

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL TAMAÑO DEL CLADODIO EN LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL NOPAL (*Opuntia ficus-
indica*) EN TEJIDOS DE RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS
CON ESTREPTOZOTOCINA”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

CUTZANDI LORENA CARBAJAL VALENZUELA

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL TAMAÑO DEL CLADODIO EN LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL NOPAL (*Opuntia ficus-
indica*) EN TEJIDOS DE RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS
CON ESTREPTOZOTOCINA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA

CUTZANDI LORENA CARBAJAL VALENZUELA

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
PRESIDENTE

M. en C. BEATRIZ ÁLVAREZ MAYORCA
SECRETARIO

M. en C. CLAUDIA IVETTE GAMBOA GÓMEZ
VOCAL

Agradezco primeramente a mis padres por tenerme paciencia para terminar ésta ambición, a mis hermanas por su apoyo emocional y presión social.

Agradezco a los profesores que nos dieron hambre, principalmente a la Dra. Minerva por aceptarme como tesista y a mis sinodales por hacer las correcciones necesarias.

Agradezco a Javier por apoyarme en la burocracia requerida y por darme momentos inolvidables.

Agradezco a mis amigas de la universidad que han llegado a ser confidentes y consejeras, las nenas, a Sandy, Jonatjan y Dulce por estar cerca aunque lejos, a Chrisy por hacer varias veces que hiciera trabajar a mi mente.

Agradezco a las personas que me acompañaron a lo largo de la licenciatura, que fueron cambiantes y constantes, y que cada una dejó una enseñanza en mi vida.

Agradezco a mis amigas de la infancia que aunque no estuviéramos en el mismo salón como en la prepa, cada que nos veíamos parecía que así era.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	v
ÍNDICE DE FIGURAS.	vi
RESUMEN.	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 La diabetes.	1
1.1.1 Estadísticas de la diabetes.	1
1.1.2 Causas de la diabetes.	4
1.1.3 Tratamientos tradicionales para diabetes	5
1.2 Estrés oxidativo y diabetes.	9
1.2.1 Estrés oxidativo.	9
1.2.2. Estrés oxidativo y su relación con diabetes.	9
1.2.3. Sistemas antioxidantes.	11
1.2.4 Modulación de marcadores antioxidantes por medio de la dieta.	12
1.3 El nopal	13
1.3.1 El nopal en México	13
1.3.2 El nopal en la dieta mexicana.	15
1.3.3 El nopal y sus beneficios a la salud.	16
2. HIPÓTESIS.	19

3. OBJETIVOS.	20
4. METODOLOGÍA.	21
4.1 Materiales.	21
4.1.1 Reactivos químicos.	21
4.1.2 Reactivos biológicos.	21
4.2 Métodos.	22
4.2.1 Elaboración de harina del nopal.	22
4.2.2 Determinación de clorofilas “a” y “b” y total	22
4.2.3. Cuantificación de carotenoides.	23
4.2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos	23
4.2.4.1 Extracción de compuestos fenólicos.	23
4.2.4.2 Cuantificación de fenoles totales.	24
4.2.4.3 Cuantificación de flavonoides totales.	25
4.2.5 Inducción de diabetes.	25
4.2.6 Tratamientos con harina de nopal.	26
4.2.7 Sacrificio y obtención de muestras.	26
4.2.8 Determinaciones bioquímicas en suero.	26
4.2.9 Preparación de homogenados citosólicos.	27
4.2.10 Cuantificación de proteínas en homogenados citosólicos.	27
4.2.11 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).	28
4.2.12 Determinación de la actividad de glutatión-S transferasa (GST).	29

4.2.13 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).	30
4.2.14 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx).	31
4.3 Análisis estadístico.	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	33
5.1 Contenido de compuestos bioactivos en las harinas de nopal.	33
5.1.1 Concentración de clorofila “a”, “b” y total en harina de nopal en diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	33
5.1.2 Concentración de carotenoides.	34
5.1.3 Cuantificación de compuestos fenólicos.	36
5.1.3.1 Concentración de fenoles totales en harina de nopal en diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	36
5.1.3.2 Concentración de flavonoides totales.	37
5.2 Concentración de glucosa y perfil de lípidos	38
5.3 Marcadores antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.	40
5.3.1 En hígado.	40
5.3.1.1 Concentración de GSH.	40
5.3.1.2 Actividad de GST.	42
5.3.1.3 Actividad de CAT.	45
5.3.1.4 Actividad de GPx.	46
5.3.2 En riñón.	48

5.3.2.1 Concentración de GSH.	48
5.3.2.2 Actividad de GST.	50
5.3.2.3 Actividad de CAT.	51
5.3.2.4 Actividad de GPx.	53
5.4 Correlación con parámetros bioquímicos	54
6. CONCLUSIONES.	56
7. REFERENCIAS.	60
8. ANEXOS.	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estadística mundial de prevalencia de diabetes mellitus	1
2	Estadística de prevalencia de diabetes mellitus en el continente americano	2
3	Análisis químico proximal de nopal verdura	16
4	Efecto de la harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo en niveles de glucosa sanguínea e insulina de ratas diabéticas.	39
5	Efecto de la harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo en el perfil lipídico en ratas diabéticas.	40
6	Cuadro comparativo de las tres harinas de nopal según las diferencias estadísticas encontradas.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de diabetes en población mexicana, dividida por edades	3
2	Diferentes reacciones biológicas que producen radicales	9
3	Reacción de Fenton para la formación del ión hidroxilo (OH [·])	10
4	Concentración de clorofila “a”, “b” y total en las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo.	34
5	Concentración de carotenoides en las tres harinas de nopal de diferente etapa de desarrollo.	35

6	Concentración de fenoles totales en las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo.	37
7	Concentración de flavonoides de las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo.	38
8	Concentración de GSH en hígado de los grupos control y grupos diabéticos tratados con harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo.	41
9	Actividad de GST en hígado de grupos control y grupos diabéticos tratados con harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo.	43
10	Actividad de CAT en hígado de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	45
11	Actividad de GPx en hígado de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	47
12	Concentración de GSH en riñón de los grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	49

13	Actividad de GST en riñón de grupos control y grupos diabéticos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	51
14	Actividad de CAT en riñón de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	52
15	Actividad de GPx en riñón de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio.	54
16	Esquema de balance redox como mecanismo de defensa antioxidante endógeno en hígado.	57
17	Esquema de balance redox como mecanismo de defensa antioxidante endógeno en riñón.	58

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad cuya importancia en México ha aumentado exponencialmente, por lo que buscar alternativas a base de la dieta para disminuir las complicaciones es prioridad. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres harinas de diferentes estados de desarrollo de cladodio de *Opuntia ficus-indica* sobre el sistema antioxidante de ratas diabéticas; se utilizó nopal chico (40 ± 10 g), nopal mediano (74 ± 20 g) y nopal grande (293 ± 70 g). La parte experimental se dividió en a) la cuantificación de compuestos bioactivos en las tres harinas y b) en la determinación de marcadores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en riñón e hígado de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina alimentadas con las harinas analizadas. En las harinas se cuantificaron fenoles totales, flavonoides, carotenoides y clorofilas. En los tejidos se cuantificó GSH, actividad de GST, actividad de CAT y actividad de GPx, utilizando métodos espectrofotométricos. Los compuestos bioactivos mostraron principalmente una disminución conforme el estado de desarrollo del cladodio aumenta. El hígado del control diabético disminuyó en contenido de GSH, actividad de GST, actividad de CAT y aumentó en actividad de GPx. El riñón del control diabético se comportó similar, mostrando disminución en contenido de GSH, actividad de GST, actividad de CAT y actividad de GPx. Las harinas de nopal tuvieron diferentes efectos sobre las actividades enzimáticas y el contenido de GSH, sin embargo se concluyó que la harina de nopal chico presentó mayor efecto benéfico sobre los tejidos de ratas diabéticas.

1. ANTECEDENTES

1.1 La diabetes

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico heterogéneo caracterizado por la presencia de hiperglucemia, la cual se debe a una deficiencia funcional de la acción de la insulina, ya sea por la disminución de la secreción de ésta por las células β del páncreas, por un decremento de la respuesta de la insulina por tejidos blanco o por un incremento de las hormonas contra reguladoras (cortisol, hormona del crecimiento y adrenalina) (McPhee y Hammer, 2011).

1.1.1 Estadísticas de la diabetes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el 2030 la prevalencia de diabetes aumentará alrededor de 46.7% (Cuadro 1.).

Cuadro 1. Estadística mundial de prevalencia de diabetes mellitus.

Año	2000	2030
No. Personas	171,000,000	366,000,000

Adaptado de: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index.html

Además de las estadísticas mundiales, esta organización presenta, en el mismo formato, lo referido a cada país, dividido por continentes. El Cuadro 2. presenta las estadísticas de los países del continente americano incluyendo a México, el cual se encuentra en el segundo lugar con más prevalencia de diabetes mellitus; sin embargo, su aumento en la población mexicana es preocupante si comparamos con el aumento de prevalencia en Estados Unidos, que es de un 41.6% aproximadamente, mientras que el aumento en México es de un 181.3%.

Cuadro 2. Estadística de prevalencia de diabetes mellitus en el continente americano

País	Año 2000	Año 2030
Antigua y Barbuda	3000	5000
Argentina	1,426,000	2,457,000
Bahamas	12,000	26,000
Barbados	11,000	22,000
Belice	5,000	15,000
Bolivia	207,000	562,000
Brasil	4,553,00	11,305,000
Canadá	2,006,000	3,543,000
Chile	495,000	1,047,000
Colombia	883,000	2,425,000
Costa Rica	76,000	237,000
Cuba	480,000	855,000
Dominica	3,000	4,000
República Dominicana	245,000	594,000
Ecuador	341,000	921,000
El Salvador	103,000	320,000
Granada	4,000	7,000
Guatemala	139,000	447,000
Guyana	19,000	36,000
Haití	161,000	401,000
Honduras	81,000	269,000
Jamaica	81,000	189,000
México	2,179,000	6,130,000
Nicaragua	68,000	246,000
Panamá	59,000	155,000
Paraguay	102,000	324,000
Perú	754,000	1,961,000
Santa Lucía	5,000	9,000
San Vicente y Granadinas	5,000	9,000
Suriname	9,000	20,000
Trinidad y Tobago	60,000	125,000
Estados U. de América	17,702,000	30,312,000
Uruguay	154,000	224,000
Venezuela	583,000	1,606,000
Total	33,016,000	66,812,000

Adaptado de: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index.html

El Instituto Nacional de Salud Pública muestra los intervalos con mayor prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, dividida por edades (Figura 1.) siendo los intervalos con mayor prevalencia de 50-59 y 60-69 años (Shamah-Levy, 2011 según ENSANUT,

2006). El dato anterior muestra un 12.93% más de prevalencia de diabetes mellitus que los valores conocidos por instituciones mexicanas, mostrando de igual forma, una mayor prevalencia en mujeres que en hombres. Por otro lado, el diagnóstico de diabetes en niños y adolescentes también va en aumento. Por ejemplo, se calcula que alrededor de 76,000 niños menores de 15 años desarrollan diabetes tipo 2 anualmente en el mundo (Federación Mexicana de Diabetes, 2010). De manera particular, la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en niños ha aumentado en un 50%, siendo los casos generalmente de ascendencia hispánica, afroamericana, indígena americana y asiática de las islas del Pacífico, estando relacionada con obesidad en el 100% de los casos (McPhee y Hammer, 2011). ENSANUT 2012 muestra una gráfica dónde se muestra la prevalencia de diabetes por género y edad, mostrando una tendencia a aumentar con el tiempo; cabe mencionar que se sigue manteniendo una mayor prevalencia en mujeres mayores de 60 años.

En México, la diabetes mellitus ocupa el primer lugar de defunciones por año en ambos géneros y se calculan 70,000 muertes por año; además se presentan 400,000 casos nuevos anuales y se diagnostican 38 casos nuevos de diabetes cada hora (Alcántar-Luna, 2011).

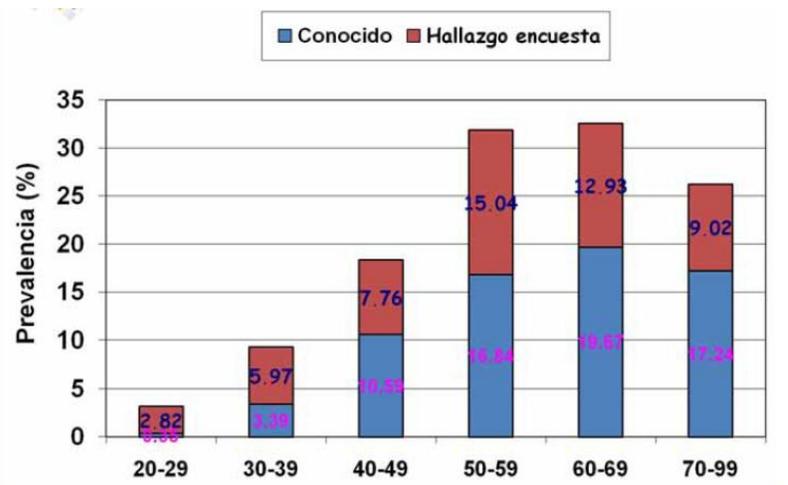


Figura 1. Prevalencia de diabetes en población mexicana, dividida por edades (Shamah-Levy, 2011 según ENSANUT, 2006)

En lo que respecta a la diabetes 1, esta patología es menos frecuente que la tipo 2 y comprende el 5-10% de los casos (McPhee y Hammer, 2011).

1.1.2 Causas de la diabetes

La diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción auto inmunitaria de células β -pancreáticas, con deficiencia grave resultante de insulina. Este tipo de diabetes suele presentarse en pacientes menores de 30 años de edad, y se caracteriza con síntomas de poliuria, polidipsia y pérdida de peso, con notorio incremento de las concentraciones séricas de glucosa. Aunque es clara la participación de la susceptibilidad genética en este tipo de diabetes, se ha sugerido que los factores ambientales también pueden tener un papel crucial en este padecimiento; además, la presencia de algunas infecciones virales, por ejemplo la rubéola, pueden precipitar la enfermedad (McPhee y Hammer, 2011).

La diabetes tipo 1 es la enfermedad crónica endocrinológica más frecuente en la edad pediátrica y la segunda enfermedad crónica en la infancia después del asma en países desarrollados. En los últimos años se ha asistido a un incremento de la diabetes tipo 1 que ha sido demasiado rápido como para ser justificado exclusivamente por factores genéticos, por lo que se han empezado a implicar factores ambientales en su etiología (Bahillo-Curienes y col., 2006).

En cuanto a la diabetes mellitus tipo 2, en ésta influyen tanto los factores genéticos como los ambientales (Reynoso-Camacho y col., 2007), se ha evidenciado causalidad por los componentes genéticos, y son dos defectos metabólicos los que dan por resultado este tipo de hiperglucemia:

- Resistencia de las células blanco a los efectos de la insulina
- Secreción inadecuada de insulina por las células β pancreáticas en el contexto de resistencia a la insulina

La diabetes tipo 2 conlleva una relación estrecha con la obesidad debido a que el tejido adiposo produce mediadores de resistencia a la insulina, principalmente, el tejido adiposo central, es decir, el abdominal. Estos mediadores pueden incluir los niveles excesivos de ácidos grasos libres que causan lipotoxicidad y aminoran la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina al interferir con la emisión de señales causadas por la fosforilación de IRS (sustrato receptor de insulina), que es el primer paso para la activación del metabolismo de la glucosa (Cruz y col., 2001), así como la secreción desregulada de citocinas producidas por el tejido adiposo, por ejemplo la leptina (hormona antidiabetogénica), cuya acción central es controlar la saciedad e incrementar la sensibilidad a la insulina. Además, la prevalencia de este tipo de diabetes tiende a aumentar en relación proporcional con la edad del individuo (McPhee y Hammer, 2011).

A principios del siglo XXI se determinó como explicación de la diabetes el genotipo, excluyendo los aspectos sociales, antropológicos y de estilo de vida; sin embargo, ahora es reconocido que el riesgo genético es necesario pero insuficiente para el desarrollo de la enfermedad (Moreno-Altamirano, 2001), por lo que los métodos para su tratamiento son variados, siendo tanto farmacológicos como nutricionales, o simplemente un cambio en la forma de vida alimentaria y sedentaria.

1.1.3 Tratamientos tradicionales para la diabetes.

Desde siempre, los tratamientos para la diabetes mellitus se han asignado dependiendo del avance de la enfermedad y, sobre todo, de las causas de la enfermedad, pudiendo así decidir entre diferentes tratamientos farmacológicos o, en su caso, una dieta hipocalórica. El tratamiento de la diabetes mellitus 2 implica ante todo la necesidad de controlar los cuadros de hiperglicemia, no solo en ayuno, si no también después de ingerir alimentos (Candia-Plata y col., 2008).

Según el libro “Diagnóstico clínico y tratamiento”, en el capítulo referido a la diabetes, los regímenes terapéuticos principales son: la dieta, los hipoglucemiantes bucales y la insulina como tal (Schroeder y col., 1990).

La dieta equilibrada debe ser la base en todos los tratamientos; por lo que, hay ocasiones en que ésta es, por sí misma, el tratamiento. La dieta que sea asignada dependerá del paciente, es decir, si es diabético obeso o no obeso; generalmente, cuando se trata del primer caso, la dieta tiene como principal meta la restricción calórica, insistiendo en la hora de las comidas y en bocadillos periódicos, en vez de una sola comida alta en calorías.

El libro Diabetes de la A a la Z (Asociación Americana para la Diabetes, 2004) apoya como principal tratamiento y pretratamiento para esta enfermedad, una dieta hipocalórica para mantener el peso ideal, así como ejercicio y por ende la pérdida de peso. Se recomienda que se reduzca la grasa en la dieta a un 35% del total de las calorías de la dieta y que la grasa saturada sea solo un tercio de esta cifra, que la principal fuente de proteínas sea la carne roja y en cuanto a los carbohidratos pueden ser hasta el 60% de la dieta mientras no se trate de azúcares refinados o simples, es decir, que el azúcar se recomienda no refinada para así aportar una cantidad de fibra a la dieta. La fibra puede ser tanto soluble como insoluble, ya que los dos tipos de fibra ejercen un efecto benéfico y, directa o indirectamente, hipogluclémico (Schroeder y col, 1990). Tradicionalmente, la población mexicana ha consumido nopal como tratamiento alternativo o combinado con fármacos para la diabetes mellitus tipo 2 (Basurto-Santos y col., 2006).

Cuando la dieta no es suficiente para mantener un nivel normoglucémico, se acude al tratamiento farmacológico. A continuación se exponen algunos fármacos orales:

Sulfonilureas: Este tipo de hipoglucemiante comenzó a usarse en los años 50's y actúa teniendo un efecto insulinotrópico en las células β del páncreas, por lo que se recetan a los pacientes con diabetes tipo 2, ya que la primera carece de estas

células, y por tanto no habría efecto. La orinase y la diabinese son algunas de las Sulfonilureas de primera generación, siendo la última la única que se usa actualmente. También existen Sulfonilureas de segunda generación como la gliplizida, glimepirida y gliburida, entre otras.

Meglitinidas: Este tipo de hipoglucemiantes también actúan estimulando las células β del páncreas para producir insulina, algunas de ellas son la repaglinida y la nateglinida, derivados del ácido benzoico y de la fenilalanina, respectivamente. Esta terapia está relacionada con la ganancia de peso en los pacientes (tres kg en tres meses) (Black C. y col., 2007).

Biguanidas: Su acción reside en disminuir los niveles de glucosa producidos por el hígado, y estimular la sensibilidad del tejido muscular a la insulina. Un ejemplo es la metformina, la cual generalmente se toma dos veces al día, de preferencia con comida para evitar efectos secundarios como la diarrea. La metformina es la única disponible actualmente, debido a que la fenformina produce acidosis láctica (Trinajstic, 2012).

Thiazolidionas: Estos fármacos actúan ayudando a la insulina a llevar a cabo su función, así como reduciendo la glucosa producida por el hígado. El primer fármaco de este grupo fue la troglitazona; sin embargo, ésta salió del mercado por causar problemas hepáticos graves; los demás fármacos de este grupo no causan problemas hepáticos; sin embargo, se ha visto que causan un aumento en el riesgo de ataques al corazón.

Inhibidores de α -glucosidasa: Como su nombre lo dice, estos hipoglucemiantes actúan inhibiendo esta enzima que ayuda a la degradación de almidones, es decir, se inhibe la producción de azúcares simples, por lo que deben de tomarse junto con la comida. Ejemplo de estos fármacos son la acarbosa y el meglitol (ADA, 2012).

Además de estos fármacos, existe la insulina, cuya acción es más directa que los otros métodos. Existen diversos tipos de insulina o preparaciones, dependiendo de cómo actúan, de cuánto dura su efecto y de cuando alcanzan su efecto máximo. Algunos de ellos incluyen:

Insulina de acción rápida: Empieza a actuar cinco minutos después de la inyección, su efecto máximo se muestra a la hora de inyectada y su duración es de dos a cuatro horas.

Insulina regular o de acción corta: Ésta llega a la sangre treinta minutos después de la inyección, su efecto máximo es a las dos o tres horas después de la inyección y su efecto dura alrededor de tres a seis horas.

Insulina de acción intermedia: Ésta llega a la sangre dos o cuatro horas después de inyección, su efecto máximo es entre las cuatro y doce horas y es efectivo por doce a dieciocho horas.

Insulina de acción larga: Ésta llega a la sangre entre las seis y las diez horas después de la inyección, y es efectiva por veinte o veinticuatro horas.

Originalmente los preparados de insulina que se utilizaban se extraían de animales como la res y el cerdo, variando tres y un aminoácido en la longitud de la cadena polipéptida respectivamente, en comparación con la insulina humana. Después, se comenzó a fabricar la insulina recombinante, es decir, biosintetizada, así como la insulina por conversión enzimática, pasando de la insulina de cerdo a la estructura de la insulina humana, reemplazando el aminoácido terminal (-alanina-) en la cadena beta de la insulina de cerdo por treonina (Schroeder y col., 1990).

Aún con la eficiencia de los tratamientos farmacológicos antes mencionados, es altamente recomendable que la base del tratamiento sea una dieta balanceada, que tenga componentes fitoquímicos que modulen o reduzcan las complicaciones de la diabetes como es el estrés oxidativo.

1.2 Estrés oxidativo y diabetes

1.2.1 Estrés oxidativo

El oxígeno, molécula de gran importancia biológica, fue descubierta en el año 1775, año desde el cual, a concentraciones comunes, se ha visto que induce toxicidad en el organismo humano; sin embargo, fue en el año 1954 que Rebeca Gershan propuso el mecanismo de daño por medio de radicales libres (RL). Esta hipótesis fue totalmente aceptada con el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la reacción de dismutación del radical anión superóxido, una de las especies con más efecto dañino, para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 2.).

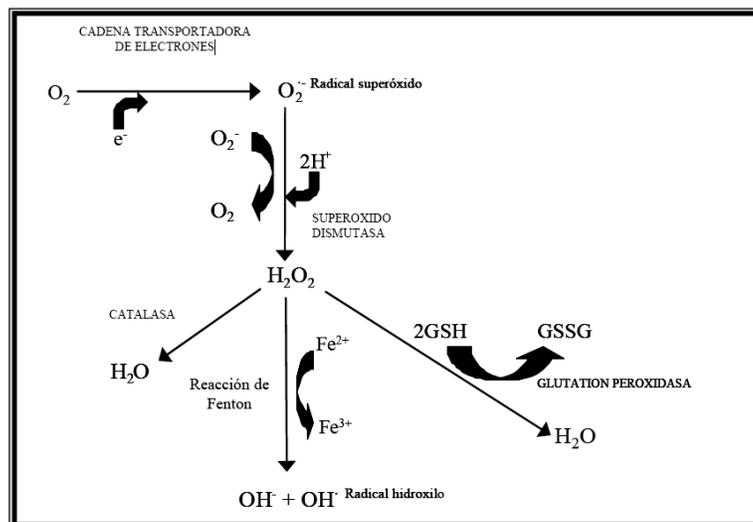


Figura 2. Diferentes reacciones biológicas que producen radicales (Ruiz-Roca, 2009).

Entre las especies reactivas del oxígeno (ERO) se incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Las ERO tienen diferentes efectos sobre la célula; por ejemplo, causan lisis eritrocitaria, inactivación de enzimas como la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa en células de mamífero, oxidación de ácidos grasos insaturados, entre otros. Sin embargo, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) se considera la especie más

reactiva y peligrosa, ya que ataca a casi todas las moléculas biológicas, implicando metales de transición; uno de los daños que se le atribuye es la peroxidación lipídica (Ruiz-Roca, 2009), donde también se ve implicada la molécula de oxígeno en su estado singulete (Gómez-Sánchez, 2010).

Debido a que el cuerpo produce RL por medio del cumplimiento de las actividades fisiológicas, estos se pueden clasificar como productos endógenos o exógenos.

La respiración celular en la mitocondria es una de las principales fuentes de RL, ya que alrededor del 2-5% del oxígeno no es reducido completamente a H₂O₂, formando moléculas con electrones no apareados, altamente reactivas como el anión O₂⁻, el cual es convertido por la enzima SOD en H₂O₂ y, por medio de la reacción de Fenton, a radical hidroxilo OH[•] (Figura 3.)

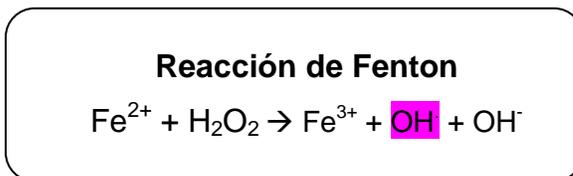


Figura 3. Reacción de Fenton para la formación del ión hidroxilo (OH[•]) (Adaptado de Thomas, 2006).

El daño que producen los RL y las EROs está relacionado con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. Lo anterior debido a que el daño ocurrido en los enlaces de proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, va a provocar cambios tanto bioquímicos como fisiológicos en la célula y, por lo tanto, activa reacciones en cadena que inducen a las diferentes enfermedades como aterosclerosis, procesos inflamatorios y diabetes, entre otras (Ramos-Ibarra y col., 2006).

1.2.2 Estrés oxidativo y su relación con diabetes.

Diversos estudios indican una relación directa entre los dos tipos de diabetes mellitus y aumento del estrés oxidativo, incluso si estos no presentan complicaciones; así como un aumento en la susceptibilidad de oxidación de lipoproteínas en un estado diabético; de esta forma, se aumentan las complicaciones de la enfermedad, acelerando la aterosclerosis y otras complicaciones microvasculares. Sin embargo, los mecanismos por los cuales aumenta el estrés oxidativo en el organismo no son completamente conocidos. Existe evidencia que sugiere que en el transcurso de la enfermedad, existe un aumento en la producción de RL, como el ión O_2^- ; así como un decremento en el status antioxidante, llevando al organismo a un estado de estrés oxidativo. Algunos de los mecanismos que se han visto involucrados son la autooxidación de la glucosa, la formación de productos avanzados de glicosilación (AGE's), activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes y del metabolismo del ascorbato y el descontrol en el metabolismo del óxido nítrico, así como de prostaglandinas (Atalay y Laaksonen, 2005).

Existe literatura que evidencia una disminución del estrés oxidativo causado por la enfermedad debido al consumo de diferentes alimentos, entre ellos el nopal, demostrando una restauración de los sistemas antioxidantes endógenos respecto a un control sano. Por ejemplo, Hong-Ki (2003) muestra un aumento en la concentración de GSH endógeno, así como un aumento en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) en hígado de rata con estrés oxidativo tratadas con *Opuntia ficus-indica*.

1.2.3 Sistemas antioxidantes

Para la medición del daño por estrés oxidativo se han elegido ciertos marcadores biológicos, cada uno para medir una macromolécula dañada diferente, por ejemplo, para la medición de oxidación lipídica, la técnica más usada es llamada TBARS,

que mide las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), como el malondialdehído (MDA). Para el daño en proteínas se miden ciertas modificaciones ocurridas en las proteínas afectadas, como la hidroxilación aromática de fenilalanina o la conversión de tirosina a di-tirosina. El daño en ADN se mide por la presencia de productos de oxidación de guanosina y su nucleótido por medio de HPLC, CG y ELISA.

Por otro lado, si se requiere estudiar el daño por estrés oxidativo en los sistemas antioxidantes del propio cuerpo, se llevan a cabo mediciones de diferentes enzimas como SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), o determinaciones no enzimáticas como los niveles de glutatión reducido (GSH) y algunas vitaminas (Ramos-Ibarra y col., 2006). En la literatura se ha encontrado que estos marcadores de estrés oxidativo varían con patologías como la diabetes; varios autores coinciden con una disminución en la actividad de CAT y GPx, así como en la concentración de GSH endógeno en los tejidos de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) (Beristain-Pérez y col., 2006; Kaleem y col., 2006; Palos-Suárez, 2007; Cruz-Hernández y col., 2011).

1.2.4 Modulación de marcadores antioxidantes por medio de la dieta

Es por medio de los biomarcadores que podemos saber si existen formas de evitar el daño oxidativo. Se ha visto que el consumo de ciertos alimentos disminuye el daño por estrés oxidativo, lo que se ve reflejado en el aumento de algunos compuestos endógenos como las enzimas antioxidantes (biomarcadores) y vitaminas. En este sentido, la dieta puede influir de manera positiva en el aumento del sistema antioxidante endógeno, ya que al consumir los antioxidantes propios del alimento, que se originan como metabolitos secundarios en las plantas, refuerzan el sistema inmunológico, retardan la generación de enfermedades crónicas, modulan el envejecimiento y reducen procesos inflamatorios (Vidal-Quintanar, 2008); además, se ha visto una restauración de las actividades de las principales enzimas del sistema antioxidante endógeno en modelos con patologías

crónico-degenerativas a partir de una dieta alta en compuestos antioxidantes (Beristain-Pérez y col., 2006; Kaleem y col., 2006; Palos-Suárez, 2007; Cruz-Hernández y col., 2011).

Tanto las frutas como los vegetales contienen gran cantidad de antioxidantes, incluyendo carotenoides, vitaminas, tocoferoles, flavonoides y otros compuestos fenólicos. El nopal es uno de los alimentos consumidos en México que posee alto contenido en este tipo de compuestos (Brahmi y col., 2011).

1.3 El nopal

1.3.1 El nopal en México

La especie *Opuntia ficus-indica*, mejor conocida en México como nopal, se encuentra en regiones áridas y semiáridas de Centroamérica, especialmente México. El género *Opuntia* spp. es de gran importancia en el país, junto con el maíz, amaranto y el agave tequilero (Hernández-Urbiola y col., 2011). Esto debido a sus variados usos, aportaciones económicas y culturales. En México, el nopal es utilizado en tres principales formas:

- Nopal tunero
- Nopal verdura
- Nopal para forraje

Estos tres diferentes usos, representan una fuente económica importante para los productores de nopal.. El nopal forrajero se consume directamente por el ganado, principalmente bovino, ovino y caprino. También se toma como uso del nopal la creación de cercos, producción de grana cochinilla, como materia prima para cosméticos, en la industria alimentaria, para la conservación del suelo y abatir la contaminación atmosférica (Flores-Valdez y col., 1995).

Existe un gran número de especies y variedades de nopales, el género *Opuntia* cuenta con cinco subgéneros, 17 series y 104 especies. Algunos de los subgéneros de *Opuntia* son *cylindropuntia*, *grusonia*, *corinopuntia*, *opuntia* y *stenopuntia*, siendo *Opuntia* el que cuenta con más series y más especies que se utilizan como nopal forrajero y para producción de tuna. Algunas de las especies forrajeras son: *O. microdasys*, *O. azuera*, *O. duranguensis*, *O. robusta*; las especies que se utilizan para producción de tunas son *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha*, *O. megachanta*, *O. xocconostle* y *O. ficus-indica*, este último también conocido como variedad milpa alta (Flores-Valdez y col., 1995).

Se estima que en México el área de nopales silvestres es de 3'000,000 ha en los estados de Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Sonora; los nopales cultivados ocupan un área de 210,000 ha, incluidos los nopales sembrados para aprovechamiento de tuna y de forraje; el área cultivada para nopal verdura está estimada en tan sólo 10,000 ha, traducido a 572,625 toneladas (SAGARPA, 2004), cuya área del 60% se distribuye entre el Distrito Federal y el estado de Morelos (Valencia-Sandoval y col., 2010). En el año 2011, se registró una producción total de 118,276 toneladas, cosechándose el mayor porcentaje en el mes de Junio (SIAP, 2011).

El nopal verdura comenzó siendo cultivado solo en huertos familiares, para su venta en mercados y tianguis rurales. Sin embargo, en el año 1950 se incrementó la demanda de nopal verdura a lo largo del país, por lo que se comenzó la plantación en parcelas de mayor área, utilizando las mejores variedades de los huertos familiares. Estas plantaciones se iniciaron en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Aguascalientes y Distrito Federal; por lo que se comenzó a estudiar la producción forzada, por medio del adelanto o retraso de la iniciación del crecimiento y desarrollo del frutal (Aguilar-Becerril, 2005). Fue hasta inicios de los años 70's que México comienza la exportación de nopal a Estados

Unidos de América y en los años 80's la industrialización de nopal en salmuera o escabeche exportando a Canadá y el continente europeo. Con lo anterior se demuestra la variedad de usos como alimento del nopal en diferentes culturas, principalmente la mexicana (Flores-Valdez y col., 1995).

1.3.2 El nopal en la dieta mexicana

El uso del nopal en la dieta mexicana, o de los pobladores desde antes de la conquista, se demostró con las excavaciones de Tamaulipas y Puebla, con antigüedad de 7000 años, donde se encontraron semillas fosilizadas, así como cáscaras de tunas y fibras de penca de nopal (Flores-Valdez y col., 1995). La planta tiene diferentes presentaciones para el consumo humano, siendo el más común la tuna, que es el fruto de un sabor dulce y con alto contenido de azúcares, y por otro lado está el consumo de la penca, o cladodio, que es comúnmente llamado nopal verdura, fuertemente ligado a la comida mexicana del centro del país, siendo menor su demanda en los estados del norte y costeros.

El principal consumo del nopal verdura en México corresponde a las primeras etapas de desarrollo, más o menos cuando hay un peso de 100 g de penca, aunque puede variar de 60 g hasta los 150 g. La presentación del nopal verdura tiene una amplia variedad en diferentes recetas de cocina, siendo acompañante de otros guisados, como guarnición, casi en todas cocido, incluso dentro de la bebida, en licuados y aguas frescas, en esta presentación el nopal va crudo; sin embargo, uno de las desventajas del nopal crudo es el mucílago (baba) cuya sensación es desagradable para el consumidor.

En México, se prefiere el nopal "en fresco" al nopal procesado, es decir, se consume menos en presentaciones como escabeche y mermelada, con una estimación de consumo *per cápita* de 6.36 kg al año de nopal en general (Flores-Valdez y col., 1995). Recientemente el consumo del nopal en forma de harina ha aumentado, debido a que se puede utilizar en más recetas, tales como galletas,

panes, dulces, tortillas, entre otras, ampliando con esto el uso del nopal. Otra ventaja de la harina de nopal es que puede utilizarse también como comprimidos, sobre todo para venta como coadyuvante en la salud del consumidor por sus características nutritivas.

1.3.3 El nopal y sus beneficios a la salud.

Mucho se ha hablado sobre el nopal y sus beneficios a la salud humana. En este sentido, se han realizado varios estudios bromatológicos que cuantifican los componentes principales del nopal. Por ejemplo, Guzmán-Loayza y Chávez (2007) realizaron un estudio sobre la aceptabilidad del nopal en una dieta y su aporte de nutrientes al consumidor (carbohidratos, lípidos, proteínas, fibra, vitaminas, entre otros). En el Cuadro 3. se muestra el contenido nutrimental del nopal según su estado de desarrollo.

Cuadro 3. Análisis químico proximal de nopal verdura (g/100 g de muestra seca)

(%)	EDAD		
	1 (60 g)	2 (130-140 g)	3 (190-210 g)
HUMEDAD	94.44 ± 0.21 ^a	94.12 ± 0.1 ^a	94.88±0.54 ^a
CENIZAS	19.15 ± 1.23 ^a	18.27 ± 0.16 ^b	17.83±0.88 ^c
GRASA	2.59 ± 0.35 ^a	2.60 ± 0.52 ^a	3.85±0.21 ^b
PROTEÍNA	2.59 ± 0.49 ^a	2.07 ± 0.32 ^a	2.43±0.18 ^a
FIBRA	11.40 ± 0.48 ^a	13.42 ± 1.40 ^b	8.57±0.46 ^c

(Adaptación de Hernández-Granada y col., 2010)

Este cuadro muestra la principal diferencia de composición en los nutrimentos del nopal según la etapa de desarrollo, la cual radica en las cenizas y la fibra, ésta última siendo de gran importancia y la que más se explota del nopal debido a sus propiedades biológicas, es decir, el poder hipoglicémico.

Además de los nutrientes principales, el nopal cuenta con componentes que lo hacen un producto nutracéutico, es decir, capaz de proporcionar beneficios saludables, incluidos la prevención y tratamiento de enfermedades (Alvídrez-Morales y col., 2002). Entre estos compuestos con actividad biológica se

encuentran los pigmentos, minerales, fenoles y vitaminas (Hernández-Granada y col., 2010).

Los compuestos fenólicos se determinaron por primera vez en las flores del nopal, siendo los flavonoides los que se han identificado ampliamente en el género *Opuntia*, variando según el estado de madurez del mismo (García-Nava, 2007).

En general, los flavonoides se proponen para el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares. Por ejemplo, en un estudio que evaluó los factores óptimos para la extracción de flavonoides de la piel del nopal, la cual constituye el 40% del cladodio, se obtuvo 5.55 mg/g de flavonoides (Cai y col., 2010). Dentro de este grupo de compuestos fenólicos que se han identificado en el nopal se encuentra el kampfrol y la quercetina (3,3', 4',5, 7-pentahidroxiflavona), (Rodríguez-Félix y col, 2010). Debido a estos fitoquímicos, los nopales se han propuesto como un alimento preventivo para ciertas enfermedades, como lo son diferentes tipos de cáncer (Zou y col., 2005).

Los minerales presentes en el nopal también son de importancia nutricional, como el calcio y el fósforo; el primero aumenta su cantidad proporcionalmente con la madurez del nopal, mientras que el fósforo disminuye con la madurez de la planta (Rodríguez-García y col., 2007).

Otro componente de interés del nopal y nopal deshidratado es la fibra. Estudios previos han determinado un contenido de hasta un 28% de fibra soluble (Rosado, 1995), siendo la causa principal de la popularidad de la planta. Se ha visto que el incremento en el consumo de fibra dietética previene enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus (Martínez-Flores y col., 2009). Uno de los mecanismos propuestos de la fibra se basa en su efecto hipoglucemiante en los consumidores. Este efecto se lleva a cabo a nivel del intestino delgado aumentando el grosor de la capa de agua que se debe traspasar para llegar a la membrana del

enterocito, con lo cual se disminuye la absorción de glucosa (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006). Varios estudios con diferentes especies de nopal (*O. streptacantha*, *O. fuliginosa*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica*) demuestran que el efecto no es solo hipoglucemiante, sino también antihiperglucemiante y, por lo tanto, tiene efecto benéfico contra la diabetes mellitus. Por ejemplo, la administración de nopal e insulina a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina durante siete días disminuyó los niveles de glucosa sanguínea y hemoglobina glicosilada hasta valores normales; además, el efecto se mantuvo después de haber retirado el tratamiento con la insulina y administrando solo el extracto de nopal (Basurto-Santos y col., 2006).

En la literatura no se ha encontrado reportes sobre diferencias en los efectos antioxidantes que aporta el nopal en diferentes etapas de desarrollo, por lo que este estudio centra su atención en la modulación de algunos marcadores de estrés oxidativo por el consumo de nopal en tres etapas de desarrollo en un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina.

2. HIPÓTESIS

El contenido de compuestos bioactivos en el nopal varía de acuerdo a la etapa de desarrollo de los cladodios, lo cual está relacionado con la restauración del sistema antioxidante, enzimático y no enzimático, de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina.

3. OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de harinas de cladodio de nopal (*Opuntia ficus-indica*) de diferentes etapas de desarrollo sobre el estado antioxidante en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ).

Específicos

- Cuantificar los principales compuestos bioactivos presentes en harina de nopal, elaborada a partir de cladodios en tres etapas de desarrollo.
- Determinar la actividad antioxidante de GST, GPX y CAT en hígado y riñón de ratas diabética alimentadas con harina de nopal (50 mg/kg) en tres etapas de desarrollo.
- Cuantificar el nivel de GSH en hígado y riñón de ratas diabéticas que han sido alimentadas con harina de nopal (50 mg/kg) en tres diferentes etapas de desarrollo.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1. Reactivos químicos

Los reactivos: ácido clorhídrico (HCl), etanol al 95%, hidróxido de sodio (NaOH), metanol absoluto, carbonato de sodio (Na_2CO_3), Tris-HCl, cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de potasio (KCl), sacarosa ultra pura, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio bibásico (Na_2HPO_4), EDTA y Tris se obtuvieron de la marca J. T. Baker.

Los reactivos: Vainillina, GSH, NADPH, hidroperóxido de cumeno, peróxido de hidrógeno, catequina y reactivo de Folin-Ciocalteu se adquirieron de la marca Sigma-Aldrich.

El Kit para determinación de proteína por método de ácido bicinconínico (BCA) se obtuvo de la marca Pierce Inc.

4.1.2. Reactivos biológicos

Materia vegetal:

El material vegetal fue donado por el Dr. Candelario Jacobo Mondragón del Sitio Experimental del Norte de Guanajuato (SENGUA) perteneciente al INIFAP. Se trabajó con cladodios de *O. ficus-indica* variedad —Milpa alta de tres diferentes tamaños comerciales cosechados en un horario vespertino de 4-5 de la tarde.

Animales:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g adquiridas del Bioterio comercial Rismart de México S.A. de C.V. Las ratas se aclimataron por una semana

y se alimentaron *ad libitum* durante el periodo experimental bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12/12 h y 25 °C, respectivamente).

Las harinas de nopal se incorporaron en la dieta a una concentración de 150 mg/kg de peso corporal por día.

4.2 Métodos.

4.3 Elaboración de harina de nopal

Los cladodios recolectados se clasificaron en tres etapas de desarrollo, midiendo el grosor en tres puntos utilizando un micrómetro de tornillo. Se pesó y determinó el volumen aproximado para su clasificación por peso, tamaño chico: 40 ± 10 g; tamaño mediano: 74 ± 20 g y tamaño grande: 293 ± 70 g. Se eliminaron las espinas de los cladodios manualmente y se almacenaron a 4 °C, después se cortaron en cuadrados de 2 por 2 cm y partidos por la mitad para obtener un secado homogéneo. El secado se realizó a 40 °C por un tiempo de 20 h en un horno de convección y posteriormente se pulverizó.

Las harinas se clasificaron con las siguientes abreviaciones: harina de nopal chico, CH; harina de nopal mediano, M; harina de nopal grande, G.

4.3.1 Determinación de clorofilas “a”, “b” y total

Se pesaron 0.5 g de cada tipo de harina y se realizó la extracción con acetona, aforando a 50 mL como volumen final. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer) a 645 y 663 nm de longitud de onda (λ). Cada muestra se leyó por duplicado.

La cantidad de pigmentos extraídos se calculó con las siguientes fórmulas, tomando en cuenta el volumen final de afore:

Clorofila a = $(12.7 (A_{663}) - 2.29 (A_{645})) \times (X \text{ mL} / 1000 \times \text{g muestra}) = \text{contenido a}$

Clorofila b = $(22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})) \times (X \text{ mL} / 1000 \times \text{g muestra}) = \text{contenido b}$

Clorofila total = $(20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})) \times (X \text{ mL} / 1000 \times \text{g muestra}) = \text{contenido total}$

Donde A_x es la absorbancia a x longitud de onda.

4.3.2 Cuantificación de carotenoides

Se pesaron 2 g de cada harina en un tubo Falcon de 15 mL, se añadieron 2 mL de mezcla de solventes orgánicos hexano:acetona (3:2). Se agitaron vigorosamente hasta completar la extracción, se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se recuperó con pipeta Pasteur y se leyó por duplicado a una absorbancia de 502, 650 y 665 nm de longitud de onda (λ) en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer).

La cantidad de pigmentos extraídos se calcularon con las siguientes fórmulas, tomando en cuenta el volumen final de afore

$$[\text{Carotenoides}](\text{mg/g}) = A_{502} / 0.32$$

4.3.3 Cuantificación de compuestos fenólicos.

4.3.3.1 Extracción de compuestos fenólicos

Para la obtención del extracto para la cuantificación de compuestos fenólicos totales en las harinas de nopal, se realizó el siguiente procedimiento: se pesó 1 g de cada harina de nopal y se adicionaron 10 mL de metanol (CH_3OH), se protegió

de la luz con aluminio y se agitó durante 24 h. La mezcla obtenida se centrifugó a $5000 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente y el extracto (sobrenadante) se refrigeró hasta su análisis.

Para la cuantificación de flavonoides se realizó una extracción a partir de 50 g de harina con una mezcla de MeOH:H₂O (70:30), se agitó por tres horas y se filtró al vacío 3 veces. Se colectaron los filtrados y a éste se le denominó extracto

4.3.3.2 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col, 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico y que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una λ de 760 nm.

Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (AG) como estándar con concentraciones de 0 μg a 20 μg .

Para la lectura de la muestra, se tomaron 40 μL de ésta y se llevaron a un volumen total de 500 μL . Se adicionaron 1250 μL de Na₂CO₃ al 20% (Anexo 1) y se dejaron reposar por dos horas protegidos de la luz a temperatura ambiente; después se leyó a una λ de 760nm en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer). Se realizó regresión lineal para obtener la ecuación de la curva y se sustituyeron los valores de absorbancia obtenidos en las muestras para así calcular la concentración. Los resultados se expresaron en mg eq AG/g de harina.

4.3.3.3 Cuantificación de flavonoides totales

Se realizó una curva de calibración con (+)catequina, con concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$, adicionando las soluciones en el siguiente orden: 0-100 μL de catequina (6 concentraciones), 1250 μL de H_2O destilada, 75 μL de NaNO_2 al 5% (Anexo 2) y se guardó protegido de la luz por 6 minutos; se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10% (Anexo 3) y se guardó protegido de la luz por 5 minutos; se adicionaron 500 μL de NaOH 1.0 M (Anexo 4) y se aforó a 2500 μL . Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer) a 510 nm. Esta lectura debe realizarse antes de 30 minutos a partir de la preparación. La lectura de la muestra se llevó a cabo a las mismas condiciones de λ que la curva de calibración, adicionando las soluciones en el siguiente orden: 200 μL de muestra, 1250 μL de H_2O destilada, 75 μL de NaNO_2 al 5% e incubación por 6 minutos; 150 μL de AlCl_3 al 10% e incubación por 5 minutos; 500 μL de NaOH 1.0 M y por último 325 μL de H_2O destilada. Se realizó regresión lineal para obtener la ecuación de la curva y se sustituyeron los valores de absorbancia obtenidos en las muestras para así calcular la concentración.

Los resultados se expresaron en μg eq catequina por g de harina.

4.3.4 Inducción de diabetes.

Se indujo diabetes a 35 ratas machos de la cepa Wistar con un ayuno mínimo de 12 horas con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 45 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal. Se determinó la glucosa en sangre a los 4 días después de la inyección y se utilizó la glucosa en ayuno mayor de 180 mg/dL como parámetro de selección para considerar a los animales diabéticos dentro del grupo experimental.

4.3.5 Tratamientos con harina de nopal.

Los grupos se nombran con las siguientes abreviaciones: grupo control sano, CS; grupo control diabético, CD; grupo diabético tratado con harina de nopal chico, GCH; grupo diabético tratado con harina de nopal mediano, GM; grupo diabético tratado con harina de nopal grande, GG.

Se incluyeron cinco grupos de siete animales cada uno: control sano, control diabético y tres grupos diabéticos tratados con harinas de nopal elaboradas con los diferentes tamaños de cladodios a una concentración de 150 mg/kg de peso corporal en dieta molida por día. Las ratas diabéticas se alimentaron las ratas diabéticas *ad libitum* por un periodo de 21 días.

4.3.6 Sacrificio y obtención de muestras.

Al final del periodo experimental, los animales permanecieron en ayuno y se recolectaron muestras de orina de 12 horas; posteriormente, los animales se anestesiaron colocándolos en una cámara con éter etílico. Una vez anestesiados, se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca; ésta se centrifugó para la obtención de suero, el cual se congeló y almacenó a -20 °C para posteriores determinaciones bioquímicas. Finalmente, se cortó la arteria principal para su sacrificio. Posteriormente, se removieron los riñones e hígado, los cuales se lavaron con solución fisiológica estéril y fría, se congelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -70 °C.

4.2.8 Determinaciones bioquímicas en suero

Los niveles de glucosa y el perfil de lípidos en suero de ratas se midieron a través de reacciones enzimáticas empleando kits comerciales de la marca Randox. La determinación de insulina en suero se realizó mediante un kit inmunoenzimático ELISA marca Millipore.

4.2.9 Preparación de homogenados citosólicos

Para las determinaciones de GSH y GST en hígado y riñón, se pesaron 0.5 g de órgano en un tubo cónico Falcon de 15 mL, se añadieron 3 mL de solución amortiguadora Tris/Sacarosa pH 7 (Anexo 5) y se homogenizaron con la ayuda de un polytrón (kinematica, Suiza) hasta no ver residuos de tejido. Los homogenados se centrifugaron a 8000 x g por 20 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada. Se recuperó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a una celda de ultracentrífuga (Beckman Optima L90K (Beckman, EUA). Los tubos se ultracentrifugaron a 4°C a 100000 x g por 1 hora. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf, dividiéndolos en tres partes, los cuales se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

Para la determinación de GPX y CAT en hígado y riñón, se pesaron 0.5 g de órgano en un tubo cónico Falcon de 15 mL, se añadieron 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 6), posteriormente se homogenizaron con un polytrón (Kinematica, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a 8000 x g por 15 minutos a 4 °C en una centrífuga (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf, dividiéndolos en tres partes, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

4.2.10 Cuantificación de proteínas en homogenados citosólicos.

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizaron por el método del ácido bicinconínico (BCA), empleando albúmina bovina como estándar para la curva de calibración, con concentraciones de 0 µg/mL a 1.2 µg/mL.

Para la lectura de las muestras se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5 (Anexo 7). Posteriormente, se colocaron 50 µL del citosol diluido en las placas de 96 pozos, se agregaron 250 µL

de la solución de trabajo para la determinación de proteína (Anexo 8) y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, las placas se leyeron en un lector de microplacas modelo Spectra Max 190 (Molecular, Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a una λ de 562 nm.

4.2.11 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).

La concentración de GSH se determinó por el método Ellman (1959), basado en la habilidad de grupo SH para reducir el ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB). Los niveles de GSH en las muestras se calcularon interpolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración que se realizó previamente de una concentración 0 a 100 μ M. Para la realización de la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (Anexo 9), solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH (Anexo 10), metanol y solución de DTNB 2.46 mM (Anexo 11). La reacción se inició con la adición del último reactivo y se incubó por 5 minutos. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una λ de 412 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Versa Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Los resultados se expresaron en μ M/mg de proteína.

Para las muestras se utilizaron citosoles concentrados, a los cuales se les precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: En un tubo Eppendorf se adicionaron 120 μ L de agua destilada, 150 μ L de citosol concentrado y 30 μ L de ácido tricloro acético (TCA) al 20% (Anexo 12), a continuación se dejó reposar por 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugaron a 8000 x g por 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en nuevos tubos Eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50 μ L para colocarse en placas de 96 pozos. Se agregaron los reactivos en el siguiente orden: 150 μ L de solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2, 80 μ L de metanol y 20 μ L de DTNB; se incubaron por 5 minutos y se leyeron inmediatamente con las mismas condiciones que la curva de calibración.

4.2.12 Determinación de la actividad de glutatión-S transferasa (GST).

El método se basa en la reacción catalizada por la enzima GST entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno), el cual tiene un amplio intervalo para detectar las diferentes isoenzimas. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto (Habig y col. 1974).

Para la lectura de las muestras se prepararon diluciones apropiadas de los citosoles (iguales a las diluciones utilizadas en determinación de proteína y cuyo cambio en la absorbancia del minuto 2 y minuto 1 se encuentre en intervalos de valores de 0.05 a 0.09). Se tomaron 50 μ L de estas diluciones y se colocaron en placas de 96 pozos, se agregaron 100 μ L de la solución de trabajo de GSH 3 mM (Anexo 13) y en seguida se adicionaron 150 μ L de la solución de trabajo CDNB de 2 mM (Anexo 14) en cada pozo. La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una λ de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 minutos de reacción en el lector de microplacas modelo Versa Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), obteniendo lecturas cada 20 segundos. Los resultados se expresaron en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{nmol / mg min} = (\Delta(\text{abs min 2} - \text{abs min 1})) / (\text{mg de proteína} (0.0096))$$

Donde:

Abs min 2: es la absorbancia a 340 nm en el minuto 2 de reacción.

Abs min1: es la absorbancia a 340 nm en el minuto 1 de reacción.

mg proteína: miligramos de proteína de la muestra.

0.0096: es el coeficiente de extinción de CDNB ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.13 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).

La actividad de CAT se midió por el método de Aebi (1984). Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 6). Se ajustó la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 mM (Anexo 19) realizando una lectura de la absorbancia a 240 nm en el espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer) y se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

$$[\text{H}_2\text{O}_2]\text{mM} = A_{240}/0.0436$$

Donde:

A_{240} : es la absorbancia H_2O_2 30 mM a 240 nm.

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en una celda de cuarzo 1700 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 6), 300 μL de citosol diluido y 1000 μL de H_2O_2 30 mM (Anexo 19). Las muestras se leyeron inmediatamente en el espectrofotómetro (SmartSpec Plus spectrophotometer), ya que la reacción comienza al agregarse el H_2O_2 , y se monitoreó el decremento en la absorbancia con una frecuencia de mediciones cada 5 segundos por un tiempo de corrida de 30 segundos basados en la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm a 25 °C.

Nota: los citosoles deben analizarse dentro de 5 a 10 minutos de su dilución.

La actividad de CAT se calculó usando la siguiente fórmula:

$$[\text{Actividad CAT}] = (\Delta\text{abs}/\text{min})(\text{vol total})(\text{factor dilución}) / ((\text{vol muestra})(\text{min})(0.0436))$$

Donde:

Vol total = 3 mL

Vol muestra = 0.30 mL

Minuto = 0.5 minutos

0.0436 = coeficiente de extinción de H₂O₂ (mM⁻¹ cm⁻¹).

Los resultados se expresaron en unidades/mg de proteína.

4.2.14 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx).

La actividad de GPx se midió por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPx, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y NADPH. Para la determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos 100 µL de solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8 (Anexo 15), 50 µL de cocktail de GSH/GR (Anexo 16), 50 µL muestra con la dilución apropiada (cuya absorbancia inicial se encuentre entre 0.8 y 1.2 y las pendientes sean negativas) y 50 µL NADPH 1.5 mM (Anexo 20). Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 µL de hidroperóxido de cumeno 3 mM (Anexo 18). La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm a 25 °C con una frecuencia de mediciones tal que permita 8 lecturas en un tiempo de reacción de 2 minutos en un lector de microplacas Vers Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). La lectura debe realizarse antes de 10 segundos transcurridos a partir de la adición del hidroperóxido de cumeno.

La actividad de GPx (unidades/mL) se calculó, adaptando los cálculos de mg de proteína con la cantidad de mL de muestra, usando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol} / \text{mg min} = (\text{pendiente de muestra} - \text{pendiente del blanco de reacción}) / (6.22 / \text{mg de proteína})$$

Donde:

6.22 el coeficiente de absortividad molar de NADPH ($\text{nM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Una unidad se define como los nmoles de NADPH gastado u oxidado en un minuto.

4.3 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media y se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnet o Dunn para la comparación entre los grupos experimentales contra el control diabético (letras diferentes indican diferencia significativa). Para la comparación entre los grupos diabéticos tratados con harina de nopal así como para los resultados de compuestos bioactivos de los tres tipos de harina se utilizó la prueba Tukey (símbolos diferentes implican diferencia significativa). En los casos en que se compararon dos grupos se empleó la prueba t de Student († implica diferencia significativa). En todos los casos se empleó un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis fueron realizados en el programa estadístico Sigma Stat versión 3.1

Los resultados en cada uno de los órganos estudiados fueron tratados con un análisis de correlación, donde se obtuvieron las relaciones estadísticas que presentaban los marcadores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos con el contenido de compuestos bioactivos presentes en las harinas de nopal con las cuales se suplementaron las dietas de los grupos diabéticos tratados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Contenido de compuestos bioactivos en las harinas de nopal.

5.1.1 Concentración de clorofila “a”, “b” y total en harina de nopal en diferentes etapas de desarrollo del cladodio.

La Figura 4. muestra que la concentración de clorofila “a”, “b” y total tiende a aumentar con el desarrollo del cladodio, presentando una mayor concentración de clorofila la harina de nopal grande, encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) en el contenido de clorofila a y b entre las harinas; sin embargo, el contenido total de clorofila no presentó diferencia significativa entre ninguna de las harinas.

Los resultados de clorofilas en esta investigación presentaron valores menores a los encontrados en la literatura. Por ejemplo, Stintzing y Carle (2005) reportan una concentración de clorofila “a” de 8.2 mg/100 g de tejido fresco, lo que podría equivaler a 1.36 mg/g de materia seca; clorofila “b” de 6.7 mg/100 g de tejido fresco, equivalente a 1.11 mg/g de materia seca; clorofila total de 19.6 mg/100 g de tejido fresco, lo que podría equivaler a 3.2 mg/g de materia seca; mientras que Aguilar-Becerril y Peña-Valvidia (2006) reportan 9.5 mg/100 g de tejido fresco, lo que podría equivaler a 1.58 mg/g de materia seca; clorofila b de 3.0 mg/100 g de tejido fresco, equivalente a 0.5 mg/g de materia seca; clorofila total de 12.5, lo que podría equivaler a 2.08 mg/g de materia seca. Los valores menores arrojados por la presente investigación respecto a la bibliografía consultada se puede deber a que en este trabajo el cladodio pasó por un termotratamiento para la obtención de las harinas, pudiendo disminuir el contenido de clorofilas debido a su carácter termolábil.

De forma similar, Rodríguez-Felix y Cantwell (1988) observaron un incremento en el contenido de clorofila de acuerdo a la etapa de desarrollo; esta información es apoyada por Nazareno y Padrón-Pereira (2011) quienes mencionan un incremento

del color verde (valores negativos de la coordenada de color b*) a mayor edad del cladodio fresco.

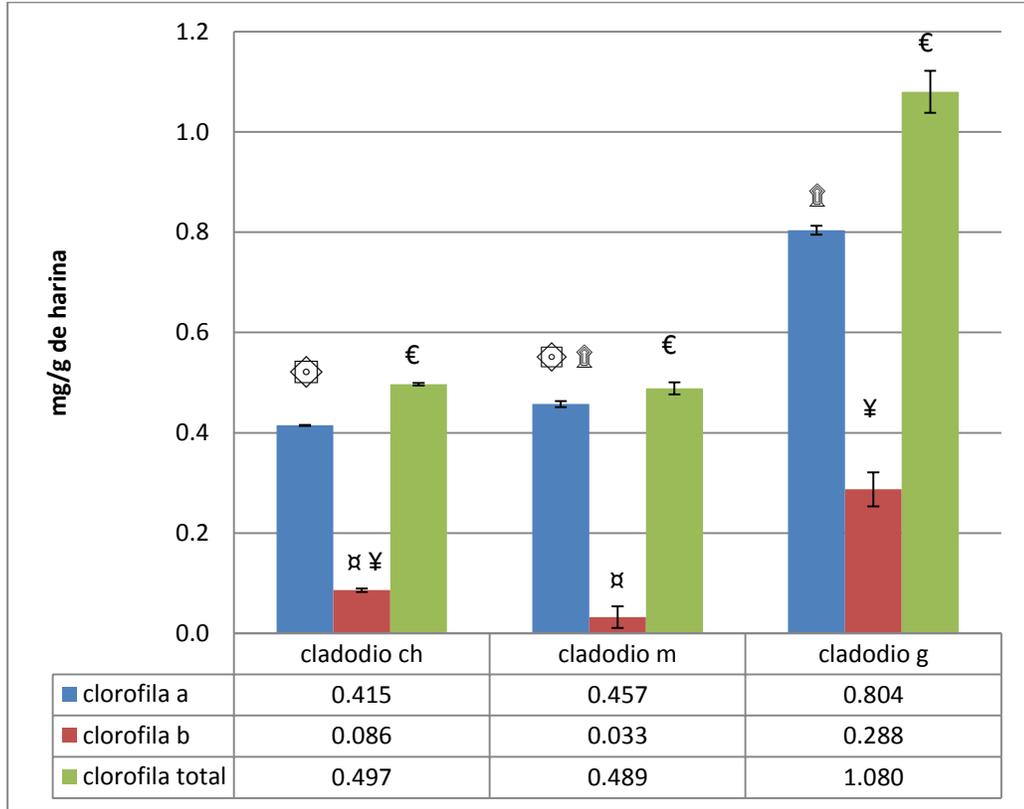


Figura 4. Concentración de clorofila “a”, “b” y total en las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo. Columnas con figuras diferentes indican diferencia significativa, se realizó la prueba para cada tipo de clorofila que se cuantificó.

5.1.2 Concentración de carotenoides.

Los carotenoides son tetraterpenoides que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico a través de dos unidades C20 geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP). La actividad biológica principal de los carotenoides es ser la principal fuente de vitamina A para los consumidores, encontrándolos de manera abundante en frutas y verduras. Así mismo, diversas investigaciones se han llevado a cabo para evaluar el efecto anticarcinogénico de los carotenoides (Martínez-Martínez, 2003).

En la Figura 5. se observa un decremento en la concentración de carotenoides al ir aumentando el desarrollo del cladodio; la harina de nopal chico presentó diferencia significativa con respecto a las otras dos harinas.

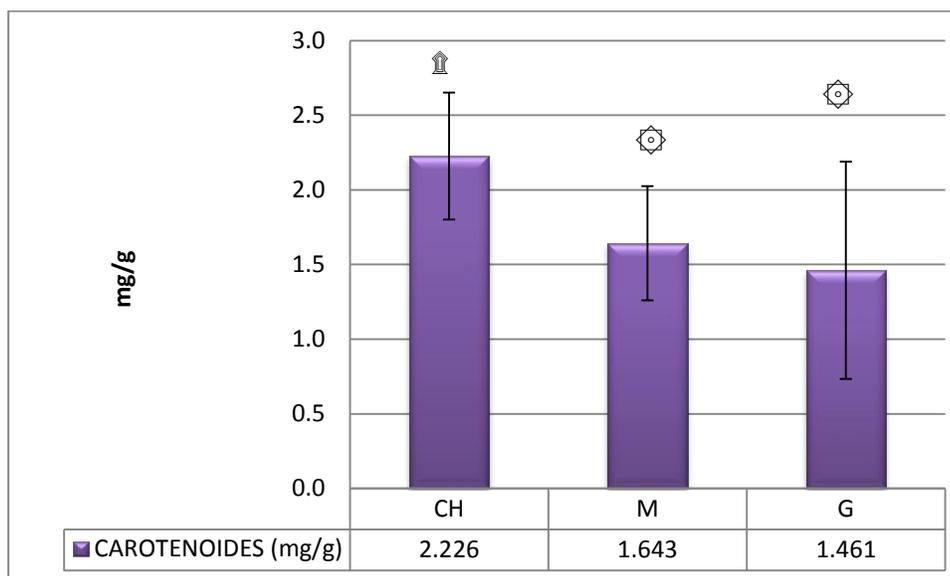


Figura 5. Concentración de carotenoides en las tres harinas de nopal de diferente etapa de desarrollo. Figuras diferentes indican diferencia significativa.

Las concentraciones de carotenoides presentadas en esta investigación son alrededor de 400 veces mayores a las reportadas anteriormente por Stintzing y Carle (2005) y Rodríguez-Félix y Cantwell (1988) quienes reportaron 25.8-44.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de tejido fresco y 11.3-53.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de tejido fresco, respectivamente, dependiendo de la etapa de desarrollo del cladodio, lo que equivaldría a 0.0043-0.0073 mg/g de materia seca y 0.0018-0.0089 mg/g de materia seca; la penca clasificada como chica en el presente estudio es comparable con la penca que resulta 30.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de tejido fresco, es decir, 5.15 $\mu\text{g}/\text{g}$ de materia seca en la literatura presentada. Lo anterior puede deberse a que los tratamientos térmicos incrementan la extractabilidad de estos pigmentos (Jaramillo-Flores y col., 2003 citado por Nazareno y Padrón-Pereira, 2011). Los valores publicados por Medina-Torres y col. (2011), cuyos cladodios llevaron un tratamiento térmico, resultan 2 veces menores a los presentados en este estudio.

5.1.3 Cuantificación de compuestos fenólicos.

5.1.3.1 Concentración de fenoles totales en harina de nopal en diferentes etapas de desarrollo del cladodio.

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas (Gutiérrez-Avella, 2008).

En la Figura 6. se observa un decremento en la cantidad de fenoles totales a medida que aumenta el desarrollo del cladodio, encontrándose diferencia significativa entre los tres grupos.

En la literatura se han reportado valores de 0.593 mg GAE/g de harina (Santos-Zea y col, 2011); sin embargo, la variabilidad de estos fitoquímicos puede deberse a factores genéticos, estrés ambiental, condiciones del medio ambiente y edad. Celis-Fabian (2009) reporta valores de 0.57 y 0.65 mg GAE/g de harina de nopal para nopales de tamaño equivalente al grupo presentado como CH.

Los valores consultados en la bibliografía son muy variables, teniendo valores desde 8-9 mg/100 g de tejido fresco, lo que equivaldría a 1.33-1.5 mg/g de materia seca (Stintzing y Carle, 2005) hasta valores de 180.3 ± 18.6 mg/g de materia seca (Lee y col., 2002). Los valores obtenidos por la presente investigación son similares a los reportados por Gallegos-Infante y Rocha-Guzmán (2009) y por Medina-Torres y col. (2011).

La disminución de fenoles totales a lo largo del estado de desarrollo, concuerda con lo reportado por Rodríguez-Félix y col. (2010).

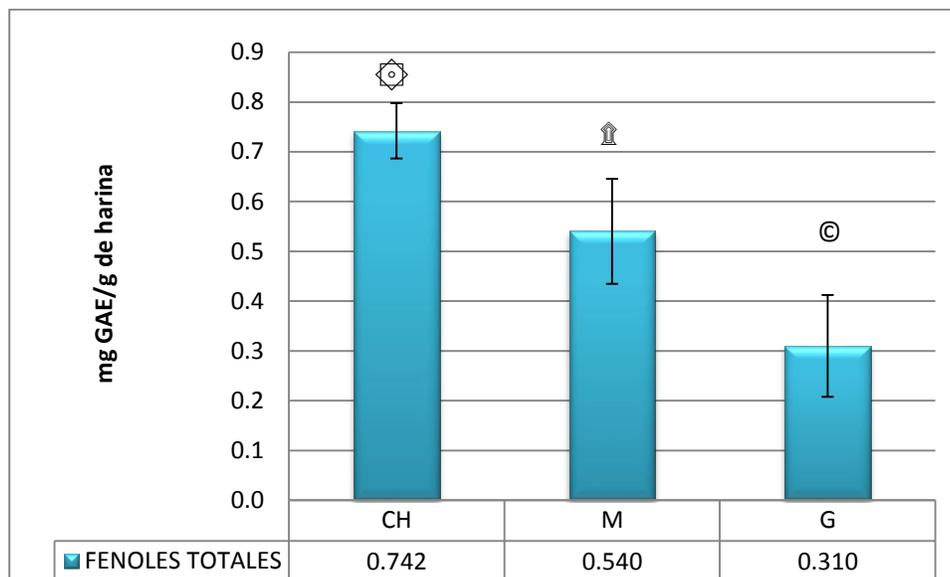


Figura 6. Concentración de fenoles totales en las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo. Figuras diferentes indican diferencia significativa.

5.1.3.2 Concentración de flavonoides totales.

Los flavonoides son considerados antioxidantes, debido principalmente a los múltiples dobles enlaces que presentan. Se les atribuye la prevención de la oxidación del colesterol LDL, además de que ciertos flavonoides mejoran la actividad de la vitamina C, protegiendo así contra infecciones y enfermedades de vasos sanguíneos.

La Figura 7. muestra que la concentración de flavonoides disminuye conforme se incrementa el tamaño del cladodio, las harinas CH y G presentan diferencia significativa, sin embargo, no se encontró diferencia estadística con la harina M.

La concentración de flavonoides en el presente trabajo coincide con los valores reportados por Gallegos-Infante y col. (2009) y por Medina-Torres y col. (2011) de 23.4 mg/g de harina y 20.79 mg/g de harina, respectivamente.

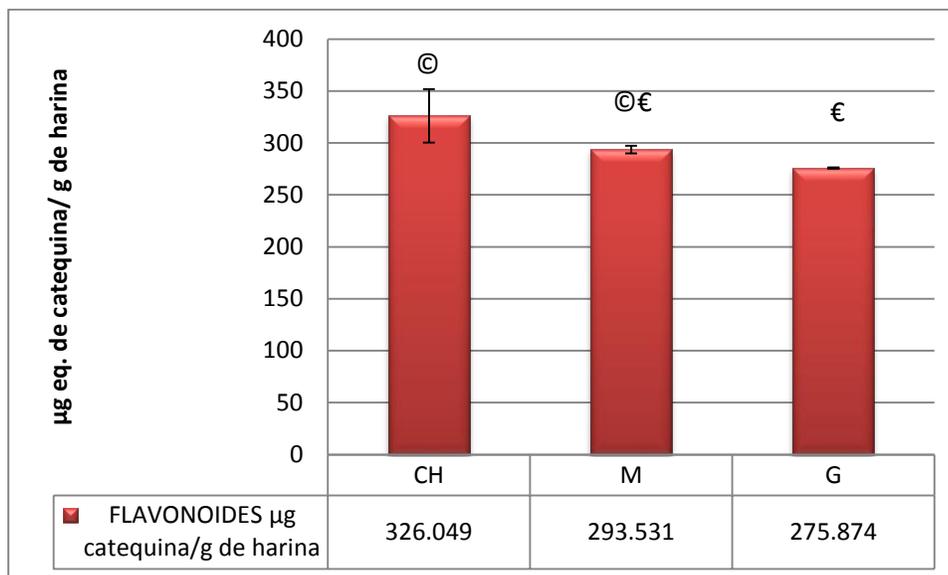


Figura 7. Concentración de flavonoides de las tres harinas de nopal de diferentes etapas de desarrollo. Figuras diferentes indican diferencia significativa.

Se observa un decremento en la concentración de flavonoides en los cladodios según su etapa de desarrollo, no se ha estudiado anteriormente la diferencia de concentración de flavonoides según estado de desarrollo en cladodios de nopal. Sin embargo, Rodríguez-Félix (2010) reportó diferencias en la concentración de diversos flavonoides en diferentes épocas de cosecha, siendo la isoramnetina, un flavonol, la menos concentrada en primavera pero aumentando su concentración a lo largo del tiempo. Los nopales de esta investigación se cosecharon en el mes de Septiembre, por lo que se puede suponer que la disminución en el contenido de flavonoides se debe a que dichos nopales no contienen isoramnetina. Sin embargo, se recomienda un análisis de identificación de flavonoides en las harinas utilizadas.

5.2 Concentración de glucosa y perfil de lípidos

Antes de realizar el sacrificio de los grupos de ratas se llevaron a cabo algunos análisis para evaluar el estado de salud de los mismos. Como se esperaba, los animales diabéticos presentaron la mayor concentración de glucosa en sangre (423.2 mg/dL), comparada con la concentración en el grupo CS (98.3 mg/dL)

(Cuadro 4). Además, se puede ver una disminución significativa en la concentración de glucosa sanguínea después del tratamiento con las harinas de nopal chico, mediano y grande (121.4, 130.0, 343.6 mg/dL, respectivamente).

En el mismo cuadro se presenta la concentración de insulina en suero de los grupos controles y tratados con las harinas de diferente etapa de desarrollo de nopal, observándose una disminución significativa en las ratas diabéticas y un aumento en la concentración de insulina en los tres grupos de ratas diabéticas tratadas, siendo el grupo tratado con harina de nopal chico quien presentó mayor efecto insulinogénico y el grupo tratado con harina de nopal grande quien presentó menor efecto insulinogénico.

De igual forma se realizó un análisis de perfil lipídico (Cuadro 5.), encontrándose una disminución en la concentración de triglicéridos y lípidos de muy baja densidad (VLDL) en el grupo tratado con harina de nopal mediano.

Cuadro 4. Efecto de la harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo en niveles de glucosa sanguínea e insulina de ratas diabéticas.

	Glucosa sanguínea (mg/dL)			Insulina (ng/dL)
	Semana 0	Semana 1	Semana 3	Semana 3
CS	73.1 ± 1.1 ^b	105.4 ± 4.9 ^d	98.3 ± 3.6 ^c	5.8 ± 0.3 ^a
CD	312.9 ± 25.8 ^a	307.0 ± 48.6 ^a	423.2 ± 22.7 ^a	0.1 ± 0.1 ^e
GCH	310.4 ± 24.9 ^a	242.0 ± 45.9 ^b	121.4 ± 22.2 ^b	3.2 ± 0.4 ^b
GM	310.4 ± 24.9 ^a	162.4 ± 36.0 ^c	130.0 ± 8.5 ^b	2.3 ± 0.2 ^c
GG	312.6 ± 24.8 ^a	244.8 ± 47.2 ^b	343.6 ± 61.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^d

Los datos se expresan como la media ± EE. Prueba de Tukey.

Cuadro 5. Efecto de la harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo en el perfil lipídico en ratas diabéticas.

	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Lipoproteínas de baja densidad (mg/dL)	Lipoproteínas de alta densidad (mg/dL)
CS	55.2 ± 6.9b	57.1 ± 10.9a	70.8 ± 11.0a	48.0 ± 8.0a
CD	123.6 ± 13.6a	70.8 ± 4.0a	98.6 ± 19.0a	51.0 ± 4.0a
GCH	81.0 ± 36.0a	59.2 ± 8.0a	75.6 ± 19.4a	33.2 ± 8.0a
GM	58.3 ± 6.5b	54.8 ± 6.5b	87.3 ± 4.8a	38.2 ± 4.8a
GG	135.7 ± 40.5 ^a	75.0 ± 12.7a	96.6 ± 18.7a	47.9 ± 12.7a

Los datos se expresan como la media ± EE. Prueba de Tukey

5.3 Marcadores antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos

5.3.1 En hígado

5.3.1.1 Concentración de GSH

El GSH es una molécula endógena o metabolito empleado como parámetro de estrés oxidativo; esta biomolécula es un tripéptido y tiene un papel fundamental en la protección celular contra el daño oxidativo. El GSH tiene un enlace γ -glutamilo y un grupo tiol (-SH) libre; el primer enlace impide que el GSH sea hidrolizado por las α -peptidasa; el segundo hace que el GSH sea reactivo con otras sustancias, incluyendo xenobióticos (Cisneros y col., 2011). Por lo anterior, la conjugación con glutatión es con frecuencia un proceso muy importante en la desintoxicación de diferentes compuestos (Benítez-Marín, 2008).

En la Figura 8. se observa que el grupo CD mostró los niveles más bajos de GSH; así mismo, se observa un restablecimiento en los niveles de GSH en hígado de ratas tratadas con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del

cladodio. Todos los grupos presentan diferencia significativa respecto CD, incluso CS. GCH presenta diferencia significativa con respecto a CS en un 49.19% más en los niveles de GSH. Por otro lado, los grupos GM y GG restablecen los niveles de GSH hepático sin mostrar diferencia significativa con CS (15.38% y 2.46% más respectivamente).

Entre los grupos tratados GCH y GM no existe diferencia significativa con respecto a los niveles de GSH, mientras que en la comparación de GG y GCH si se encontró diferencia significativa (31.31%).

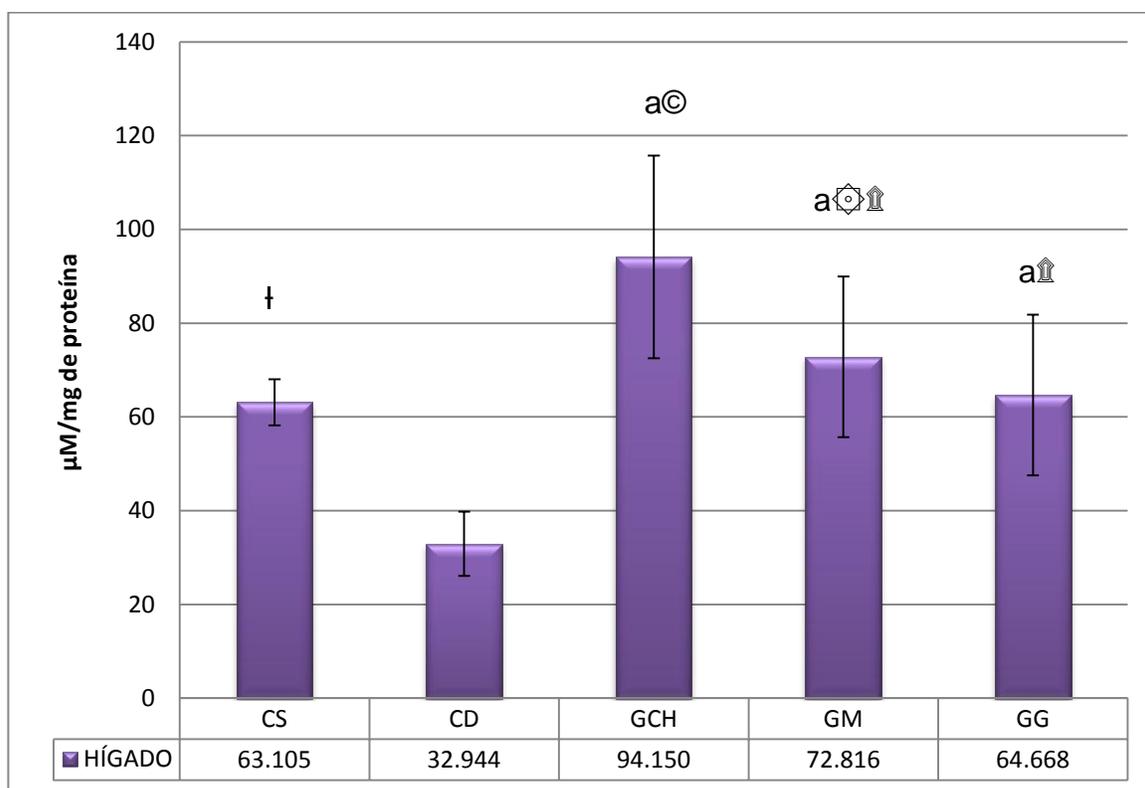


Figura 8. Concentración de GSH en hígado de los grupos control y grupos diabéticos tratados con harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo. † indica diferencia significativa (prueba t de Student respecto a CD). Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba Dunnet).

El decremento en la concentración de GSH en el tejido de rata diabética se ha descrito anteriormente por Kutlu y col. (2005) Zhang y Tan (2001) y Wohaieb y Godin (1987).

Los valores presentados por esta investigación son menores a los valores de GSH reportados en la literatura para control sano (41.55 ± 0.01 moles/mg de proteína) y para un grupo tratado con nopal (71.93 ± 0.01 moles/mg de proteína) (Hong-Ki y col., 2003), en dicha bibliografía se utilizó nopal de tamaño comercial, comparable con el nopal chico de esta investigación. Sin embargo, se puede hacer hincapié en el aumento de los niveles de los grupos tratados con las tres harinas de nopal con respecto al grupo CD. La literatura reporta un valor casi doble al grupo control (173%), mientras que nuestros resultados arrojan un aumento del 142%. Se encontraron valores de GSH en hígado de ratas sanas alrededor de 74.81 nmol/mg de proteína que es comparable con los resultados expuestos en la presente investigación. Hasta donde se revisó no existe en la literatura información con diferentes tamaños de nopal y su efecto en niveles de GSH en hígado de ratas.

En la correlación estadística, GSH tiene una relación directamente proporcional con el contenido de fenoles totales ($p = 0.00419$, $r^2 = 0.759$) lo cual es sustentado por la capacidad antioxidante que tienen dichos compuestos evitando así el uso y decremento de GSH endógeno. Por otro lado, la concentración de GSH mantiene una relación inversamente proporcional con la cantidad de clorofila ($p = 0.0267$, $r^2 = 0.726$) en las harinas de nopal, cuya presencia, como se explica en el punto 5.3.2.1, es inhibitoria de P450 disminuyendo de esta forma la actividad de GST y, por tanto, manteniendo los niveles de GSH, ya que éste no es usado como sustrato de la enzima.

5.3.1.2 Actividad de GST

La GST es una enzima implicada en la detoxificación de metabolitos reactivos, catalizando el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido, sobre el centro electrofílico de un gran número de estructuras tóxicas, así mismo es clasificada como un marcador de susceptibilidad (Gil-Hernández, 2000), siendo la única enzima que puede inactivar el radical $\text{OH}\cdot$.

En la Figura 9. se observa que el grupo CD mostró una actividad significativamente mayor, con un aumento del 47.07%, al grupo CS. Los grupos tratados con las harinas CH y M presentaron valores de actividad enzimática similares al grupo CS (16.16% menos y 21.63% más respectivamente) y por tanto diferencia significativa con respecto a CD. Estos resultados se pueden traducir en un restablecimiento de los niveles de GST en los tejidos de ratas diabéticas tratadas con las harinas de nopal. El aumento en la actividad de GST en el grupo control diabético se explica por el aumento de estrés oxidativo presente en el animal, y, por ende, iones OH⁻ que pueden trabajar como sustratos de esta enzima; el aumento de actividad se confirma con la disminución de GSH en el tejido, necesario para la actividad enzimática. En el análisis estadístico de grupos tratados se encuentra diferencia significativa entre cada uno.

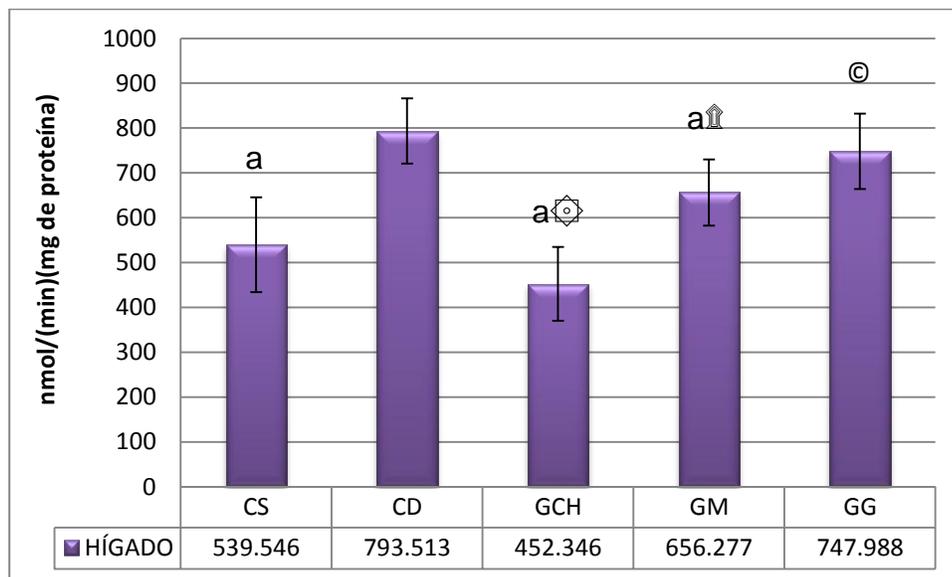


Figura 9. Actividad de GST en hígado de grupos control y grupos diabéticos tratados con harina de nopal de diferentes etapas de desarrollo. Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

Moron y colaboradores (1978) reportan valores de actividad de GST de 567 ± 184 nmol/min mg de proteína para hígado sano, Benitez-Marín (2008) reporta 556.32 ± 10.03 nmol/min mg de proteína, mientras que Sahu y Gray (1996) reportan $695 \pm$

21 nmol/min mg de proteína en ratas Sprague-Dawley macho de 200-300 g de peso corporal, lo cual nos indica un intervalo amplio de actividad en el mismo tejido sano.

Según Sahu y Gray (1996), ciertos flavonoides, los más representativos de estos compuestos, tienen un efecto contrario a lo que se espera, presentando una disminución en la actividad de GST, junto con los niveles de GSH. Lo anterior podría explicar la disminución de actividad en el grupo diabético GCH, ya que dicha harina presentó la mayor concentración de flavonoides respecto a las otras dos harinas.

El aumento en la actividad de GST en CD (47.07%) también es presentado por Raza y col. (1996) con valores de 997.72 ± 85.88 nmol/min/mg proteína para control sano y 1200.56 nmol/min/mg proteína para control diabético (20.33%), proponiendo un aumento en la actividad de las isoenzimas alpha y pi, como una alteración creada por la diabetes. En la presente investigación se propone que el aumento de actividad de GST se debe a un aumento en la actividad de citocromo P450 2E1, ya que éste es inducido por la diabetes (Shimojo y col., 1993; Orellana y Guajardo, 2004) y al aumentar la actividad de CP450 2E1, aumenta la actividad de GST para contrarrestar las sustancias reactivas producidas por el citocromo (González, 2005).

Estadísticamente, la actividad de GST mantiene una relación inversamente proporcional con la cantidad de fenoles totales ($p = 0.000178$, $r^2 = -0.810$), y una relación directamente proporcional a la clorofila ($p = 0.05$, $r^2 = 0.666$), presentes en las harinas, debido probablemente a la capacidad de la clorofilina para inducir la enzima hemooxigenasa (HO-1), cuya inducción está relacionada con la producción de hierro, lo cual aumentaría los sustratos para GST según la reacción de Fenton (Poss y Tonegawa, 1997), ayudando a contrarrestar los efectos de las moléculas oxidantes.

5.3.1.3 Actividad de CAT.

Esta enzima está involucrada en la protección frente a la acción destructiva del H_2O_2 producido durante el metabolismo celular, entre otros procedimientos que lo generan (Vargas-Caraveo, 2009).

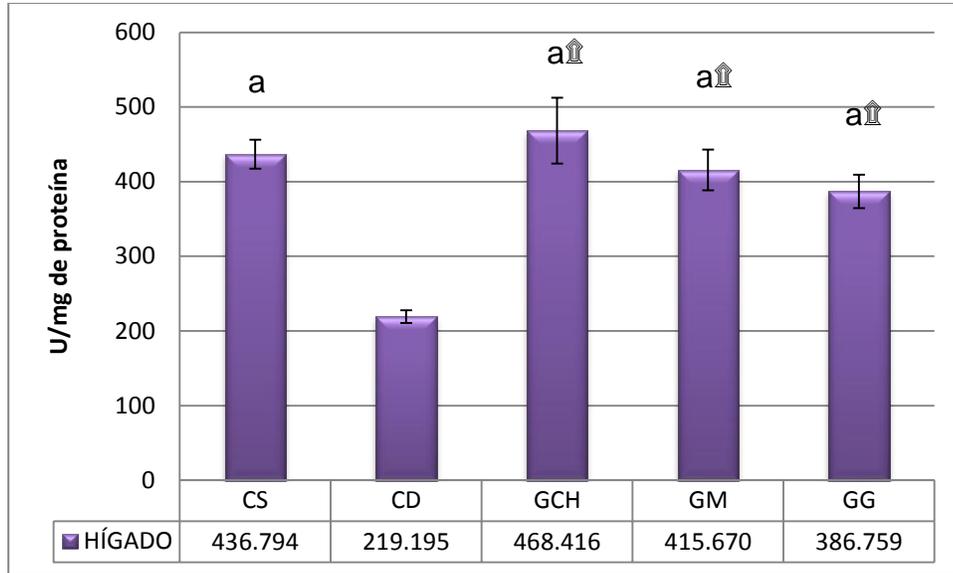


Figura 10. Actividad de CAT en hígado de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

En la Figura 10. se observa la determinación de la actividad enzimática de CAT en hígado, donde los grupos tratados con harina de nopal, en los diferentes estadios de desarrollo, muestran una actividad similar a CS, diferenciándose evidentemente de CD. El grupo CD tuvo 50% menor actividad que el grupo CS, mientras que los grupos diabéticos tratados GCH, GM y GG presentaron 136.98%, 89.51% y 76.44% más actividad que el grupo CD, respectivamente, siendo estas diferencias significativas respecto al grupo CD. Así mismo, se puede observar un decremento de la actividad enzimática conforme aumenta el tamaño del cladodio de nopal; sin embargo, ninguno de los tres presenta diferencia estadística con CS, demostrando con ello una restauración en la actividad de CAT.

En la literatura se presentan decrementos del 28% en la actividad enzimática de CAT de los controles diabéticos respecto con los controles sanos (Genet y col., 2002). Esta disminución se puede deber a la formación de EROs capaces de disminuir esta actividad (Kaleem y col., 2006).

Cabe mencionar que la tendencia en este estudio se cumple, es decir, un decremento significativo en la actividad de CAT en el control diabético, así como una restauración en la actividad de la enzima en los grupos tratados con harina de nopal. Además, se encontró una relación directamente proporcional de la actividad enzimática de CAT con el contenido de flavonoides ($p = 0.0592$, $r^2 = 0.794$), esta relación apoya la idea del efecto benéfico de los flavonoides en la dieta de personas diabéticas. El efecto de aumentar o restaurar la actividad de CAT radica en la capacidad de los flavonoides para retirar oxígeno reactivo en forma de hidroperóxidos (Martínez-Flores y col., 2002), principal sustrato de esta enzima.

5.3.1.4 Actividad de GPx.

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio-dependiente que convierte el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres, usando como cofactor GSH; por lo anterior, se considera un sistema antioxidante primario (Céspedes-Cabrera y Sánchez-Serrano, 2000). Aunque su función sobre el H_2O_2 sea la misma que la de la enzima CAT, sus mecanismos son diferentes, actuando GPx cuando hay una concentración baja de H_2O_2 y CAT cuando existe una concentración alta de este sustrato (Cisneros-Prego y col. 1997)

La Figura 11. muestra los promedios de la actividad enzimática de GPx en los grupos de ratas utilizadas en esta investigación. En estos resultados se observa que la actividad de GPx en el grupo CD es ligeramente mayor a la del grupo CS (8.58% más); sin embargo, no se encontró diferencia estadística entre ambos

grupos. Por otro lado, se encontró diferencia significativa de CD con GG y GM, este último se analizó de manera aislada con los grupos controles; GCH y CS no muestran diferencia significativa respecto a CD. El grupo diabético GG no muestra diferencia significativa con CS. El análisis estadístico entre grupos tratados con harina de nopal indica diferencia significativa entre cada uno ellos y se puede observar que el grupo GG disminuye la actividad enzimática de tal forma que no se encuentra diferencia significativa con el grupo CS y se encuentra diferencia significativa con el grupo CD.

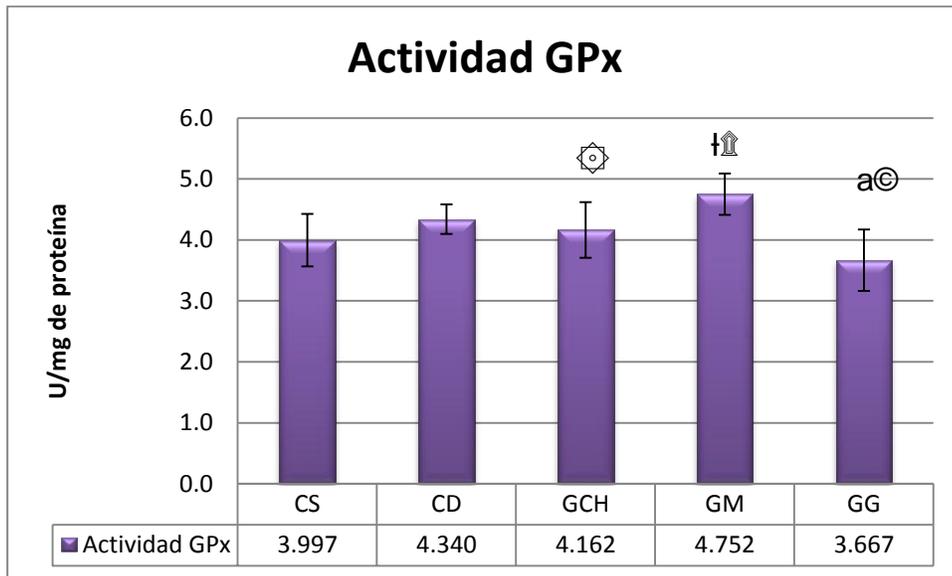


Figura 11. Actividad de GPx en hígado de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. † indica diferencia significativa respecto a CD (t de Student). Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

Li (2007) reporta un decremento del 34.48% en la actividad enzimática de GPx en el grupo CD respecto al grupo CS, mientras que Kaleem y col. (2006) reporta un decremento del 49.35%. Se han reportado valores de 56.19 mU/mg de proteína para hígado de ratas sanas y 65.68 mU/mg de proteína para hígado de ratas tratadas con *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg de peso corporal) (Hong-Ki y col., 2003). De manera similar, el grupo GM presentó una actividad enzimática

estadísticamente menor al grupo CS, y que por tanto muestra un restablecimiento de la actividad enzimática.

El aumento en la actividad de GPx en hígado pudo deberse al aumento de EROs, así como un aumento en los triglicéridos y por tanto lipoperóxidos en el grupo CD, que son sustrato de esta enzima.

En base al análisis de correlación se encontró una relación inversamente proporcional entre la actividad enzimática y el contenido de clorofila ($p = 0.0120$, $r^2 = 0.786$), lo cual se explica por la inducción de la enzima HO-1 por la clorofila. La HO-1 induce la formación de bilirrubina a la cual se le ha atribuido la capacidad de prevenir la formación de peróxidos (Pulla-Reddy y Lokesh, 1992; Ossola y Tomaro, 1998).

5.3.2 En riñón

5.3.2.1 Concentración de GSH

La Figura 12. muestra que el grupo CD no presentó diferencia significativa respecto a CS, mientras que los grupos diabéticos tratados presentaron diferencia significativa respecto a ambos grupos CS y CD. Además, no se encontró diferencia significativa entre los grupos diabéticos tratados con las diferentes harinas de nopal.

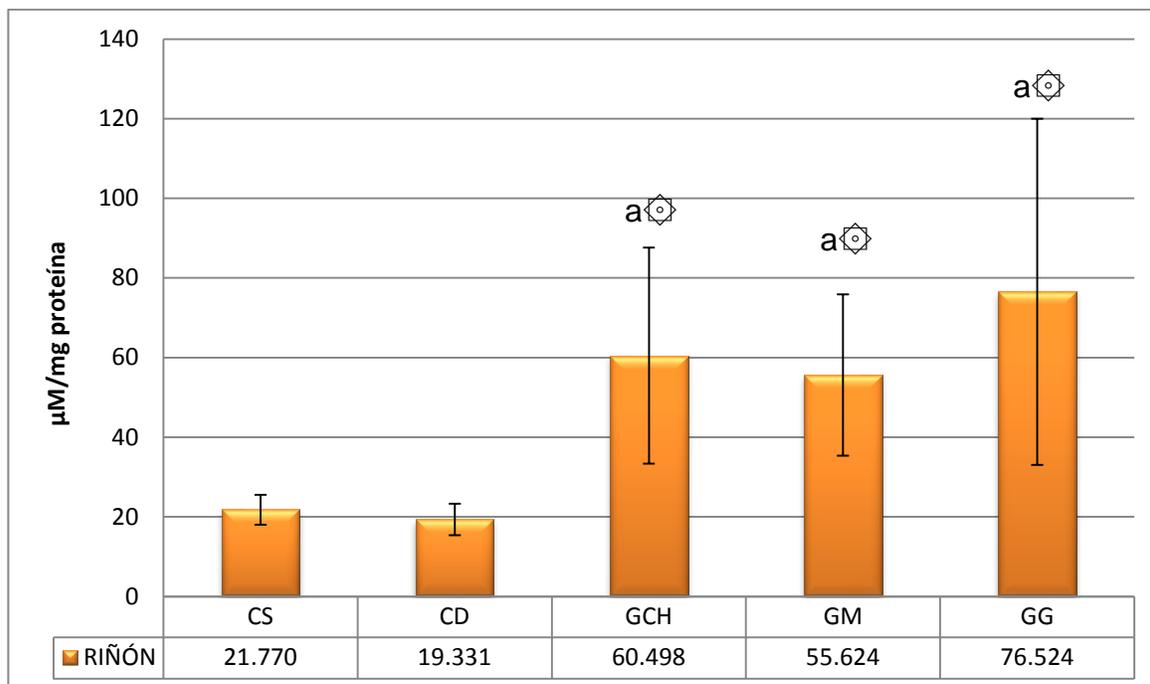


Figura 12. Concentración de GSH en riñón de los grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Dunnet).

Los animales del grupo CD muestran valores similares a los del grupo CS, contrario a lo que se esperaría, ya que una de las complicaciones de la diabetes es la nefropatía asociada principalmente con el estrés oxidativo. Sin embargo, se puede observar el efecto de la dieta suplementada con las harinas de nopal chico, mediano y grande en el aumento de la concentración de GSH (212.95%, 187.7% y 295.86% respectivamente comparados con CD), debido a los flavonoides presentes y compuestos bioactivos en general de las harinas. Martínez-Flores y col. (2002) reportaron que los flavonoides son importantes para el control de concentraciones intracelulares de GSH, aumentando en un 50% después de su consumo.

Hong-Ki y colaboradores (2003) reportan valores de 41.55 mol/ mg de proteína para el control sano y valores de 71.93 mol/ mg de proteína para un grupo con estrés oxidativo tratado con 200 mg/kg de peso corporal de nopal.

Tanto en hígado como en riñón se observa un aumento en la concentración de GSH después del consumo de las harinas de nopal sugiriendo que, aún en un estado diabético, es posible modular este marcador a través de la dieta.

5.3.2.2 Actividad de GST

En la Figura 13. se muestra la actividad de GST determinada en riñones de ratas control y ratas diabéticas tratadas con harina de nopal, observándose una disminución significativa en el grupo CD (17.23%) respecto a CS y un aumento en los tres grupos tratados (chico-15.48%, mediano-19.79%, grande-37.26%) con respecto a CD, siendo los animales del grupo GG los que presentaron mayor actividad de la enzima. Los grupos tratados con harina de nopal presentaron diferencia significativa con respecto al CD, más no con CS, lo que indica una restauración de la actividad enzimática de GST. El grupo GG presentó diferencia significativa con respecto a CS, habiendo un aumento en la actividad enzimática, debido probablemente a que hay mayor cantidad de EROs. En el análisis estadístico entre grupos tratados con harina de nopal, el grupo GG presentó diferencia significativa respecto a los otros dos grupos tratados (GCH y GM). Cabe mencionar que es un resultado contrario a los presentados en hígado.

Los valores encontrados en la literatura para actividad de GST en riñones de ratas diabéticas es de aproximadamente 240 nmol/min/mg de proteína, menor a los reportados en el presente estudio. Sin embargo, se observa la tendencia al decremento de actividad de la enzima en los tejidos enfermos en comparación con los tejidos sanos como es descrito por varios autores, pudiendo llegar a un decremento de 38% de actividad de la enzima en los tejidos de ratas diabéticas (Lapshina y col., 2006). Así mismo, se maneja un daño 5 a 8 veces mayor en riñón que en hígado de ratas diabéticas (Raza y col., 2003), lo cual también explica la diferencia de resultados en hígado y riñón.

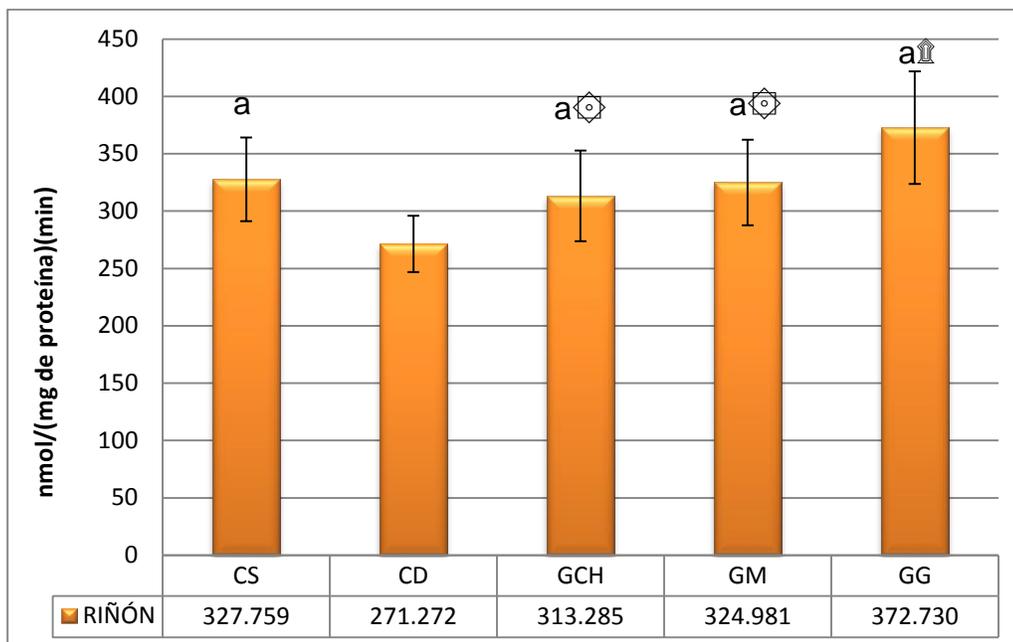


Figura 13. Actividad de GST en riñón de los grupos control y en los grupos diabéticos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

En base al análisis de correlación, la actividad de GST mostró una relación inversa con el contenido de fenoles totales ($p = 0.000178$ $r^2 = 0.877$), debido probablemente a la capacidad antioxidante de los fenoles que modula la actividad de esta enzima, ya que actúa directamente sobre las EROs. Por otro lado, la actividad de GST mostró una relación directamente proporcional al contenido de clorofila ($p = 0.05$ $r^2 = 0.666$) debido probablemente a la capacidad de la clorofilina para inducir la enzima HO-1, cuya inducción está relacionada con la producción de hierro, lo cual aumentaría los sustratos para GST según la reacción de Fenton (Poss y Tonegawa, 1997), ayudando a contrarrestar los efectos de las moléculas oxidantes.

5.3.2.3 Actividad de CAT

La Figura 14. muestra una disminución en la actividad de la enzima CAT en el grupo CD (33.51% respecto a CS). Por otro lado, los grupos diabéticos tratados con harina de nopal presentan diferencia significativa con respecto a CD, logrando

valores cercanos a CS. En el análisis estadístico entre grupos tratados no se encuentra diferencia significativa.

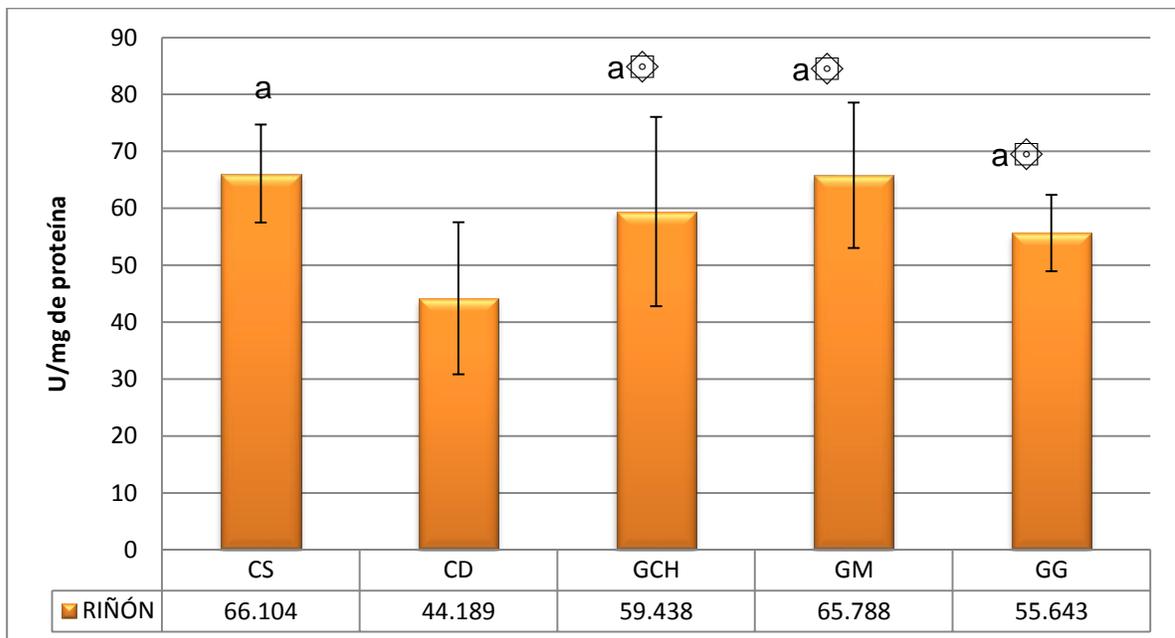


Figura 14. Actividad de CAT en riñón de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

La disminución de actividad de CAT en los controles diabéticos también ha sido reportada anteriormente por Morah y col. (2009) quienes encontraron valores de 39.7 ± 10.4 y 35.2 ± 10.5 K/s mg de proteína, el método utilizado en esta bibliografía se basa en la determinación de la constante de velocidad de la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante la cuantificación del cambio de absorbancia por minuto (Método descrito por Aebi) para controles sanos y diabéticos, respectivamente. También se puede comparar el efecto del nopal con un aumento en la actividad de la enzima con los valores presentados por Hfaiedh y col. (2008). Sin embargo, no se encontró relación estadística con ninguno de los compuestos bioactivos estudiados en la investigación.

5.3.2.4 Actividad de GPx

En la Figura 15. se puede observar un aumento significativo en la actividad de la enzima GPx en CD con respecto al grupo CS (19.81%). Por otro lado, los grupos tratados con las harinas de nopal tienden a restablecer la actividad de GPx; sin embargo, se observa un incremento no estadístico en los grupos de ratas tratadas conforme el tamaño del cladodio.

En riñón se encontró diferencia significativa de los grupos CS, GCH y GM con respecto a CD por medio de una prueba t de Student; GG no presenta diferencia significativa con ninguno de los grupos controles. En el análisis estadístico entre los grupos tratados se encuentra diferencia significativa del grupo GG contra GCH.

La literatura muestra un aumento en las actividades de GPx en tejidos de ratas diabéticas (Genet y col., 2002; Kanwar y col., 2005), esto se debe a un aumento en las EROs producidas por la diabetes.

Los compuestos fenólicos mantienen una relación inversamente proporcional ($p = 0.00684$, $r^2 = 0.732$) a la actividad enzimática de GPx, es decir, a mayor contenido de compuestos fenólicos en las harinas de nopal utilizadas, los tejidos presentaban menor actividad enzimática, ya que los compuestos fenólicos tienen un carácter antioxidante y reductor disminuyendo así la necesidad de hacer uso de esta enzima.

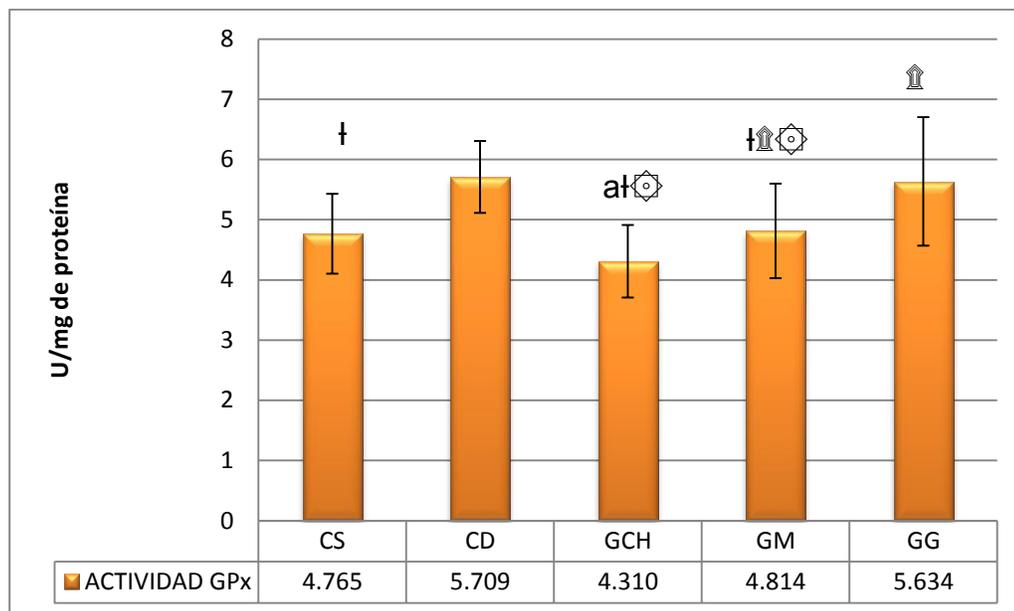


Figura 15. Actividad de GPx en riñón de grupos control y grupos tratados con harina de nopal en las diferentes etapas de desarrollo del cladodio. † indica diferencia significativa respecto a CD (prueba t de Student). Figuras diferentes indican diferencia significativa (prueba de Tukey). Letras diferentes indican diferencia significativa respecto a CD (prueba de Dunnet).

5.4 Correlación con parámetros bioquímicos.

Se realizó una prueba de correlación de los parámetros bioquímicos mencionados anteriormente (glucosa sanguínea, insulina y perfil lipídico) con los marcadores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para cada órgano, así como con las concentraciones de compuestos bioactivos de las harinas de nopal.

Se encontró una relación directamente proporcional de flavonoides con insulina en suero ($p = 0.00374$, $r^2 = 1$). A este respecto, Coskun (2005) sugiere que los flavonoides tienen un efecto protector sobre las células β -pancreáticas preservando su integridad. Por otro lado, la insulina mantiene una relación inversamente proporcional con la actividad de GST ($p = 0.033$, $r^2 = 0.999$), lo cual probablemente se debe a que el aumento de insulina en suero de las ratas diabéticas evita el estrés oxidativo creado por la hiperglicemia, lo que a su vez evita o modula el incremento en la actividad de la enzima GST. La actividad enzimática de CAT

presentó relación inversamente proporcional ($p = 0.0311$, $r^2 = 0.999$) con la actividad enzimática de GST, es decir, que cuando la enzima GST aumenta su actividad la enzima CAT disminuye, probablemente debido a que el principal sustrato de CAT, H_2O_2 , ya fue transformado al principal sustrato de GST (OH^\cdot). En la Figura 16. se puede observar de manera más gráfica estas correlaciones.

En riñón se encontró una relación directamente proporcional entre lipoproteínas de alta densidad y actividad enzimática de GPx, sugiriendo que las lipoproteínas tienden a sufrir lipoperoxidación, convirtiéndose en el principal sustrato de esta enzima.

6. CONCLUSIONES.

El consumo de alimentos nutraceuticos ha aumentado en las últimas décadas, por lo que el tener información científica sobre estos, en todos los ámbitos y bajo todos los factores variables de los mismos, es indispensable para aprovechar al máximo tal característica. Es por esto que se evaluó el efecto antioxidante de la harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) según la etapa de desarrollo en que se encuentra el cladodio. Este factor fue evaluado indirectamente con los efectos sobre los marcadores antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en hígado y riñón de ratas diabéticas. Para efectos de entendimiento las conclusiones se presentarán por órgano.

En hígado, se encontró que los niveles de GSH tienen una relación directamente proporcional a la concentración de fenoles totales e inversamente proporcional a la clorofila contenidos en las harinas de *Opuntia ficus-indica*. Para este marcador se observó un restablecimiento de niveles de GSH comparado con el control sano, siendo la harina de nopal chica quien tuvo mayor efecto positivo.

El marcador GST tiene una relación inversamente proporcional a la cantidad de fenoles totales y directamente proporcional al contenido de clorofila en las harinas de *Opuntia ficus-indica*. De igual forma, la harina de nopal chico tuvo mayor efecto benéfico para el restablecimiento de la actividad enzimática.

El contenido de flavonoides en las harinas mostró una relación directamente proporcional a la actividad enzimática de CAT, logrando un restablecimiento de la actividad; sin embargo, no se observó diferencia entre los tamaños del cladodio.

La actividad de la enzima GPx mostró una relación inversamente proporcional al contenido de clorofila en las harinas; sin embargo, no se encontró diferencia entre los controles y por tanto no se puede observar si hubo un restablecimiento de la actividad enzimática en los grupos tratados.

En la Figura 16. se presenta el balance redox encontrado en el hígado, tomando en cuenta los marcadores antioxidantes que se midieron.

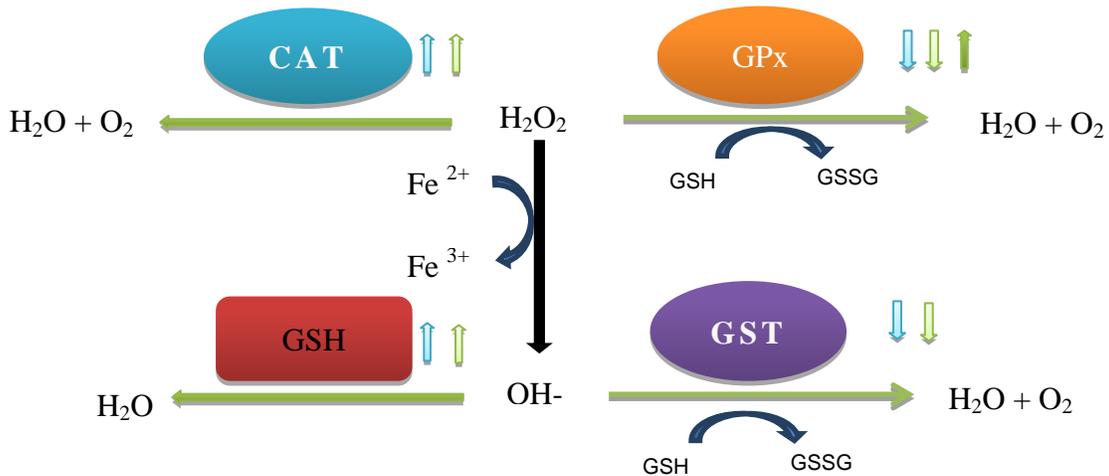


Figura 16. Esquema de balance redox como mecanismo de defensa antioxidante endógeno en hígado. Las flechas azules y verdes claro se refieren al comportamiento presentado por los grupos CS y GCH, GM, GG, respectivamente, en GPx la flecha verde fuerte representa a GM.

El comportamiento de los marcadores en el riñón fue similar al comportamiento en el hígado. Sin embargo, la relación que se observó con respecto al contenido de compuestos bioactivos de las harinas no fue igual.

Los niveles de GSH en este tejido no fueron diferentes entre los controles sano y diabético; sin embargo, los grupos tratados presentaron un aumento en la concentración de GSH, lo que indica un efecto benéfico por parte del tratamiento; aunque no hubo diferencia en los resultados según la etapa de desarrollo del cladodio.

El tratamiento con las harinas de nopal restableció la actividad enzimática de GST, siendo el cladodio de mayor tamaño quien alcanzó, no solo un restablecimiento, sino un aumento en la actividad enzimática. Dicha enzima mantuvo una relación inversamente proporcional a la cantidad de fenoles totales y directamente

proporcional al contenido de clorofila contenido en las harinas de *Opuntia ficus-indica*.

Al igual que en el hígado, las harinas de nopal restablecieron la actividad enzimática de CAT en las ratas diabéticas; sin embargo, no se encontró diferencia en la actividad por efecto del tamaño del cladodio.

La actividad enzimática de GPx en riñón fue restablecida por los grupos tratados con las harinas de cladodio chico y mediano, a diferencia de la harina de cladodio grande que presento niveles iguales al control diabético. Se mantuvo una relación directamente proporcional con el contenido de clorofila e inversamente proporcional con la cantidad de fenoles totales en las harinas de *Opuntia ficus-indica*.

En la Figura 17. se presenta el balance redox encontrado en riñón tomando en cuenta los marcadores antioxidantes que se midieron.

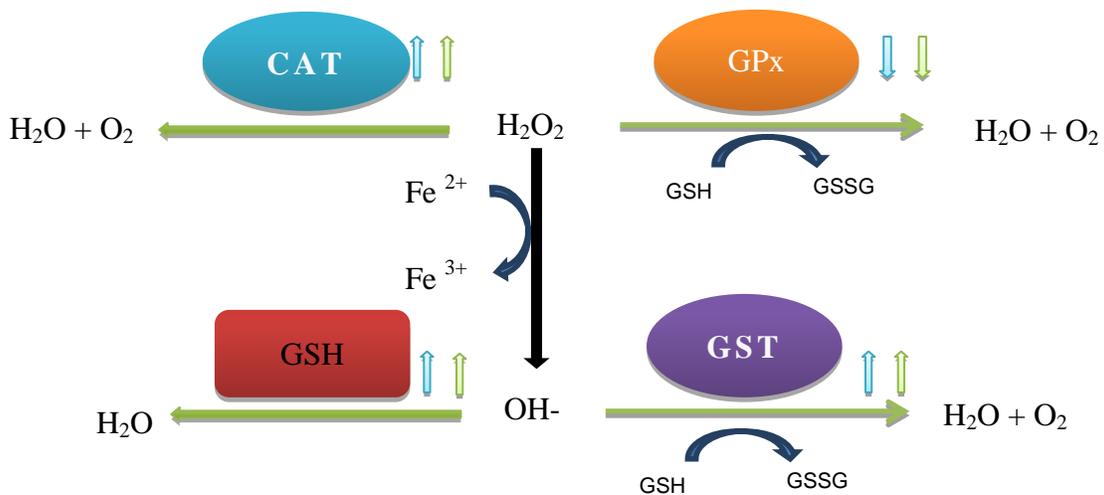


Figura 17. Esquema de balance redox como mecanismo de defensa antioxidante endógeno en riñón. Las flechas azules y verdes claro se refieren al comportamiento según los grupos CS y GCH, GM, GG respectivamente.

Los compuestos bioactivos que tuvieron efecto sobre los marcadores antioxidantes fueron la clorofila y los fenoles totales. El resumen de resultados se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Cuadro comparativo de las tres harinas de nopal según las diferencias estadísticas encontradas.

	GSH riñón	GSH higado	GST riñón	GST higado	CAT riñón	CAT higado	GPx riñón	GPx higado	puntos
GCH	+	+	-	+	+	+	+	-	6
GM	+	-	-	-	+	+	+	-	4
GG	+	-	+	-	+	+	-	+	5

Signo positivo indica mayor efecto benéfico sobre las otras dos harinas. Signo positivo en las tres harinas de nopal dentro de la misma columna indica que no hubo efecto estadístico por parte de la etapa de desarrollo del cladodio.

Si tomamos como un punto a cada signo positivo en el Cuadro 6. se puede llegar a la conclusión que la harina de cladodio chico ejerce los mayores efectos benéficos para los tejidos diabéticos comparada con las harinas de cladodio mediano y grande.

7. REFERENCIAS

Aguilar-Becerril G. Producción forzada de nopal (*Opuntia ficus-indica*) tlaconopal mediante anillado parcial. Rev Fitotec Mex [Serie en internet] **2005** [Consultado 2012 Febrero 05]; 28(3): 295-298.

Aguila-Becerril G, Peña-Valvidia C. Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal *Opuntia ficus-indica*. Rev Fitotec Mex [Serie en internet] **2006** [Consultado 2012 Mayo 20]; 29(3): 231-237.

Alcántar-Luna E. Presentación: impacto de la Diabetes Mellitus desde la perspectiva institucional. FMD **2011**. Disponible en: http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php.

Alvídrez-Morales A, González-Martínez B, Jiménez-Salas Z. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. Rev RESPYN [Serie en internet] **2002** [Consultado 2012 Enero 31]; 3 (3): [aprox 3].

American Diabetes Association. Treatment and care. **2012**. [Consultado 2012 Marzo 10]. Disponible en: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/insulin/insulin-basics.html>.

American Diabetes Association. Diabetes de la A a la Z. Barcelona, España: Padidós Ibérica S.A., **2004**; pps 25-40.

Arencibia D, Vidal A, Rosario L, Suárez Y, Delgado L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. Vacci Monitor [Serie en internet] **2011** [Consultado Febrero 20]; 20(1): 28-33.

Atalay M, Laaksonen D. Diabetes, estrés oxidativo y ejercicio físico. Department of physiology, University of Kuopio, Finlandia [Serie en internet] **2005** [Consultado 2012 Marzo 10]; 524. Disponible en: <http://www.g-se.com/pid/558/>.

Bahillo-Curienes M, Hermoso-López F, García-Fernández J, Ochoa-Sangrador C, Rodrigo-Palacios J, De la Torre-Santos S, Marugán de Miguelsanz J, Manzano-Recio F, García-Velázquez J, Lema-Garret T. Epidemiología de la diabetes tipo 1 en menores de 15 años en las provincias de Castilla y León. An Pediatr, **2006**;

65(1): 15-21.

Basurto-Santos D, Lorenzana-Jiménez M, Magos-Guerrero G. Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la diabetes mellitus tipo 2. Revista de la Facultad de Medicina UNAM [serie en internet] **2006** [Consultado 2012 Febrero 20]; 004: [6].

Benítez-Marín C. Efecto de extractos acuosos y metanólicos de plantas comestibles sobre biomarcadores antioxidantes en ratas sprague-dawley. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, **2008**.

Beristain-Perez A, Sánchez-Rodríguez M, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez V. Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores. Bioquímica, **2006**; 31(1): 13-22.

Black C, Donnelly P, McIntyre L, Royle PL, Shepherd JP, Thomas S. Meglitinide analogues for type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev [serie en internet]. **2007** [consultado 2013 Mayo 08]; Issue 2. Art. No.: CD004654. DOI: 10.1002/14651858.CD004654.pub2.

Brahmi D, Bouaziz Ch, Ayed Y, Mansour H, Zourgui L, Bacha H. Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus-indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. Nutr Metab [Serie en internet] **2011** [Consultada 2012 Febrero 05]; 8: 73.

Cai W., Gu X., Tang J. Extraction, purification, and characterization of the flavonoids from *Opuntia* milpa alta skin. Czech J. Food Sci [serie en internet]. **2010** [Consultado 2011 Julio 27]; 28: 108–116.

Candia-Plata M, Padilla-Barba A, Castillo-Campaña L, Galaviz-Moreno S. Elementos para diseñar la dieta de los pacientes con diabetes mellitus. Rev. Universidad de Sonora. **2008**; 22: 15-22.

Celis-Fabian E. Potencial nutraceutico de cladodios de nopal (*Opuntia spp.*). Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, **2009**.

Céspedes-Cabrera T, Sánchez-Serrano D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Rev Cubana Cardiol. **2000**; 14 (1):55-60.

Cisneros-Prego E, Pupo-Balboa J, Céspedes-Miranda E. Enzimas que participan

como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III Glutación Peroxidasa. Rev Cubana Invest Bioméd [Serie en internet] **1997** [Consultado 2012 Julio 9]; 16 (1): aprox 3.

Cisneros R, Oré R, Arnao I, Suarez S. Relación de glutación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). An Fac med [serie en internet] **2011**[Consultado 2012 Julio 9]; 72(2):107-11.

Cruces-Martínez M, Pimentel-Peñaloza A. Tópicos de genética. 1era edición. México, DF: Universidad Autónoma del Estado de Mexico, 2006: 55-77.

Cruz-Hernández J, Licea-Puig M, Hernández-García P, Abraham-Marcel E, Yanes-Quesada M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev Mex Patol Clin, **2011**; 58(1): 4-15.

Cruz M, Velasco E, Kumate J. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. Gac Méd Méx, **2001**; 137(2): 135-146.

Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res, **2005**; 51:117-123

Devlin T M; Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas; 5ta edición. Barcelona, España: Editorial Reverté, 2006: 590.

Escudero-Álvarez E, González-Sánchez P. La fibra dietética. Nut. Hosp. [Serie en internet] **2006** [Consultado 2012 Febrero 20]; 21: 61-72.

Federación Mexicana de Diabetes. Diabetes en números. México, DF. **2010**. Disponible en: http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php.

Ferruzzi M, Blakeslee J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivates. Nutrition Research. **2007**; 27:1-12

Flores-Valdez C, Luna-Esquivel J, Ramírez-Moreno P. Mercado mundial del nopalito. Chapingo: ASERCA, **1995**; 16-24.

García-Nava M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro **2007**. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf.

Gallegos-Infante J, Rocha-Guzmán N, González-Laredo R, Reynoso-Camacho R, Medina-Torres L, Cervantes-Cardoso V. Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). Int J Food Sci Nutr [Serie en internet] **2009** [Consultado 2012 Agosto 15]; 60 (S2): 80-87.

Genet Solomon, Kale Raosaheb, Baquer Najma. Alteration in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). Mol Cell Biochem. **2002**; 236 (1-2):7-12.

Gil-Hernández Fernando, El papel de los biomarcadores en toxicología humana. Rev Toxicol [Serie en internet]. **2000** [Consultado 2012 Julio 10]; 17(1): 19-26.

Gómez-Sánchez J. Efecto de la suplementación de metionina sobre el estrés oxidativo y de la edad sobre la presencia de ADN mitocondrial en el ADN nuclear, en rata wistar. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, **2010**. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/12003/1/T32607.pdf>.

González Frank. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutation Res. **2005**; 569 (1-2): 101-110

Gutierrez-Avella Dora Marina. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Agosto 2] aprox 5.

Guzmán-Loayza D, **Chávez** J. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. Rev Soc Quim Perú [Serie en internet] **2007** [Consultado 2012 Febrero 20]; 73: 42-45.

Harrak H, **Jaouan** F. Technological, organoleptic and nutritional qualities of cladodes powder of cactus (*Opuntia ficus-indica*). The VIIth ICCPC, **2010**, Disponible en: <http://www.vulgarisation.net/cactus-congress/s42-%20nutritional%20quality%20cactus%20cladode%20powder.pdf>.

Hernández-Granada E, Ramírez-Ortíz M, Corzo-Rios L. Efecto del estado de madurez sobre la composición química del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) var. Milpa alta. XVII Congreso nacional de ingeniería bioquímica [serie en internet] **2010** [consultado 2011 Julio 26]; [aprox 6]. Disponible en:

<http://biomedbiotec.encb.ipn.mx/congreso2010/Extensos/Alimentos/ALI271MER20091217.pdf>.

Hernández-Urbiola M, Pérez-Torrero E, Rodríguez-García M. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic harvest. Int J Environ Res Public Health [Serie en internet] **2011** [Consultado 2012 Febrero 05]; 8(5): 1287-1295.

Hfaiedh N, Allagui M, Hfaiedh M, Feki A, Zourgui L, Croute F. Protective effect of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. Food Chem Tox [Serie en internet]. **2008** [Consultado 2012 Mayo 14]; 46 (12): 3759-3763.

Hong-Ki J, Young-Kee J, Bae-Jin H. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* on glutathione and antioxidative enzyme. Kor J Life Sci, **2003**; 13(6): 911-916.

Ibrahim M, Elbehairy A, Ghoneim M, Ammer H. Protective effect of curcumin and chlorophyllin against DNA mutation induced by cyclophosphamide or benzoapyrene. Z Naturforsch [serie en internet], **2007** [Consultado 2013 Febrero 15]; 62 c: 215-222.

Jaramillo-Flores M, González-Cruz L, Cornejo-Mazón M, Dorantes-Álvarez L, Gutierrez-López G, Hernández-Sánchez H. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). Food Sci Tech Int, **2003**;9(4):271-278

Kutlu M, Naziroğlu M, Simşek H, Yilmaz T, Sahap Kükner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic rat. Int J Vitam Nutr Res. **2005**; 75(1): 71-80.

Kaleem M, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Singapore Med J, **2006**; 47(8): 670-675.

Kanwar Y, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner E, Chen S, Chugh S, Danesh F. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. Exp Biol Med, **2008**; 233: 4-11.

Lauder-Brunton T. The pathology and treatment of diabetes mellitus. BMJ [Serie en internet] **1874** [Consultado 2011 Agosto 07]; 221-224. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/25238039>.

Lapshina E A, Sudnikovich E, Maksimchik Ju, Zabrodskaya S, Zavodnik L, Kubyshin V, Nocun M, Kazmierczak P, Dobaczewski M, Watala C, Zavodnik I. Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. Life Scie [Serie en internet]. **2006** [Consultado 2012 Agosto 10]; 79 (19):1894-1811.

Li M. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative in rats. Int J Biol Macromol, **2007**; 40:461-465.

Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras J, Tuñón M. Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp. **2002**; 17 (6): 271-178.

Martínez-Flores H, Maya-Cortés D, Figueroa-Cárdenas J, Garnica-Romo M, Ponce-Saavedra J. Chemical composition and physicochemical properties of shiitake mushroom and high fiber products. CyTA-J Food [Serie en internet], **2009** [Consultado 2012 Febrero 20]; 7: 7-14.

Martínez-Martínez Alejandro. Carotenoides. Universidad de Antioquía. [Serie en internet] **2003** [Consultado 2012 Agosto 05]; aprox 10. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/carotenoides2001.pdf>.

Martínez-Martínez Alejandro. Flavonoides. Universidad de Antioquía [Serie en internet] **2005** [Consultado 2012 Agosto 07] aprox 75. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

McPhee S, Hammer G. Fisiopatología de la enfermedad. 6ta edición. México, DF: McGrawHill, **2011**: 505-522.

Medina-Torres L, Vernon-Carter J, Gallegos-Infante A, Rocha-Guzman E, Herrera-Valencia E, Calderas F, Jiménez-Alvarado R. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. J SCI Food Agric, **2011**; 91: 1001-1005.

Morah A, Aragón D, Ospina L. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. Vitae [Serie en internet] **2009** [Consultado 2012

Agosto 29]; 16 (3): 311-319.

Moreno-Altamirano L. Epidemiología y diabetes. Rev Fac Med UNAM [Serie en internet] **2001** [Consultado 2012 Febrero 18]; 44 (1): 35-37.

Moron M, Depierre J, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. Biochimia et biophysica acta (BBA)- general subjects, **1978**; 582(1): 67-78.

Nazareno M, Padrón-Pereira C. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de las cactáceas en la elaboración de alimentos. Componentes funcionales y propiedades antioxidantes. RVCTA [Serie en internet] **2011** [Consultado 2012 Agosto 20]; 2(1): 202-238.

Orellana Myriam, Guajardo Viviana. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. Rev Med Chile. **2004**; 132:85-94.

Ossola J, Tomaro M. Heme oxygenase induction by UVA radiation. A response to oxidative stress in rat liver. Int J Biochem Cell Biol, **1998**; 30: 285-292.

Palos-Suarez G. Evaluación de la capacidad antioxidante de la chaya (*Cnidioscolus chayamansa*) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Querétaro, **2007**.

Pérez-Trueba G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed. **2003**; 22 (1): 48-57.

Poss K, Tonegawa S. Heme Oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. PNAS [Serie en internet]. **1997** [Consultado 2013 Febrero 15]; 94(20): 10919-10924.

Pulla-Reddy A, Lokesh B. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. Mol Cell Biochem, **1992**; 111(1-2): 117-124.

Ramos-Ibarra M, Batista-González C, Gómez-Meda B, Zamora-Pérez A. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Rev Med Artemisa [Serie en internet]. **2006** [Consultado 2012 Febrero 15]; 8: 7-15.

Raza H, Ahmed I, Lakhani M, Sharma A, Pallot D, Montague W. Effect of bitter melón (*Momordica charantia*) fruit juice on the hepatic cytochrome P450-dependent

monooxygenases and glutathione S-transferases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*, **1996**; 52: 1639-1642.

Reynoso-Camacho R, González-Jasso E, Salgado L. La alimentación del mexicano y la incidencia de diabetes tipo 2. *Tip Rev Esp Cien Quim-Biol*. [Serie en internet] **2007** [Consultado 2012 Febrero 06]; 10: 36-38.

Rodríguez-Félix A, Fortiz-Hernández J, Robles-Burgueño M. Efecto del estado de desarrollo y época de cosecha en el contenido de flavonoides del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*). VII simposio internacional sobre la flora silvestre en zonas áridas [Serie en internet]. **2010** [Consultado 2011 Julio 27]; 871-873. Disponible en: http://www.dictus.uson.mx/florazonasaridas/CD%20in%20Extensos/Quimica%20Bioquimica/Rodriguez_Felix.pdf.

Rodríguez-Felix A, Cantwell M. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Food Hum Nutr* [Serie en internet] **1988** [Consultado 2012 Agosto 03]; 38: 83-93

Rodríguez-García M, Hernández-Becerra E, Cornejo-Villegas M, Palacios-Fonseca A, Rojas-Molina I, Reynoso R, et al. Physicochemical characterizations of nopal pads (*Opuntia ficus-indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Food Hum Nutr* [Serie en internet] **2007** [Consultado 2012 Febrero 05]; 62(3): 107-112.

Rosado J, Díaz M. Propiedades fisicoquímicas relacionadas con función gastrointestinal de seis fuentes de fibra dietética. *Rev Invest Clín* [Serie en español] **1995** [Consultado 2012 Enero 23]; 47(4): 283-289.

Ruiz-Roca B. Productos de la reacción de maillard y su influencia en la absorción de hierro y cobre. Relación con la capacidad quelante de metales. Tesis doctoral. **2009**. Departamento de Fisiología Facultad de Farmacia Universidad de Granada, Granada.

SAGARPA. Plan rector sistema producto nacional nopal. México DF: SAGARPA Diciembre **2004**.

Sahu S, Gray G. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett*, **1996**;104:193-196.

Santos-Zea L, Gutiérrez-Uribe J, Serna-Saldivar S. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. J Agric Food Chem, **2011**; 59(13): 7054-7061.

Schroeder S, Krupp M, Tierney L, McPhee S. Diagnóstico clínico y tratamiento. 25va edición. México, DF: Editorial El manual moderno, **1990**: 790-800

SEMARNAT. Nopal verdura. INE [Serie en internet] **2007** [Consultado 2012 Febrero 22]. Disponible en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/71/nverdura.html>.

Shamah-Levy T. Antecedentes de las encuestas nacionales de salud y nutrición México. 14vo Congreso de investigación en salud pública [Serie en internet] **2011** [Consultado 2012 Marzo 3]; pag 25. Disponible en: http://www.congisp2011.org/programa_cientifico/pdf/Viernes/S34/TShamah.pdf.

Shimojo N, Ishizaki T, Imaoka S, Funae Y, Fuji S, Okuda K. Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozocin-induced diabetes. Biochem Pharmacol, **1993**; 46(4): 621-627.

SIAP. Servicio de información agroalimentaria y pesquera, ficha técnica del nopal. **2011**[Consultado 2012 Febrero 19] Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=318.

Stintzing F, Carle R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. Mol Nut Food Res [Serie en internet] **2005** [Consultado 2012 Junio 15]; 49: 174-194.

Trinajstic E. Tratamiento farmacológico oral de la diabetes mellitus tipo 2. Biblioteca digital de la Universidad Nacional de Cuyo. **2012** [Consultada 2012 Febrero 24]. Disponible en: <http://www.scob.intramed.net/DIABETES%282%29-2.pdf>.

Valencia-Sandoval K, Brambila-Paz J, Mora-Flores J. Evaluación del nopal verdura como alimento funcional mediante opciones reales. Rev Agrocién [Serie en internet] **2010** [Consultado 2012 Febrero 06]; 44 (8): 955-963.

Vargas-Caraveo A. Respuesta antioxidante inducida por quercetina en linfocitos humanos circundantes. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Biomedicina Molecular. Instituto Politécnico Nacional, 2009.

Vidal-Quintanar R. Protección antioxidante en los alimentos. Rev Universidad de Sonora. **2008**; 22:26-28.

WHO. World Health Organization. Diabetes Programme. **2012** [Consultado 2012 Febrero 23] Disponible en: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index6.html.

Wohaieb S, Godin D. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: Effects of insulin treatment. Diabetes, **1987**; 36(9): 1014-1018.

Zhang X, Tan B. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol **2001**; 27: 358–363

Zou, D., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J.M., Wang, J., Zang, R., Liu, H. y Zou, C. 2005. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. Nutrition J [Serie en internet] **2005** [Consultado 2012 Febrero 20]; 4: 25-29.

8. ANEXOS

Anexo 1. Na_2CO_3 al 20%.

- a) Pesar 20 g y aforar a 100 mL en H_2O destilada.

Anexo 2. NaNO_2 al 5%

- a) Para 5 mL se pesan 0.25 g de NaNO_2 al 99.5% de pureza.
- b) Se adicionan 4.75 mL de H_2O destilada.

Anexo 3. AlCl_3 al 10%

- a) Para 5 mL se pesan 0.5 g de AlCl_3 .
- b) Se agregan 4.5 mL de H_2O destilada.

Anexo 4. NaOH 1.0 M

- a) Para 25 mL se pesa 1 g de NaOH .
- b) Se afora a 25 mL.

Anexo 5. Solución amortiguadora Tris/Sacarosa pH 7

- a) Pesar 7.9 g de Tris-HCl.
- b) Pesar 2.1 g de MgCl_2 .
- c) Pesar 1.9 g de KCl.
- d) Pesar 85.6 g de sacarosa ultra pura.
- e) Aforar a 1000 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Anexo 6. Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7

- a) Pesar 1.362 g de NaH_2PO_4 .
- b) Pesar 2.67 g de Na_2HPO_4 .
- c) Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Anexo 7. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5

- a) Pesar 4.725 g de NaH_2PO_4 .
- b) Pesar 2.237 g de Na_2HPO_4 .
- c) Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Anexo 8. Solución de trabajo para determinación de proteína

- a) Se miden 10 mL de reactivo A.
- b) Se agregan 200 μL de reactivo B.

Anexo 9. Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2

- a) Pesar 0.744 g de EDTA y aforar a 100 mL (concentración 0.02 M).
- b) Pesar 3.152 g de TRIS y aforar a 100 mL (concentración 0.2 M).
- c) Se mezclan con una proporción 1:1

Nota: Medir pH al 80% de la solución y aforar.

Anexo 10. Solución de trabajo inicial GSH

- a) Pesar 0.00184 g de GSH.
- b) Disolver en 10 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Anexo 11. Solución de DTNB 2.46 mM

- a) Pesar 0.0243 g de DTNB.
- b) Disolver en 25 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Anexo 12. Solución de ácido tricloro acético (TCA) al 20%

- a) Pesar 1.1051 g de TCA
- b) Disolver en 5 mL de agua destilada.

Anexo 13. Solución de trabajo GSH 3 mM

- a) Preparar una solución stock de 150 mM: pesar 0.0461 g de GSH y disolver en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).
- b) Para preparar la solución de trabajo se mezclan 140 μ L de solución stock y se añaden 6.86 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).

Nota: La solución stock es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Anexo 14. Solución de trabajo CDNB 2 mM

- a) Preparar una solución stock de 60 mM: pesar 0.0244 g de CDNB y disolver en 2 mL de metanol absoluto.
- b) Para preparar la solución de trabajo se mezclan 300 μ L de solución stock y se añaden 8.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).

Nota: La solución stock es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Anexo 15. Solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8.

- a) Se pesan 0.788 g de Tris-HCl (concentración 50 mM).
- b) Se pesan 0.0186 g de EDTA (concentración 0.5 mM).
- c) Se afora a 100 mL.

Nota: Se mide el pH al 80% y después se afora.

Anexo 16. Cocktail GSH/GR (25.2 mM GSH, 6 unidades de GR/mL)

- a) Pesar 0.0774 g de GSH y disolver en 10mL de solución amortiguadora de reacción (Anexo 18).
- b) Tomar 66 μ L de glutatión reductasa (GR).
- c) Aforar a 1 mL con solución amortiguadora de reacción.

Nota: El cocktail se guardó por separado, agregando 25 μ L de cada solución al pozo.

Anexo 17. Solución NADPH 1.5 mM

- a) Se pesan 0.0062 g de NADPH en 5 mL de solución amortiguadora de reacción.

Nota: La solución debe de utilizarse inmediatamente después de que se prepara y no debe de congelarse para su reuso.

Anexo 18. Hidroperóxido de cumeno 3 mM.

- a) Se toman 5.55 μ L de hidroperóxido de cumeno al 80% y se afora a 10 mL con H₂O destilada.

Anexo 19. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 mM.

- a) Tomar 340 μ L de H₂O₂ al 30% en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.