit extract was similar to that reported by pulido-Hornedo et al. [7] and higher than that in *O. ficus-indica* (89.2  $\pm$  3.6 mg GAE/100 g) [53] and *O. streptacantha* (104.66  $\pm$  1.51 mg GAE/100 g) [54]. Phenolic compounds are phytochemicals that have an aromatic ring with at least one hydroxyl substituent (phenol), which gives them important



antioxidant characteristics. The three main mechanisms of action are derived from their direct reaction with free radicals: (1) the transfer of a hydrogen atom (HAT), (2) single electron transfer (SET), and (3) chelation of free metal ions, such as Fe(III). Based on these interactions, an antioxidant can act as a scavenger when the final product generates another less reactive radical or as a quencher when it completely neutralizes the radical, generating stable molecules [55].

Flavonoids are phenols widely distributed in plant foods, and their concentration ( $1090 \pm 0.9$  mg CatE/100 g dw) in the OR fruit extract was higher than that reported for OR pulp ( $793$  mg CAE/100 g dw) [7] or *O. ficus-indica* (red cultivar,  $35.19 \pm 2.08$  mg CATE/100 g dw) [56]. The basic structure of these compounds is the flavan nucleus (2-phenyl-benzo-c-pyran) and a system of two benzene rings (A and B) linked by an oxygen-containing pyran ring (C), which gives rise to the subclasses: flavones, isoflavonones, flavanols, flavonols and flavanones. These phytochemicals can inhibit the enzyme nitric oxide synthase (NOS) that generates the nitric oxide radical ( $\bullet$ NO), preventing the formation of radicals, such as peroxynitrite, which is highly reactive with essential macromolecules [57].

The high concentrations of betacyanins ( $452.2 \pm 9.0$  mg BE/L) and betaxanthins ( $188.90 \pm 3.69$  mg IxE/L) in the OR fruit extract coincide with previous reports [7,17]. Betalains are a group of pigments that occur in 13 families of Caryophyllales, including the Cactaceae family [58]. These ammonium derivatives of betalamic acid are divided into betacyanins, responsible for the red–purple coloration ( $\lambda \approx 535$  nm), and betaxanthins, responsible for the yellow coloration ( $\lambda \approx 480$  nm) [59]. These pigments are more abundant in the fruits with red–purple colorations. Our results confirm that the OR fruit has the highest concentrations of betalains, mainly betacyanins, within the Cacti family [17]. Czapski et al. [60] suggest a strong correlation between antioxidant capacity and red pigment content; therefore, OR fruit represents a rich source of antioxidant pigments.

Since the initial analysis of phytochemicals showed that the OR extract is a rich source of betalains, molecular analysis was performed via UPLC-QTOF-MS/MS. Betalamic acid was identified, and this compound has been reported in *O. ficus-indica* [61] and *O. stricta* [8]; its antioxidant activity is due to the fact that it reduces two Fe(III) ions into Fe(II) [62], preventing the Fenton reaction and the generation of the hydroxyl radical ( $\bullet$ OH). Two betaxanthins were also identified: indicaxanthin and vulgaxanthin I. These pigments are the product of the condensation of betalamic acid with amines or their derivatives [58], and it has been suggested that their antioxidant activity is due the presence of 2-3 imino groups (=NH) and 1-2 hydroxyl groups (-OH) in the amines or amino acid moiety [63].

Indicaxanthin is found in large quantities in *O. ficus-indica* [64], and in addition to its antioxidant activity, it has been shown in in vitro studies: (1) to modulate the expression of the intercellular adhesion molecule ICAM-1 in human umbilical vein endothelial cells [65]; (2) to prevent atherogenic formation by inhibiting the overexpression of NADPH oxidase 4 (NOX-4); (3) to inhibit the activation of nuclear enhancing factor of NF- $\kappa$ B; and (4) to prevent the apoptosis of cells of a human monocytic cell line (THP-1) [40]. Vulgaxanthin I has been found in *O. ficus-indica* and *Beta vulgaris* (yellow beet) and in Amaranthaceae [21,63,66].

Betacyanins are divided into betanin-type, gomphrenin-type and amaranthine-type. Gomphrenin-I has been reported in species, such as *Gomphrena globosa* [67], and was reported for the first time in *O. robusta* by Stintzing et al. (2005) [66]. It has a chemical structure similar to that of betanin, and it has been suggested that its high antioxidant capacity is due to the presence of the -OH group at carbon 5 of betanidin (general structure of betacyanins), unlike betanin, which presents it at C-6 [63,68]. Likewise, the UPLC-QTOF-MS/MS analysis showed the presence of betanin in OR fruit extract, consistent with previous reports [17,21,69]. Other studies show the same fragmentation pattern (parent ion  $m/z$  551.19 and daughter ion  $m/z$  389.13) for species such as *B. vulgaris* [70], *Hylocereus polyrhizus* [71] and *O ficus-indica* [61]. The antioxidant effects of betanin have been widely described: the inhibition of lipoperoxidation and LDL [64,72–74], as well as the increase in GSH synthesis [59]. It has been reported that the antioxidant activity of betanin is due to its capacity to donate electrons and hydrogen atoms, which comes from the phenolic hydroxyl



group attached to C-6. The resulting product is a betanin radical that can be broken down into betalamic acid and the stable cyclo-DOPA 5-O-B-glucoside radical [75].

The presence of vitamin C is in line with what has been reported previously for OR [38]. Recently, Pulido-Hornedo et al. [7] quantified vitamin C (141.14 mg/100 g) in the OR fruit extract via HPLC-UV. This vitamin is part of a series of redox cycles in which non-enzymatic reducers (vitamin E, glutathione and NADPH) and enzymatic reducers (glutaredoxin and glutathione reductase) participate, stopping the propagation of peroxidative processes and repairing peroxidized lipids in biological membranes [76,77]. On the other hand, it neutralizes ROS, such as superoxide anion and hydroxyl radical [78].

Phenolic acids are phenols that have a carboxylic acid functionality that depending on the constitutive carbon framework they contain are divided into hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic acids [79]. We identified 3,4-*O*-dimethylgallic acid ( $m/z$  216.08) and cinnamic acid ( $m/z$  131.04), 2-*O*-galloyl-1,4-galactarolactone ( $m/z$  380.98) and vanillic acid ( $m/z$  167.03), which are compounds for which the antioxidant capacity is due to the number and position of the phenolic hydroxyl groups, in addition to the methoxy and carboxylic acid groups [80]. Likewise, 5-hydroxyconiferyl alcohol was identified, which is an intermediate in the synthesis of lignans; its antioxidant activity has been described, although little has been explored [81–83]. The flavonoid identified, hesperetin 5-*O*-glucoside ( $m/z$  463.13), has antidiabetic activity owing to its glycosylated portion at the C-5 position [84].

Antioxidant activity is one of the most described biological effects of phytochemicals, determined using in vitro assays where the ability to quench radicals, such as ABTS<sup>•+</sup> and DPPH, is measured [63,64], as well as reducing ferric ions [85]. In the present study, the OR fruit extract showed a higher antioxidant capacity ( $102.6 \pm 5.2$   $\mu\text{mol TE/g dw}$ ) in the ABTS<sup>•+</sup> assay compared to that reported for the OR pulp ( $62.2 \pm 5.0$   $\mu\text{mol TE/g dw}$ ) [7] and the Spanish prickly pear *O. ficus-indica*, ( $6.70 \pm 0.73$   $\mu\text{mol TE/g}$ ) [86]. Likewise, the value obtained ( $30.09 \pm 1.4$   $\mu\text{mol TE/g dw}$ ) in the DPPH assay was higher than that reported for the Spanish prickly pear ( $5.22 \pm 0.89$   $\mu\text{mol TE/g}$ ) [86], indicating that the phytochemicals in the OR fruit extract are good electron and hydrogen atom donors. The FRAP assay value of the OR fruit extract ( $95.8 \pm 7.3$   $\mu\text{mol TE/g dw}$ ) was higher than that of the OR pulp ( $62.2 \pm 5.0$   $\mu\text{mol TE/g}$ ) [7] and less than that of the ethyl ethanolic extract of blueberry (*Rubus* spp.):  $258.9 \pm 11.69$   $\mu\text{mol TE/g}$  [87].

Our results suggest through the different antioxidant mechanisms described that the beneficial effects of the OR fruit extract can be attributed to the biological diversity of phytochemicals present in the fruit, apart from betanin, such as gomphrenin I, vulgaxanthin I, indicaxanthin and phenolic acids, as well as other important bioactive compounds that have not been studied in detail (Supplemental Tables 2 and 3).

In our in vivo model, the OR fruit extract protected the liver from damage caused by a high dose of diclofenac (DF). The hydroxylation of DF, mediated by the cytochrome P450 enzymes CYP2C9 and CYP3A4 [34,39], generates the metabolites 4'-OH-DF and 5-OH-DF, respectively, which can be oxidized to form the electrophilic intermediates DF-1,4'-iminoquinone and DF-2,5-iminoquinone [37] and induces redox cycles that increase ROS, RNS generation and cellular oxidative stress [35–37]. ROS (e.g.,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet\text{OH}$ ) can initiate lipid peroxidation that results in the formation of lipid aldehydes, such as malondialdehyde (MDA) [88]. In our model, prophylactic administration with the antioxidants OR, Bet and NAC decreased the concentration of MDA to a level comparable to that in the control group, indicating that they prevent lipid peroxidation caused by the reactive metabolites derived from DF. In another study, a decrease in hepatic MDA levels was also reported after pretreatment with OR in a model of acute hepatotoxicity induced by APAP [17].

Reduced glutathione (GSH) is a non-enzymatic endogenous antioxidant that maintains the redox balance [89], and its oxidized form (GSSG) increases under oxidative stress. The bioactive compounds of the OR fruit extract can directly interact with GSSG and reduce it to GSH. Esatbeyoglu et al. [90] suggested that betanin induces GSH synthesis via the Nrf2 pathway, which explains the high hepatic concentrations of GSH in the group

pretreated with betanin. GSH is an important antioxidant since it is also a substrate for glutathione peroxidase (GPx), which reduces lipid hydroperoxide radicals into hydroxy-fatty acids. Likewise, this reaction causes the reduction of vitamin C, which in turn reduces vitamin E [76,91].

The antioxidant enzymes CAT, SOD1 and SOD2 are constitutively expressed in peroxisomes, the cytoplasm and mitochondria, respectively. In our study, the increase in gene expression of the enzyme *Sod2* in the group treated with DF shows that this drug induces mitochondrial injury by increasing the generation of superoxide anions [35,37]. We show that the OR fruit extract protects against this oxidative damage by increasing the expression of *Sod2*, in line with previous in vitro studies [39]. *Sod2* gene expression is regulated by transcription factors such as NF- $\kappa$ B and Nrf2, important regulators of the antioxidant response. In basal conditions, Nrf2 is inactive in the cytosol and bound to Keap1. Nrf2 activators cause its uncoupling from Keap1 via different pathways, the most important one being the oxidation of Keap1 cysteine residues mediated by electrophilic compounds and other oxidants [92]. Although a decrease in *Nrf2* gene expression was observed, our Western blot results show its post-translational activation. Once uncoupled from Keap1, Nrf2 translocates to the nucleus where it heterodimerizes with sMaf proteins and binds to electrophilic response gene (EpRE) motifs that encode detoxifying enzymes (e.g., *Nqo1*), antioxidant enzymes (e.g., *Sod2*, *Cat*), heme detoxifying enzymes (e.g., *Hmox1*) and enzymes involved in GSH synthesis (e.g., *Gclc*) [93,94].

Bioactive compounds are also capable of activating and/or enhancing cellular antioxidant responses. It has been reported that betanin induces the antioxidant response mediated by the Nrf2 pathway and its downstream proteins NQO1 (*Nqo1* gene) and HO-1 (*Hmox1* gene) in HepG2 hepatoma cells [90], as well as the induction of phase II detoxifying enzymes, such as glutathione S-transferase P (GSTP), glutathione S-transferase mu (GSTM) and NQO1, via the activation of mitogen-activated protein kinases [41]. In another study, polysaccharides, extracted from the cladode of *O. milpa alta*, protected pancreatic  $\beta$ -cells against alloxan-induced apoptosis and oxidative stress via the Nrf2-mediated induction of  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCSs) [95]. We have previously evaluated the effect of OR fruit extract on *Sod2*, *Hmox1* and *Gclc* gene expression in an in vivo model of APA-induced acute hepatotoxicity [17]. In this study, we observed that pretreatment with OR fruit extract increased the expression of the *Sod2*, *Hmox1* and *Nqo1* genes via the post-translational activation of Nrf2. As expected, acute DF toxicity induced the activation of Nrf2; however, the protein levels of Nrf2 were higher in the groups subjected to prophylactic treatments with OR, Bet and NAC, with Bet being the antioxidant that induced the highest expression levels of Nrf2.

*Hmox1* is a downstream target gene of Nrf2. It encodes a protein that catalyzes the oxidative degradation of the heme group, resulting in the generation of anti-inflammatory and cytoprotective products: bilirubin, biliverdin and CO [90,96]. Under stress conditions, the induction of *Hmox1* expression is modulated by intracellular GSH depletion [97–99]. Our results showed an increase in the expression of *Hmox1* in the DF group and a significant diminution after pretreatments with OR, Bet and NAC, similar to that reported with APAP-induced liver injury [17]. As previously described, GSH levels decreased in the group treated with DF, while they were restored in the groups that received the prophylactic treatments (OR + DF, Bet + DF, NAC + DF).

In our study, the prophylactic administration of OR fruit extract induced high expression of *Nqo1*, indicating that iminoquinones are one of the major metabolites generated from DF and that OR fruit extract can detoxify these metabolites. Iminoquinones are capable of damaging proteins and other biomolecules. The protein that *Nqo1* encodes is responsible for catalyzing the reduction of quinones to hydroquinones, facilitating their excretion [41].

In order to elucidate whether antioxidants present in OR fruit extract induce GSH synthesis, the expression of *Gclc*, the gene that encodes the enzyme that is important for GSH synthesis, was determined [100]. No significant changes in the expression of this gene were observed. These results indicate that the OR fruit extract has different mechanisms of

action and that the biocomponents that it contains can act directly on the reactive chemical species and/or directly restore GSSG to its reduced state (GSH). On the other hand, since the prophylactic administration of Bet resulted in a significant increase in hepatic GSH concentrations, it is likely that this component can also induce its synthesis [90].

We recently reported that OR fruit extract protects against apoptotic cell death in a model of hepatocyte injury [39]. Our present results are in line with this cytoprotective effect. Although no differences were observed in the gene expression of caspase-3 in the experimental groups, our immunohistochemical analysis showed a significant increase in the number of cells positive for active caspase-3 in the group treated with DF. In normal conditions, caspase proteins are present as inactive procaspases [101]. The increase in the number of caspase-3-positive cells demonstrates increased apoptotic cell death in the DF toxicity model. DNA damage can activate apoptosis, which can be caused by the peroxynitrite radical (ONOO<sup>-</sup>) [102].

Ferroptosis is a type of cell death related to an increase in Fe<sup>2+</sup>, the Fenton reaction that produces the •OH radical, lipid peroxidation, GSH depletion and induction of the Nrf2-mediated antioxidant response [103–108]. Our results suggest that the OR extract may have a protective effect against this type of death due to the chelating power of iron, the decrease in MDA, the restoration of GSG and the increase in the expression of Nrf2 and Nqo1 [107,108].

Cells have DNA damage-sensing mechanisms. One of these is the DNA damage-inducible growth arrest gene (*Gadd45a*), which was induced by the prophylactic administration of OR fruit extract. *Gadd45a* expression is rapid and dose-dependent, and it has been reported to be involved in DNA repair [109,110]. This gene can be induced via different pathways, one of them being mediated by p53. Since we previously reported that OR fruit extract downregulates the expression of p53 in vitro [39], it is suggested that in the present study, the regulation of GADD45a by OR fruit extract is mediated by a p53-independent pathway, e.g., via the MAP kinase pathway [110].

According to our results, the mechanisms underlying OR extract activity that provide hepatoprotection against oxidative stress are as follows: (1) chelation of iron and thus prevention of the Fenton reaction and lipid peroxide formation, (2) promotion of the reduction of peroxidized lipids (L-OOH) to lipid alcohols (L-OH) by restoring GSH levels, (3) direct interactions with ROS as scavengers or quenchers, (4) induction of the expression of antioxidant response genes regulated by Nrf2, and (5) prevention of cell death mediated by apoptosis and possibly by ferroptosis.

Our study did not address iDILI caused by DF, and it did not explore risk factors that increase the development of liver damage due to DF consumption, due to age and the presence of previous pathologies, such as diabetes and hypertension present in a significant sector of the population older than 60 years, in which there is an increase in the incidence of liver damage caused by DF. However, cellular oxidative stress is a key factor involved in the pathogenesis of DILI, which was addressed in this study.

## 5. Conclusions

We observed that OR fruit extract is a rich source of beneficial, health promoting biological compounds with strong antioxidant and cytoprotective effects against mitochondrial damage and oxidative stress generated by DF. Both Bet and OR fruit extract exert their effects via a direct interaction with reactive species, the restoration of GSH levels and indirect effects via the regulation of genes involved in the antioxidant response mediated by Nrf2. The protective effects of the OR fruit extract and betanin are similar to those of NAC, which is currently used to treat acute liver injury, suggesting its potential use in clinical practice as a complement or alternative to treat acute liver injury related to cellular oxidative stress.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12010113/s1>, Table S1: Primer sequences for RT-PCR; Table S2: Compounds identified in *O. robusta* extract in positive ion mode; Table S3: Compounds identified in *O. robusta* extract in negative ion mode.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.S.V.-J., H.M., H.A.G.-P. and M.C.M.-S.; methodology, G.S.V.-J., H.A.G.-P., M.B.-H., F.G.-L., E.S.-A., S.L.M.-H., J.V.-J., M.H.M.-O. and M.C.M.-S.; software, G.S.V.-J. and H.A.G.-P.; validation, G.S.V.-J., F.G.-L., S.L.M.-H., J.V.-J., M.H.M.-O. and M.C.M.-S.; formal analysis, G.S.V.-J., H.A.G.-P., F.G.-L. and M.C.M.-S.; investigation, G.S.V.-J., H.A.G.-P. and M.C.M.-S.; resources, M.C.M.-S.; data curation G.S.V.-J. and H.A.G.-P.; writing—original draft preparation, G.S.V.-J.; writing—review and editing, H.M., F.J.A.-G., H.A.G.-P., F.G.-L., E.S.-A., S.L.M.-H., J.V.-J., M.H.M.-O. and M.C.M.-S.; visualization, G.S.V.-J., H.A.G.-P., F.G.-L., E.S.-A., S.L.M.-H., J.V.-J., M.H.M.-O. and M.C.M.-S.; project administration, F.J.A.-G. and M.C.M.-S.; funding acquisition, M.C.M.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Gloria Stephanie Villa Jaimes was supported by a doctoral grant from CONACYT, no. 715428, and internal support by the Universidad Autónoma de Aguascalientes with key project PIT19-2.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study was conducted according to the guidelines of the Ethics Committee of Universidad Autónoma de Aguascalientes: Comité de Ética para el uso de Animales en la docencia e Investigación (CECAD), protocol code: PIT19-2.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All of the data is contained within the article and the supplementary materials.

**Acknowledgments:** To Fernando Abiram García García, Andres Quezada Duron and Yunuen Reyes Castro for their technical and academic support.

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

## References

1. Conaculta. *People of Corn Mexico's Ancestral Cuisine*; Conaculta: Mexico City, Mexico, 2004.
2. Zizumbo-Villarreal, D.; Flores-Silva, A.; Colunga-García, P.M. The Archaic Diet in Mesoamerica: Incentive for Milpa Development and Species Domestication. *Econ. Bot.* **2012**, *66*, 328–343. [[CrossRef](#)]
3. Torres-Maravilla, E.; Méndez-Trujillo, V.; Hernández-Delgado, N.C.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Reyes-Pavón, D. Looking inside Mexican Traditional Food as Sources of Synbiotics for Developing Novel Functional Products. *Fermentation* **2022**, *8*, 123. [[CrossRef](#)]
4. Sipango, N.; Ravhuhali, K.E.; Sebola, N.A.; Hawu, O.; Mabelebele, M.; Mokoboki, H.K.; Moyo, B. Prickly Pear (*Opuntia* spp.) as an Invasive Species and a Potential Fodder Resource for Ruminant Animals. *Sustainability* **2022**, *14*, 3719. [[CrossRef](#)]
5. Illoldi-Rangel, P.; Ciarleglio, M.; Sheinvar, L.; Linaje, M.; Sánchez-Cordero, V.; Sarkar, S. *Opuntia* in México: Identifying Priority Areas for Conserving Biodiversity in a Multi-Use Landscape. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Madrigal-Santillán, E.; Portillo-Reyes, J.; Madrigal-Bujaidar, E.; Sánchez-Gutiérrez, M.; Mercado-Gonzalez, P.E.; Izquierdo-Vega, J.A.; Vargas-Mendoza, N.; Álvarez-González, I.; Fregoso-Aguilar, T.; Delgado-Olivares, L.; et al. *Opuntia* genus in Human Health: A Comprehensive Summary on Its Pharmacological, Therapeutic and Preventive Properties. Part 1. *Horticulturae* **2022**, *8*, 88. [[CrossRef](#)]
7. 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**, *10*, 1757. [[CrossRef](#)]
8. Castellar, R.; Obón, J.M.; Alacid, M.; Fernández-López, J.A. Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2772–2776. [[CrossRef](#)]
9. Chauhan, S.P.; Sheth, N.R.; Rathod, I.S.; Suhagia, B.N.; Maradia, R.B. Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochem. Rev.* **2012**, *12*, 35–45. [[CrossRef](#)]
10. Attanzio, A.; Tesoriere, L.; Vasto, S.; Pintaudi, A.M.; Livrea, M.A.; Allegra, M. Short-term cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] fruit supplementation ameliorates the inflammatory profile and is associated with improved antioxidant status among healthy humans. *Food Nutr. Res.* **2018**, *62*. [[CrossRef](#)]
11. Wolfram, R.M.; Kritz, H.; Efthimiou, Y.; Stomatopoulos, J.; Sinzinger, H. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia—a pilot study. *Wien Klin Wochenschr.* **2002**, *114*, 840–846.
12. Allegra, M.; D'Acquisto, F.; Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Livrea, M.A. Pro-oxidant activity of indicaxanthin from *Opuntia ficus indica* modulates arachidonate metabolism and prostaglandin synthesis through lipid peroxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 892–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



13. Silva, D.V.T.D.; Baiao, D.D.S.; Ferreira, V.F.; Paschoalin, V.M.F. Betanin as a multipath oxidative stress and inflammation modulator: A beetroot pigment with protective effects on cardiovascular disease pathogenesis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *62*, 539–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chavez-Santoscoy, R.A.; Gutierrez-Urbe, J.A.; Serna-Saldívar, S.O. 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](#)] [[PubMed](#)]
15. Hahm, S.W.; Park, J.; Oh, S.Y.; Lee, C.W.; Park, K.Y.; Kim, H.; Son, Y.S. Anticancer properties of extracts from *Opuntia humifusa* against human cervical carcinoma cells. *J. Med. Food.* **2015**, *18*, 31–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Allegra, M.; De Cicco, P.; Ercolano, G.; Attanzio, A.; Busà, R.; Cirino, G.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A.; Ianaro, A. Indicaxanthin from *Opuntia ficus indica* (L. Mill) impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor progression. *Phytomedicine* **2018**, *50*, 19–24. [[CrossRef](#)]
17. 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*, 09461. [[CrossRef](#)]
18. Tsafantakis, N.; Katsanou, E.S.; Kyriakopoulou, K.; Psarou, E.-C.; Raptaki, I.; Skaltsounis, A.L.; Audebert, M.; Machera, K.A.; Fokialakis, N. Comparative UHPLC-HRMS Profiling, Toxicological Assessment, and Protection Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Genotoxicity of Different Parts of *Opuntia ficus indica*. *J. Med. Food* **2019**, *22*, 1280–1293. [[CrossRef](#)]
19. Walters, M.; Figueiredo, E.; Crouch, N.; Winter, P.; Smith, G.; Zimmermann, H.; Mashope-Potgieter, B. *Naturalised and Invasive Succulents of Southern Africa*; SANBI: Cape Town, South Africa, 2011.
20. Kivrak, Ş.; Kivrak, İ.; Karababa, E. Analytical evaluation of phenolic compounds and minerals of *Opuntia robusta* J.C. Wendl. and *Opuntia ficus-barbarica* A. Berger. *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 229–241. [[CrossRef](#)]
21. Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2302–2307. [[CrossRef](#)]
22. Altman, R.; Bosch, B.; Brune, K.; Patrignani, P.; Young, C. Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. *Drugs* **2015**, *75*, 859–877. [[CrossRef](#)]
23. Conaghan, P.G. A turbulent decade for NSAIDs: Update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol. Int.* **2011**, *32*, 1491–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Freytag, A.; Quinzler, R.; Freitag, M.; Bickel, H.; Fuchs, A.; Hansen, H.; Hoefels, S.; König, H.-H.; Mergenthal, K.; Riedel-Heller, S.; et al. Gebrauch und potenzielle Risiken durch nicht verschreibungspflichtige Schmerzmittel. *Schmerz* **2014**, *28*, 175–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grillo, M.P.; Ma, J.; Teffera, Y.; Waldon, D.J. A Novel Bioactivation Pathway for 2-[2-(2,6-Dichlorophenyl)aminophenyl]ethanoic Acid (Diclofenac) Initiated by Cytochrome P450-Mediated Oxidative Decarboxylation. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1740–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bjarnason, I. Gastrointestinal safety of NSAIDs and over-the-counter analgesics. *Int. J. Clin. Pract.* **2013**, *67*, 37–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Andrade, R.J.; Chalasani, N.; Björnsson, E.S.; Suzuki, A.; Kullak-Ublick, G.A.; Watkins, P.B.; Devarbhavi, H.; Merz, M.; Lucena, M.I.; Kaplowitz, N.; et al. Drug-induced liver injury. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dragoi, D.; Benesic, A.; Pichler, G.; Kulak, N.A.; Bartsch, H.S.; Gerbes, A.L. Proteomics Analysis of Monocyte-Derived Hepatocyte-Like Cells Identifies Integrin Beta 3 as a Specific Biomarker for Drug-Induced Liver Injury by Diclofenac. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 699. [[CrossRef](#)]
29. Teschke, R. Top-ranking drugs out of 3312 drug-induced liver injury cases evaluated by the Roussel Uclaf Causality Assessment Method. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, *14*, 1169–1187. [[CrossRef](#)]
30. Teschke, R.; Danan, G. Worldwide Use of RUCAM for Causality Assessment in 81,856 Idiosyncratic DILI and 14,029 HILI Cases Published 1993–Mid 2020: A Comprehensive Analysis. *Medicines* **2020**, *7*, 62. [[CrossRef](#)]
31. Björnsson, E.; Olsson, R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **2005**, *42*, 481–489. [[CrossRef](#)]
32. Andrade, R.J.; Lucena, M.I.; Fernández, M.C.; Pelaez, G.; Pachkoria, K.; García-Ruiz, E.; García-Muñoz, B.; González-Grande, R.; Pizarro, A.; Durán, J.A.; et al. Drug-Induced Liver Injury: An Analysis of 461 Incidences Submitted to the Spanish Registry Over a 10-Year Period. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 512–521. [[CrossRef](#)]
33. Andrade, R.J.; Lucena, M.I.; Kaplowitz, N.; García-Muñoz, B.; Borraz, Y.; Pachkoria, K.; García-Cortés, M.; Fernández, M.C.; Pelaez, G.; Rodrigo, L.; et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* **2006**, *44*, 1581–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. González-Ponce, H.A.; Rincón-Sánchez, A.R.; 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](#)]
35. Boelsterli, U.A. Diclofenac-induced liver injury: A paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *192*, 307–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



36. Syed, M.; Skonberg, C.; Hansen, S.H. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicol. Vitro*. **2016**, *31*, 93–102. [CrossRef]
37. Tang, W. The Metabolism of Diclofenac-Enzymology and Toxicology Perspectives. *Curr. Drug Metab.* **2003**, *4*, 319–329. [CrossRef]
38. 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]
39. 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. 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]
40. Tesoriere, L.; Attanzio, A.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M.A. Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and oxidative stress. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 230–240. [CrossRef]
41. Krajka-Kuźniak, V.; Paluszczak, J.; Szaefer, H.; Baer-Dubowska, W. Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 2138–2149. [CrossRef]
42. Osorio-Esquivel, O.; Moreno, A.O.; Álvarez, V.B.; Dorantes-Álvarez, L.; Giusti, M.M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2160–2168. [CrossRef]
43. 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**, *12*, 6452–6468. [CrossRef]
44. Yap, C.H.; Junit, S.M.; Aziz, A.A.; Kong, K.W. Multiple extraction conditions to produce phytochemical- and antioxidant-rich *Alternanthera sessilis* (red) extracts that attenuate lipid accumulation in steatotic HepG2 cells. *Food Biosci.* **2019**, *32*, 100489. [CrossRef]
45. Ramlagan, P.; Rondeau, P.; Planesse, C.; Neergheen-Bhujun, V.S.; Fawdar, S.; Bourdon, E.; Bahorun, T. *Punica granatum* L. mesocarp suppresses advanced glycation end products (AGEs)- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and pro-inflammatory biomarkers. *J. Funct. Foods* **2017**, *29*, 115–126. [CrossRef]
46. Tenore, G.C.; Novellino, E.; Basile, A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 129–136. [CrossRef]
47. Motawi, T.K.; Ahmed, S.A.; El-Boghdady, N.A.; Metwally, N.S.; Nasr, N.N. Protective effects of betanin against paracetamol and diclofenac induced neurotoxicity and endocrine disruption in rats. *Biomarkers* **2019**, *24*, 645–651. [CrossRef]
48. Nissar, A.U.; Farrukh, M.R.; Kaiser, P.J.; Rafiq, R.A.; Afnan, Q.; Bhushan, S.; Adil, H.S.; Subhash, B.C.; Tasduq, S.A. Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from *Allium* plants, on experimentally induced hepatic prefibrogenic events in wistar rat. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 828–833. [CrossRef]
49. Uchiyama, M.; Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **1978**, *86*, 271–278. [CrossRef]
50. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef]
51. Munro, B. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Pathology* **1971**, *3*, 249. [CrossRef]
52. Patil, B.S.; Jayaprakasha, G.K.; Murthy, K.N.C.; Vikram, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8142–8160. [CrossRef]
53. Albano, C.; Negro, C.; Tommasi, N.; Gerardi, C.; Mita, G.; Miceli, A.; De Bellis, L.; Blando, F. Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants* **2015**, *4*, 269–280. [CrossRef] [PubMed]
54. Mabrouki, L.; Boutheina, Z.; Bendhifi, M.; Borgi, M.A. Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of *Opuntia streptacantha* and *Opuntia ficus indica* fruits pulp. *Nat. Technol.* **2015**, *13*, 2.
55. Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288–306. [CrossRef]
56. Bargougui, A.; Tag, H.M.; Bouaziz, M.; Triki, S. Antimicrobial, Antioxidant, Total Phenols and Flavonoids Content of Four Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Cultivars. *Biomed. Pharmacol. J.* **2019**, *12*, 1353–1368. [CrossRef]
57. Shutenko, Z.; Henry, Y.; Pinard, E.; Seylaz, J.; Potier, P.; Berthet, F.; Girard, P.; Sercombe, R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *57*, 199–208. [CrossRef]
58. Miguel, M.G. Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review. *Antioxidants* **2018**, *7*, 53. [CrossRef]
59. Esatbeyoglu, T.; Wagner, A.E.; Schiniatbeyo, V.B.; Rimbach, G. Betanin-A food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *59*, 36–47. [CrossRef]
60. Czapski, J.; Mikołajczyk-Bator, K.; Kaczmarek, M. Relationship between antioxidant capacity of red beet juice and contents of its betalain pigments. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2009**, *59*, 119–122.

61. García-Cayuela, T.; Gómez-Maqueo, A.; Guajardo-Flores, D.; Welti-Chanes, J.; Cano, M.P. Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *76*, 1–13. [[CrossRef](#)]
62. Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Purification and Antiradical Properties of the Structural Unit of Betalains. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1030–1036. [[CrossRef](#)]
63. Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2288–2294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. BButera, 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](#)] [[PubMed](#)]
65. Gentile, C.; Tesoriere, L.; Allegra, M.; A Livrea, M.; D’Alessio, P. Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1028*, 481–486. [[CrossRef](#)]
66. Stintzing, F.C.; Herbach, K.M.; Mosshammer, M.R.; Carle, R.; Yi, W.; Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Bunch, R.; Felker, P. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *53*, 442–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1971–1978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Gandía-Herrero, F.; Escribano, J.; García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **2010**, *232*, 449–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. 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](#)] [[PubMed](#)]
70. Da Silva, D.V.T.; Dos Santos Baião, D.; De Oliveira Silva, F.; Alves, G.; Perrone, D.; Del Aguila, E.M.; Paschoalin, V.M.F. Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules* **2019**, *24*, 458. [[CrossRef](#)]
71. Taira, J.; Tsuchida, E.; Katoh, M.C.; Uehara, M.; Ogi, T. Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chem.* **2015**, *166*, 531–536. [[CrossRef](#)]
72. Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. Betalains—A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5178–5185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tesoriere, L.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M.A. 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](#)]
74. Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Livrea, M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 941–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Sawicki, T.; Topolska, J.; Romaszko, E.; Wiczowski, W. Profile and Content of Betalains in Plasma and Urine of Volunteers after Long-Term Exposure to Fermented Red Beet Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 4155–4163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Van Kuijk, F.J.G.M.; Sevanian, A.; Handelman, G.J.; Dratz, E.A. A new role for phospholipase A2: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 31–34. [[CrossRef](#)]
77. Winkler, B.S.; Orselli, S.M.; Rex, T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *17*, 333–349. [[CrossRef](#)]
78. Pehlivan, F. Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitamin C* **2017**, *2*, 23–35. [[CrossRef](#)]
79. Robbins, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887. [[CrossRef](#)]
80. Chen, J.; Yang, J.; Ma, L.; Li, J.; Shahzad, N.; Kim, C.K. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2611. [[CrossRef](#)]
81. Li, L.; Popko, J.L.; Umezawa, T.; Chiang, V.L. 5-Hydroxyconiferyl Aldehyde Modulates Enzymatic Methylation for Syringyl Monolignol Formation, a New View of Monolignol Biosynthesis in Angiosperms. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6537–6545. [[CrossRef](#)]
82. Prasad, K. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Mol. Cell. Biochem.* **1997**, *168*, 117–123. [[CrossRef](#)]
83. Touré, A.; Xueming, X. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 261–269. [[CrossRef](#)]
84. Ali, Y.; Jannat, S.; Jung, H.-A.; Choi, J.-S. Structural Bases for Hesperetin Derivatives: Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B, Kinetics Mechanism and Molecular Docking Study. *Molecules* **2021**, *26*, 7433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gulcin, I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 651–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. 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](#)] [[PubMed](#)]
87. Yin, Z.-H.; Wang, J.-J.; Gu, X.-Z.; Gu, H.-P.; Kang, W.-Y. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of red raspberry (*Harrywaters*) fruits in vitro. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *6*, 3118–3123. [[CrossRef](#)]
88. Islas-Flores, H.; Gómez-Oliván, L.M.; Galar-Martínez, M.; Colín-Cruz, A.; Neri-Cruz, N.; García-Medina, S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *92*, 32–38. [[CrossRef](#)]

89. Minich, D.M.; Brown, B.I. A Review of Dietary (Phyto)Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients* **2019**, *11*, 2073. [[CrossRef](#)]
90. 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](#)]
91. Forman, H.J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Asp. Med.* **2009**, *30*, 1–12. [[CrossRef](#)]
92. Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free. Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1199–1207. [[CrossRef](#)]
93. Robledinos-Antón, N.; Fernández-Ginés, R.; Manda, G.; Cuadrado, A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 9372182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ghanim, B.; Ahmad, M.; Abdallah, Q.; Qatouseh, L.; Qinna, N. Modulation of NRF2/ARE pathway- and cell death-related genes during drug-induced liver injury. *Hum. Exp. Toxicol.* **2021**, *40*, 2223–2236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Li, W.; Lin, K.; Zhou, M.; Xiong, Q.; Li, C.; Ru, Q. Polysaccharides from *Opuntia milpa alta* alleviate alloxan-induced INS-1 cells apoptosis via reducing oxidative stress and upregulating Nrf2 expression. *Nutr. Res.* **2020**, *77*, 108–118. [[CrossRef](#)]
96. Alcaraz, M.; Fernandez, P.; Guillen, M. Anti-Inflammatory Actions of the Heme Oxygenase-1 Pathway. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2541–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Ryter, S.W.; Choi, A.M. Heme Oxygenase-1: Molecular Mechanisms of Gene Expression in Oxygen-Related Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2002**, *4*, 625–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Surh, Y.-J.; Kundu, J.K.; Li, M.-H.; Na, H.-K.; Cha, Y.-N. Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1163–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Rahman, I.; MacNee, W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: Therapeutic approaches. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1405–1420. [[CrossRef](#)]
100. Franklin, C.C.; Backos, D.S.; Mohar, I.; White, C.C.; Forman, H.J.; Kavanagh, T.J. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Asp. Med.* **2009**, *30*, 86–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Wu, C.-C.; Bratton, S.B. Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 546–558. [[CrossRef](#)]
102. Tamura, R.E.; De Vasconcellos, J.F.; Sarkar, D.; Libermann, T.A.; Fisher, P.B.; Zerbini, L.F. GADD45 Proteins: Central Players in Tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 634–651. [[CrossRef](#)]
103. Li, J.; Cao, F.; Yin, H.; Huang, Z.; Lin, Z.; Mao, N.; Sun, B.; Wang, G. Ferroptosis: Past, present and future. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **2012**, *149*, 1060–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Wang, Y.; Chen, Q.; Shi, C.; Jiao, F.; Gong, Z. Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 4081–4090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Iorga, A.; Dara, L.; Kaplowitz, N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1018. [[CrossRef](#)]
107. Ren, Y.; Li, S.; Song, Z.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Wang, H. The Regulatory Roles of Polysaccharides and Ferroptosis-Related Phytochemicals in Liver Diseases. *Nutrients* **2022**, *14*, 2303. [[CrossRef](#)]
108. Zheng, K.; Dong, Y.; Yang, R.; Liang, Y.; Wu, H.; He, Z. Regulation of ferroptosis by bioactive phytochemicals: Implications for medical nutritional therapy. *Pharmacol. Res.* **2021**, *168*, 105580. [[CrossRef](#)]
109. Chandramouly, G. Gadd45 in DNA Demethylation and DNA Repair. In *Gadd45 Stress Sensor Genes*; Zaidi, M.R., Liebermann, D.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 55–67. [[CrossRef](#)]
110. Zhan, Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *569*, 133–143. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.