

**Actividades antiinflamatorias del nopal y la
tuna en el crecimiento de células endoteliales
(HUVEC)**

Ana Gabriela Armijos Livisaca

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ana Gabriela Armijos Livisaca

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC)

Presentado por:

Ana Gabriela Armijos Livisaca

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Francisco Bueso, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Susanne Mertens-Talcott Ph.D.
Asesora

Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC)

Armijos Livisaca Ana Gabriela

Resumen: Actualmente muchas frutas y vegetales son consumidos o están siendo introducidos en la dieta ya que poseen compuestos bioactivos asociados con beneficios a la salud. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antiinflamatoria que poseen los extractos de nopal, tuna y la combinación de estos, en concentraciones de 5, 10 y 20 ppm en células endoteliales. Se usó un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial. Los tratamientos fueron los tres extractos y las tres concentraciones. Se evaluó el crecimiento de células endoteliales HUVEC y se determinó el efecto de inhibición o reducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación, en células inflamadas con LPS (Lipopolisacárido) utilizando los primers COX-2, iNOS, TNF- α y NF- κ B. También, se realizó la identificación de proteínas inflamatorias mediante Western Blot. Se observó que el extracto de tuna (20 ppm) redujo la expresión de NF- κ B y COX-2. Al combinar los extractos de tuna y nopal (10 ppm), la reducción en la expresión de los genes mencionados fue 53.10 y 76.42%, respectivamente. Además, la combinación de los dos extractos redujo la expresión de la proteína inflamatoria NF- κ B. Se determinó que el extracto de nopal (21.04 μ mol TE/g) tuvo una capacidad antioxidante cuatro veces más alta que el de la tuna (4.83 μ mol TE/g). Este estudio demostró la capacidad antiinflamatoria del nopal y la tuna y la potente actividad que presentó la combinación de estos dos extractos en la actividad antioxidante y posible prevención de enfermedades crónicas como diabetes y cáncer.

Palabras clave: Alimentos funcionales, cultivo celular, inflamación, *Opuntia spp.*

Abstract: Nowadays, a variety of fruits and vegetables are consumed or introduced in the diet for their functional properties, which are associated with health benefits. The objective of this study was to determine the effects of extracts from nopal, prickly pear and the combination of these two extracts in three concentrations 5, 10 and 20 ppm in the inflammatory activity of endothelial cells. A randomized block design with factorial arrangement was used. The treatments were three extracts and three concentrations. HUVEC cell growth was evaluated and the inhibition of genes expression related with inflammation, in inflamed cells with LPS (lipopolysaccharide), using the primers COX-2, NF- κ B, iNOS and TNF- α . Furthermore, Western Blot analysis was assessed to identify inflammatory proteins. Prickly pear extract (20 ppm) decreased the expression of NF- κ B and COX-2. The reduction in the gene expression was 53.10% for NF- κ B and 76.42% for COX-2 when both extracts were combined (10 ppm). The ORAC assay showed that nopal extract had a higher antioxidant capacity (21.04 μ mol TE/g) than prickly pear extract (4.83 μ mol TE/g). This study demonstrated the anti-inflammatory activity of nopal and prickly pear and the potent activity that the combination of these extracts in the antioxidant capacity and possible prevention of chronic diseases like diabetes and cancer.

Keywords: Bioactive compounds, cell coulter, inflammation, *Opuntia spp.*

CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Portadilla | i |
| Página de firmas | ii |
| Resumen | iii |
| Contenido | iv |
| Índice de cuadros y anexos..... | v |
| | |
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| | |
| 2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 3 |
| | |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 11 |
| | |
| 4 CONCLUSIONES..... | 19 |
| | |
| 5 RECOMENDACIONES..... | 20 |
| | |
| 6 LITERATURA CITADA..... | 21 |
| | |
| 7 ANEXOS..... | 25 |

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | | Página |
|---------|---|--------|
| 1. | Diseño experimental para proliferación celular..... | 3 |
| 2. | Diseño experimental para la extracción de ARN..... | 4 |
| 3. | Diseño experimental para la extracción de proteína..... | 5 |
| 4. | Algunos alimentos (frutas y vegetales) con sus valores ORAC (USDA 2010) | 18 |
| | | |
| Figuras | | Página |
| 1. | Proliferación celular de células HUVEC en presencia de extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos extractos..... | 11 |
| 2. | Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de NF- κ B | 12 |
| 3. | Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de COX-2..... | 14 |
| 4. | Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de iNOS | 15 |
| 5. | Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de TNF- α | 16 |
| 6. | Análisis de Western Blotting. Expresión de la proteína inflamatoria NF- κ B con el uso de extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos | 17 |
| | | |
| Anexos | | Página |
| 1. | Abreviaturas..... | 25 |
| 2. | Etiquetado de los platos utilizados en los ensayos realizados. | 25 |
| 3. | Ejemplo de cálculos para los tres ensayos realizados..... | 26 |
| 4. | Cálculo de la dilución de los extractos..... | 26 |
| 5. | Cálculo para inducción de inflamación (LPS + extracto + medio)..... | 26 |
| 6. | Ejemplos de ensayos realizados..... | 27 |
| 7. | Mezcla maestra I y II para cADN. | 27 |
| 8. | Composición de los primers o cebadores utilizados en el ensayo de PCR. | 27 |
| 9. | Mezcla realizada para PCR. | 28 |
| 10. | Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados..... | 28 |
| 11. | Determinación de compuestos fenólicos por cromatografía y espectrometría (HPLC-MS)..... | 29 |

1. INTRODUCCIÓN

El nopal pertenece al género *Opuntia* y a la familia Cactaceae. La planta tiene dos partes, una parte vegetal conocida como nopal, nopalito o cladodio y el fruto comúnmente llamado tuna (Stintzing y Carle 2005, Yahia 2012). Es nativo de América del Norte y crece principalmente en las zonas áridas y semiáridas. Sin embargo, se adapta a las condiciones climáticas de Norte, Centro y Sur América, países Mediterráneos, Norte, Centro y Sud África, Australia y la India (Stintzing y Carle 2005).

Con aproximadamente 45% de producción México es el mayor productor de tuna, exportándose sólo el 1.5% (Sumaya-Martinez *et al.* 2011). El nopal es cultivado y cosechado como fruta y vegetal en varios países de América Latina y considerado una buena fuente de nutrición, es utilizado en la elaboración de cosméticos y medicinas por su alto contenido de fitoquímicos, también es utilizado como fuente de alimentación para el ganado (Ginestra *et al.* 2009 y Hamdi 2006). La composición de la fruta y el vegetal varía de acuerdo con la especie, edad de la planta, condiciones edáficas y prácticas agrícolas (Guevara Figueroa *et al.* 2010, Ortiz *et al.* 2010, Hamdi 2006 y Yahia 2012).

La tuna y el nopal poseen alta cantidad de compuestos bioactivos como fibra, vitaminas, proteínas, minerales (Magloire Feugang *et al.* 2006, Yahia 2012 y Guevara Arauza *et al.* 2011) por lo que son una importante fuente de alimento, ya que su consumo está relacionado con la prevención de contraer enfermedades: cardiovasculares, diabetes, cáncer e inflamatorias (Guevara Figueroa *et al.* 2010 y Magloire Feugang *et al.* 2006). Los consumidores cada vez muestran más interés por una alimentación sana que disminuya el riesgo de enfermedades (Sloan 2000).

Los alimentos que consumimos brindan nutrientes esenciales al cuerpo. En la actualidad una dieta moderna incluye frutas y vegetales, que poseen compuestos nutritivos y bioactivos que brindan beneficios a la salud, por lo que son conocidos como alimentos funcionales (Medina Torres *et al.* 2011 y Nunes 2011). Para disminuir la probabilidad de riesgo de contraer enfermedades crónicas se recomienda comer cinco porciones de frutas y vegetales al día (Paredes *et al.* 2010, Fraga *et al.* 2010 y Quideau *et al.* 2011).

“Un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar científicamente que posee efectos beneficiosos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de tal modo que mejore el estado general de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad o ambas cosas” (ILSI, FOFUSE 1999). Para identificar interacciones beneficiosas entre un compuesto funcional de un alimento y la salud en alguna función del organismo, se debe llevar a cabo estudios *in vitro* en cultivos celulares, modelos animales así como estudios con seres humanos (ILSI 1999).

Cuando no es posible medir directamente el agente funcional de un alimento se deben utilizar marcadores biológicos, los cuales deben ser biológicamente y metodológicamente válidos (Howlett y Shortt 2004), los marcadores biológicos son muy usados en varios campos de la biología, los mismo que son utilizados para la localización de genes de interés (Rentarí Alcántara 2007).

El nopal posee importantes compuestos bioactivos como fibra (Yahia 2012 y Hamdi 2006) proteínas, minerales, algunos ácidos como cítrico, malónico, pídico, succínico, tartárico (Yahia 2012) y eucómico (Stintzing y Carle 2005), los cuales son usados en medicina; actúa en la inhibición y tratamiento de úlcera de estómago (Ginestra *et al.* 2009; Hamdi 2006; Brahmi *et al.* 2011), en la disminución del nivel de glucosa y lípidos en la sangre siendo conocido como antiglucomiante, antidiabético y antiinflamatorio (Ginestra *et al.* 2009 y Nunes 2011). La tuna es una importante fuente de flavonoides, betalainas que actúan como antioxidantes efectivos y no causan daño a los humanos (Nunes 2011). También posee otros beneficios como actividades analgésicas, antiinflamatorias y antidiabéticas (Sumaya-Martinez *et al.* 2011 y Nunes 2011). Efectos antioxidantes importantes de las betalainas se han encontrado en modelos *in vitro* (Gentile *et al.* 2004).

Según Gosslau *et al.* (2011) la inflamación es una alteración patológica a la que el cuerpo reacciona; ocasionada en cualquier parte del organismo por patógenos. En norte América es considerada una de las seis causas más comunes de muerte, la cual incluye enfermedades cardiovasculares, respiratorias, inmunes, cáncer y diabetes. En varios cultivos de tuna provenientes de seis estados de México se encontró que los polifenoles y las betalainas tuvieron propiedades antioxidantes altas (Sumaya-Martinez *et al.* 2011). Betalainas presentes en la tuna demostraron que inhiben la expresión de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) en células endoteliales (HUVEC) (Gentile *et al.* 2004). Es por ello que los objetivos planteados fueron:

- Evaluar los efectos que presentan los extractos de nopal y la tuna en el crecimiento de células HUVEC (células endoteliales de la vena del cordón umbilical).
- Identificar los efectos antiinflamatorios del nopal, la tuna y la combinación de los dos extractos en la expresión de los genes COX-2, iNOS, TNF- α y NF- κ B.
- Identificar los efectos antiinflamatorios del nopal, la tuna y la combinación de los dos extractos en la expresión de proteínas inflamatorias.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de nopal y tuna.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se ejecutó en el Laboratorio de Nutrición y Ciencia de Alimentos de la Universidad de Texas A&M, donde se desarrollaron los ensayos para la identificación de las propiedades antiinflamatorias de los extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos. Está localizado en el campus de la Universidad de Texas A&M, del Departamento de Nutrición y Ciencia de Alimentos en el Edificio Centeq, College Station, Texas, Estados Unidos de América.

Diseño del estudio. Para proliferación celular se usó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 3×3 con tres extractos (nopal, tuna y combinación de los dos) y tres concentraciones (5, 10 y 20 ppm) de cada extracto mencionado anteriormente (Cuadro 1). Estos tratamientos fueron comparados con un control (proliferación celular en ausencia de extractos), para un total de 10 tratamientos con tres repeticiones y cada repetición analizada por triplicado para un total de 90 unidades experimentales. Se utilizó una separación de medias LSMeans para encontrar diferencias significativas en la interacción entre los extractos y las concentraciones. Para determinar si hubo diferencias significativas entre los extractos se utilizó la prueba Tukey como separación de medias. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Cuadro 1. Diseño experimental para proliferación celular.

| Extracto (Parte de la planta) | Concentraciones | | |
|--|------------------------|---------------|---------------|
| | 5 ppm | 10 ppm | 20 ppm |
| Tuna | TRT 1 | TRT 2 | TRT 3 |
| Nopal | TRT 4 | TRT 5 | TRT 6 |
| Combinación | TRT 7 | TRT 8 | TRT 9 |
| Control ^o | TRT 10 | | |

^oControl: crecimiento celular en ausencia de extractos.

Para extracción de ARN se usó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 3×2 con tres extractos (nopal, tuna y combinación de los dos) y dos concentraciones (10 y 20 ppm) de cada extracto mencionado (Cuadro 2). Estos tratamientos fueron comparados con un control negativo (proliferación celular en ausencia de extractos) y con un control positivo (células inflamadas con Lipopolisacárido, LPS)

para un total de ocho tratamientos con tres repeticiones y cada repetición analizada por triplicado para un total de 72 unidades experimentales. Se utilizó una separación de medias LSMeans para encontrar diferencias significativas en la interacción entre los extractos y las concentraciones. Para determinar si hubo diferencias significativas entre los extractos se utilizó la prueba Tukey como separación de medias. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Cuadro 2. Diseño experimental para la extracción de ARN

| Extracto | Concentraciones | |
|------------------------|-----------------|--------|
| | 10 ppm | 20 ppm |
| Tuna | TRT 1 | TRT 2 |
| Nopal | TRT 3 | TRT 4 |
| Combinación | TRT 5 | TRT 6 |
| Control + [§] | TRT 7 | |
| Control – ^ω | TRT 8 | |

[§] Control + células inducidas inflamación con LPS

^ω Control – células no inflamadas.

Para extracción de proteína se usó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 3×2 . Con tres extractos (nopal, tuna y combinación de ambas) y dos concentraciones (5 y 10 ppm) de cada extracto mencionado (Cuadro 3). Estos tratamientos fueron comparados con un control negativo (proliferación celular en ausencia de extractos) y con un control positivo (inducción de inflamación con LPS) para un total de ocho tratamientos con dos repeticiones y cada repetición analizada por triplicado para un total de 48 unidades experimentales. Se utilizó una separación de medias LSMeans para encontrar diferencias significativas en la interacción entre los extractos y las concentraciones. Para determinar si hubo diferencias significativas entre los extractos se utilizó la prueba Tukey como separación de medias. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Capacidad antioxidante. Para evaluar la capacidad antioxidante del nopal y la tuna mediante el método de ORAC se realizó una Prueba T, la cual permitió identificar si existieron diferencias significativas entre los dos extractos (nopal y tuna). Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Cuadro 3. Diseño experimental para la extracción de proteína.

| Extracto | Concentraciones | |
|------------------------|-----------------|--------|
| | 5 ppm | 10 ppm |
| Tuna | TRT 1 | TRT 2 |
| Nopal | TRT 3 | TRT 4 |
| Combinación | TRT 5 | TRT 6 |
| Control + [§] | TRT 7 | |
| Control – ^ω | TRT 8 | |

[§] Control + células inducidas inflamación con LPS

^ω Control – células no inflamadas.

Cultivo Celular. Para iniciar con el cultivo celular fue necesario preparar el medio y las sustancias necesarias para su óptimo desarrollo. Para las Células Endoteliales de la Vena del Condón Umbilical (HUVEC ScienCell™ Research Laboratories. Cat. # 8000), se necesitó las soluciones de Suero Fetal Bovino (FBS ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 0025) y Buffer Fosfato Salino (PBS) y 500 mL de Medio para células endoteliales (ECM ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 1001) el cual está compuesto de 5 mL de una solución de penicilina/estreptomicina, 5 mL de Suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 1052) y 25 mL de Suero Fetal Bovino (FBS FBS ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 0025).

Activación y siembra de células. Antes de iniciar con cada ensayo celular se calentó a 37 °C a baño maría ISOTemp 210, el medio y las soluciones de FBS, PBS y tripsina. Se extrajo dos viales de células HUVEC del tanque de nitrógeno líquido, los cuales se dejaron descongelar a temperatura ambiente aproximadamente por 10 minutos. Simultáneamente fue necesario limpiar el área de trabajo con etanol al 70% para tener un ambiente estéril en la Cámara de flujo laminar Forma 1400 Series Biological Safety and Cabinet, AEX 127905, Thermo Electron Corporation. El primer día se etiquetaron los platos con el nombre de la línea celular y el número de pasaje de los viales, la fecha de siembra y las iniciales de la persona encargada. Se colocó en los platos 9 mL de medio más 1 mL del vial, se agitaron los platos y se llevaron a la incubadora, Hepa class 100 forma series II, Thermo electron Corporation por 24 horas. Al día siguiente, se observaron que las células estén adheridas al fondo del plato. Se aspiró el medio el medio antiguo y se agregó 10 mL de medio nuevo. Finalmente, se llevó a la incubadora por 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂, Hepa class 100 forma series II, Thermo Electron Corporation.

Para determinar el nuevo número de platos a obtener después de 48 horas, se observó la confluencia (población de células) de los platos bajo el microscopio (90 a 95%). Se aspiró el medio y se agregó 5 mL de PBS (solución necesaria para lavar las células y permitir que las siguientes soluciones actúen correctamente). Se agregó 1 mL de tripsina al 0.05% a cada plato y se incubó por 5 minutos, para desprender las células. Se observó bajo el microscopio, que las células flotaran para proceder al siguiente paso. Se agregó 9

mL de FBS a cada plato, para inhibir la acción de la tripsina, luego se transfirió los 10 mL a dos tubos tipo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1,200 rpm por 2 minutos a 25 °C en la Jovan CR3: Centrífuga multifunción, Thermo Electron Corporation. Se aspiró la solución flotante teniendo precaución con el pellet de células formado en el fondo del tubo. Se añadió 2 mL de medio al tubo tipo Falcon y se mezcló. Se etiquetó cuatro nuevos platos con el nombre de la línea celular, número de pasaje, fecha y las iniciales de la persona encargada. Se tomó 1 mL de cada tubo tipo Falcon más 9 mL de medio ECM para así tener los nuevos platos de células. Se incubó a 37 °C y 5% de CO₂ en la Incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II, Thermo Electron Corporation, hasta que se tuvieron los suficientes platos con la confluencia necesaria (90 a 95%) para iniciar con los ensayos.

Siembra de células para los ensayos realizados. Se tomaron los platos más confluentes (90 a 95%) de la incubadora Hepa class 100 forma series II, Thermo electron Corporation., el número de platos dependió del ensayo a realizar. Se aspiró el medio antiguo, se agregó 5 mL de PBS (solución para lavar las células y permitir que las siguientes soluciones actúen correctamente), se mezcló y aspiró el contenido de los platos. Se agregó 1 mL de tripsina al 0.05% en cada plato y se incubó por 5 minutos para desprender las células como se mencionó en el método pasado. Se agregó 9 mL de FBS para inhibir el efecto de la tripsina, se transfirió el contenido de los platos a uno o varios tubos tipo Falcon de 15 mL o 50 mL según la cantidad de platos utilizados y se centrifugó a 1,200 rpm por 2 minutos a 25 °C utilizando Jovan CR3: Centrífuga multifunción, Thermo Electron Corporation. Se aspiró la solución teniendo cuidado con el pellet formado en el fondo del tubo. Finalmente se agregó medio ECM (3 mL por cada plato utilizado) y se mezcló para formar la suspensión celular.

Se midió la concentración de la suspensión celular, para ello se tomó una cubeta con 10 mL de solución isotónica y 50 µL de suspensión celular y se llevó al contador de células (Z2 Contador y Analizador de Células. Beckman Coulter). Conociendo la concentración de células, se realizaron los cálculos necesarios para determinar la cantidad de suspensión celular y medio a utilizar. Los cálculos se realizaron según el ensayo a realizar, ya que se utilizan platos con cantidad y dimensión de pocillos y con un volumen definido. Se mezcló medio ECM más suspensión celular y se agitó para tener una mezcla homogénea. Se necesitaron cantidades de células: para proliferación celular (15,000 células/pocillos), extracción de ARN (100,000 células/pocillo) y para extracción de proteínas (300,000 células/pocillo).

Proliferación celular. Una vez sembradas los platos de 24 pocillos a una densidad de 15,000 células/pocillo y con un volumen de 500 µL de mezcla (medio ECM más suspensión celular) por pocillo. Se incubó por 24 horas hasta que las células se adhirieron al fondo del plato. Al siguiente día, se calcularon las cantidades de mezcla necesarias para cada tratamiento. Se prepararon las mezclas de extracto más medio para tratar los platos en tres concentraciones (5, 10 y 20 ppm). Se aspiró el medio antiguo y se colocó 500 µL de la nueva mezcla, se llevó los platos a la incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ en la

Incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II, Thermo Electron Corporation por 48 horas.

El conteo celular se realizó a los dos días, se aspiró el medio antiguo de cada pocillo y se añadió 500 µL de PBS para lavar las células. Se aspiró la solución y se añadió 200 µL de tripsina al 0.05% y se incubó por 5 minutos. Se agregó 800 µL de FBS para inhibir el efecto de la tripsina y se transfirió los 1,000 µL de cada pocillo a tubos eppendorf de 2 mL etiquetados según el tratamiento. Se centrifugaron los tubos a 3,500 g durante 5 minutos, el pellet de células se formó en el fondo del tubo. Se aspiró la solución sin tocar el pellet y se añadió 125 µL de medio ECM y se re suspendió la mezcla, además se agregó 125 µL de la solución para conteo y viabilidad MuseTM para las células. Se mezcló en el vórtex y se incubó en la oscuridad por 5 minutos. Antes del conteo, se mezcló nuevamente en el vórtex y se contó cada uno de los tubos etiquetados utilizando el Contador y Analizador de células MuseTM cell analyzer.

Extracción de ácido ribonucleico (ARN). Una vez sembradas los platos de 12 pocillos a una densidad de 100,000 células/pocillo, con un volumen de 1,000 µL de mezcla (medio más suspensión celular) por pocillo. Se incubó por 24 horas hasta que las células se adherieron al fondo del plato. Al siguiente día, se calcularon las cantidades de mezcla necesarias para cada tratamiento. Se prepararon las mezclas de extracto más medio para tratar los platos en dos concentraciones (10 y 20 ppm). Se aspiró el medio antiguo y se colocó 500 µL de la nueva mezcla, se llevó los platos a la incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II. Thermo Electron Corporation a 37 °C y 5% de CO₂, por 30 minutos.

Después de 30 minutos se indujo inflamación a las células, para ello se preparó la nueva mezcla, lipopolisacárido (LPS) más medio ECM y más los extractos en las dos concentraciones utilizadas, para completar 1,000 µL en cada pocillo y se incubó por tres horas. Después de tres horas se aspiró la mezcla y se agregó 500 µL de PBS para lavar las células, luego se aspiró y agregó 350 µL de RLT Lisis Buffer para la extracción de ARN.

Se utilizó el Mini Kit RNeasy, QIAGEN, Cat. # 74104, se raspó cada pocillo y se transfirió a columnas Qia Shredder spin, colocados en tubos de colección de 2 mL. Se centrifugó utilizando la Micro centrifuga, Accuspin Micro 17R Fisher Scientist, a 13,000 × g por 2 minutos y se descartó la parte sobrenadante. Se agregó 350 µL de etanol al 70% para homogenizar. Se transfirió la mezcla a columnas RNeasy Mini spin, colocados en tubos de colección de 2 mL, se centrifugó por 15 segundos a 8,000 × g y se descartó el fluido. Se agregó 700 µL de Buffer RW1 a las columnas RNeasy Mini spin y se centrifugó por 15 segundos a 8,000 × g, al final se descartó el fluido. Se agregó 500 µL de Buffer RPE a las columnas RNeasy Mini spin, se centrifugó por 15 segundos a 8,000 × g y se descartó el fluido. Se agregó 500 µL de Buffer RPE a las columnas RNeasy Mini spin, se centrifugó por un minuto a 8,000 × g y se descartó el fluido. Se centrifugó por un minuto a velocidad máxima (13,000 × g) para secar la membrana.

Se colocó las columnas RNeasy Mini spin en nuevos tubos de colección de 1.5 mL; se agregó 20 µL de agua libre de nucleasas (RNase free water) y se centrifugó durante un minuto a 8,000 × g. Finalmente se descartó las columnas RNeasy Mini spin y se obtuvo el

ARN en los tubos de 1.5 mL. La calidad y concentración de ARN de cada muestra se midió usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Thermo Scientific, al finalizar se congelaron las muestras en a -80 °C hasta su posterior análisis.

Síntesis ADN complementario (cADN) y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT PCR). Con las concentraciones de ARN obtenidas se calculó la cantidad de agua y ARN (10 µL en total) necesarios para cada muestra y se colocaron en mini tubos eppendorf ya etiquetados. Para realizar la síntesis de cADN; se prepararon dos mezclas maestras (I y II) de acuerdo con la cantidad de muestras obtenidas. Se agregó 2 µL de la mezcla I en cada mini tubo y se incubaron los mini tubos por 5 minutos a 65 °C. Luego se agregó 7.8 µL de la mezcla II y se incubaron los tubos a 50 °C por una hora. Transcurrida la hora se agregó 20 µL de agua a las muestras.

Una vez listas las muestras, se prepararon las mezclas maestras de acuerdo con el número de primers o cebadores a utilizar. Se cargó el plato para PCR con 8 µL de cada una de las mezclas más 2 µL de cada una de las muestras. Cada una de las muestras fue cargada por duplicado, se cubrió el plato y se centrifugó a $3,000 \times g$ por 5 minutos a 22 °C. Finalmente se corrió el PCR utilizando el Equipo de PCR en Tiempo Real. 7900 HT Fast Real Time, Sequence detection system, Applied Biosystems, durante 2 horas. Se realizó una cuantificación relativa y los datos reportados fueron la relación de mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de otro gen (control).

Expresión de proteínas inflamatorias. Una vez sembradas las platos de seis pocillos a una densidad de 300,000 células/pocillo, con un volumen 2 mL de mezcla (medio más suspensión celular) por pocillo. Se incubó por 24 horas hasta que las células se adhirieron al fondo del plato. Al siguiente día se calcularon las cantidades para cada tratamiento y se prepararon las mezclas de extracto más medio para tratar los platos en dos concentraciones (5 y 10 ppm). Se aspiró el medio antiguo y se colocó 1 mL de la nueva mezcla, se llevaron los platos a la incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II. Thermo Electron Corporation a 37 °C y 5% de CO₂, por 30 minutos.

Transcurridos los 30 minutos se indujo inflamación a las células. Para ello se preparó la nueva mezcla, lipopolisacárido (LPS) más medio y más los extractos en las dos concentraciones utilizadas y así completar 2 mL en cada pocillo. Se incubó por 24 horas, luego se aspiró la mezcla y se agregó 500 µL de PBS para lavar. Finalmente, se aspiró y agregó 1 mL de PBS para la extracción de proteínas.

Antes de iniciar con la extracción fue necesario preparar lisis buffer de acuerdo con la cantidad de muestras. Se raspó cada pocillo y se colocó la solución en tubos Eppendorf de color de 1.7 mL etiquetados, los que permitieron observar el pellet de células. Se agregó 500 µL de PBS para lavar cada pocillo y se colocó en los mismos tubos eppendorf. Utilizando la Microcentrífuga. Accuspin Micro 17R Fisher Scientist se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 20 segundos a 2 °C. Se aspiró el PBS y se agregó 40 µL de lisis buffer en cada tubo. Se incubaron las muestras en hielo por 30 minutos, y cada 5 minutos se sonicaron por 10 segundos. Se centrifugaron las muestras a $10,000 \times g$ por 10 minutos a

2 °C. Se transfirió el contenido a nuevos tubos eppendorf y, finalmente se guardaron las muestras a -80 °C hasta su posterior análisis.

Método de Bradford para conocer la concentración de proteína total. Para la curva estándar se utilizó Albúmina de Suero Bovina (BSA) estándar (200 µg/mL). Se prepararon las muestras haciendo una dilución de 2:40 en agua. Se mezcló 1 mL de solución Bradford (Bio rad 500-0006) con 4 mL de agua. Se agregó las concentraciones estándar de BSA en cada pocillo en la primera y segunda columna, en la tercera y cuarta columna se colocó 5 µL de cada una de las muestras diluidas. Se agregó 200 µL de solución de Bradford/agua en cada uno de los pocillos. Las concentraciones fueron determinadas mediante el lector de absorbancia a FLOUstar Omega BMG LABTECH en un rango de 220 - 1,000 nm, las mismas que fueron dadas en µg/mL.

Determinación de proteínas por western blot. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, posteriormente fueron transferidas a membranas y finalmente fueron identificadas por los anticuerpos utilizados.

Antes de elaborar los geles, se preparó el equipo para cargarlos, fue necesario identificar el porcentaje y el volumen de gel a preparar dependiendo del peso de la proteína que se busca. Primero se preparó la mezcla para el gel de la parte de abajo. Se cargó 7.2 mL de la mezcla entre de los vidrios, asegurándose que no se derrame la mezcla, se agregó 2 mL de etanol al 100% y se dejó en reposo por 20 minutos. Se preparó la mezcla para el gel de la parte superior, una vez lista se retiró el etanol al 100%. Se cargó la mezcla hasta que quedó lleno el equipo. Se colocó los separadores de peinilla entre los vidrios teniendo cuidado que no se formen burbujas y se esperó hasta que el gel estuvo establecido.

Para la preparación de las muestras se usó 60 µg de proteína, para lo cual se realizaron los cálculos necesarios de agua y proteína. Se tomó la cantidad necesaria de cada muestra y agua, el volumen final no fue mayor a 40 µL. Se agregó el buffer y se hirvieron las muestras a 95-100 °C. Antes de cargar las muestras, se preparó el equipo para correr la electroforesis. Se retiró los separadores de peinilla del gel y se cargaron las muestras en las aberturas marcadas, en la primera y última abertura se cargó el marcador. Una vez cargadas las muestras se corrió la electroforesis durante dos horas a 100 V.

Para la transferencia a la membrana, se retiró el gel de los vidrios. Se activó la membrana en metanol al 100%. Se preparó el sándwich para transferir las proteínas a la membrana teniendo cuidado de que no se formen burbujas, se trabajó en buffer de transferencia para prevenir que la membrana se seque. Se colocó el contenedor en un agitador de placa caliente y se estableció el equipo en 0.15 A durante una hora 15 minutos. Después del tiempo establecido, se retiró la membrana y se la colocó en buffer de lavado. Se bloqueó la membrana en una solución con leche descremada al 5% por una hora a una temperatura de 22 a 25 °C, para prevenir que los anticuerpos y otras proteínas inespecíficas se peguen a la membrana.

Después de bloquear las membranas se procedió a la incubación de las mismas con los anticuerpos, se preparó el primer anticuerpo en una solución de BSA al 3%. La cantidad de anticuerpo utilizada dependió de la marca utilizada, para Cell Signaling Technology, 10 μL en 10 mL de BSA y para Santa Cruz Biotechnology, Inc, 20 μL en 10 mL de BSA. Se colocó la membrana en un agitador y se incubó en el refrigerador a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se lavó la membrana tres veces por 15 minutos.

El segundo anticuerpo se preparó en una solución de leche descremada al 5% en una dilución 1:2000 (4 μL en 8 mL de solución o 5 μL en 10 mL de solución) y se incubó en el agitador a una temperatura de 22 a 25 °C por una hora. Se lavó la membrana tres veces por 20 minutos.

Se preparó la solución luminiscente para la detección de proteínas. Se colocó la membrana dentro de una bolsa plástica y se cubrió con la solución, posteriormente se llevó al Detector de imágenes. UltraLum Omega 12iC Molecular Imaging para la detección de las proteínas.

Capacidad antioxidante. Se utilizó el ensayo capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) adaptado para trabajar con un espectrofotómetro de fluorescencia Lector de fluorescencia en microplatos FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH (485 nm de excitación y 538 nm de emisión) y un microplato de 96 pocillos. Primero, se elaboró una solución a 200 μM que contenía la molécula ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilclorman-2-carboxílico (Trolox) que fue la base comparativa, con la que se realizó la curva estándar. También se realizó una solución de 10 mg de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH – “azo-indicador”) Waco Chemicals® en 10 mL de buffer fosfato, este fue la fuente de radicales de peróxido, es decir el inductor de oxidación. El indicador que se usó fue la molécula Fluoresceína.

Se diluyó 15 μL , de una solución stock de 50 nM, en 50 mL de buffer fosfato. Se utilizaron los 96 pocillos de los platos para hacer varias lecturas de las muestras, el blanco, y la curva estándar en una sola corrida. En el plato se utilizaron 12 celdas para blancos y se hicieron dos curvas estándar con seis concentraciones de Trolox (50, 25, 12, 6, 3 y 1.5 μM).

Para pipetear cada celda se utilizó 50 μL de muestra. Se puso la fluoresceína y el AAPH en contenedores conectados a las mangueras alimentadoras del espectrómetro de fluorescencia, este inyectó 50 μL de AAPH y 100 μL de solución de fluoresceína en cada celda del micro-plato y registró la absorbancia de cada plato cada dos minutos durante 70 minutos. Los datos de absorbancia de cada tiempo se registraron y se utilizó una plantilla en Excel creada para hacer un ajuste de la curva de absorbancia presentada por cada celda, la dilución, los blancos y la curva estándar para presentar la absorbancia de la muestra en cada celda. Los datos se reportaron como $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proliferación celular. No existieron diferencias significativas, ya que la probabilidad fue de $P > 0.05$, en la interacción de los extractos y las concentraciones utilizadas. Los resultados obtenidos fueron variables, ya que factores como tiempo de incubación, medio utilizado y el pipeteo pudieron influenciar en la variación de población celular a pesar de contar con un número elevado de repeticiones (9) por tratamiento (Figura 1).

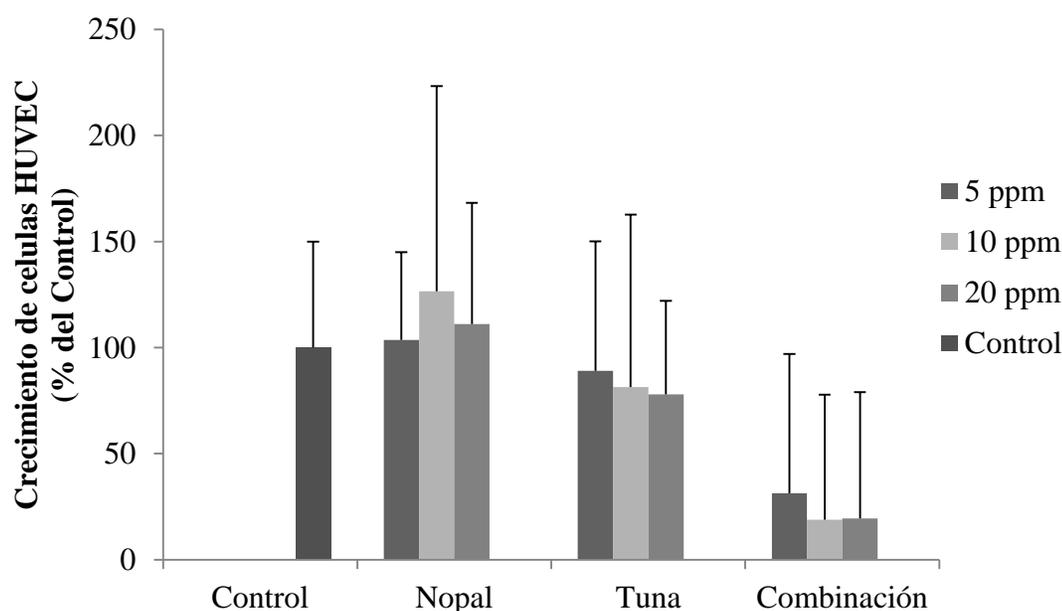


Figura 1. Proliferación celular de células HUVEC en presencia de extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos extractos.

Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). En este ensayo no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en cantidad de ARN, los datos obtenidos fueron variables ya que factores como mala extracción, desinfección deficiente del lugar de trabajo y superficies del laboratorio, calidad del agua utilizada, pipetas, puntas de pipetas y pipeteo pudieron influenciar. Lo que interesó para los análisis posteriores fue la calidad del ARN, la misma que estuvo determinada por la relación de absorbancia 260/280 la cual arriba de 1.8 indica pureza o carencia de polisacáridos (Garrido Gutiérrez s.f. y FBMC) sin embargo la calidad del ARN está determinada por su aplicación.

El ARN mensajero (mARN) de alta calidad fue usado para la síntesis de cADN, el cual es un ADN de cadena doble, el mismo que posteriormente fue utilizado para realizar RT-PCR con el uso de los primers o cebadores TNF- α , NF- κ B, iNOS y COX-2, que son los encargados de iniciar la reacción de PCR en cadena.

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), es una proteína que trabaja como factor de transcripción, presenta un rol importante en la respuesta inmune, inflamatoria, proliferación celular y apoptosis (Dąbek *et al.* 2010; Roman-Blas y Jiménez 2006). Especies reactivas de oxígeno contribuyen a la inflamación, cuando hay activación de NF- κ B, causando inflamación en la mucosa intestinal y provocando inflamación del intestino (Kaplan *et al.* 2007).

En la expresión de NF- κ B se observó que el extracto de tuna en concentraciones de 20 ppm inhibió la expresión del gen en un 37.85% al compararlo con el control positivo. Extractos de tuna y cereza han demostrado que reducen la activación de NF- κ B (Nunes 2011). Al combinar los dos extractos se observó que el efecto antiinflamatorio incremento ya que la expresión de NF- κ B se redujo en un 52.54% en promedio al compararlo con el control positivo (Figura 2). En estudios realizados, compuestos han demostrado que inhiben la expresión de NF- κ B, siendo los antioxidantes un grupo muy estudiado por estas características (Dąbek *et al.* 2010). Los polifenoles presentan beneficios para la salud (Quideau *et al.* 2011) y pueden actuar como moduladores de la producción de enzimas (Fraga *et al.* 2010), en el vino tinto se ha encontrado un polifenol (resveratrol) que inhibe la expresión de NF- κ B (Csiszar *et al.* 2006).

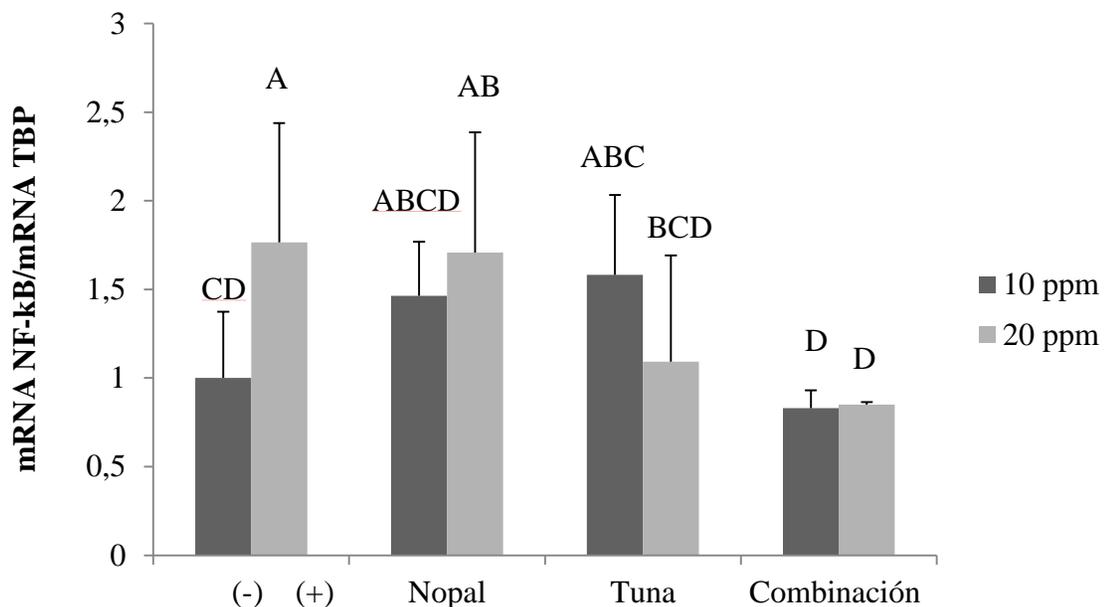


Figura 2. Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de NF- κ B.

^{A,B,C} Medias con diferente letra indica que hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

(-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas en ausencia de extractos.

(+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con LPS en ausencia de extractos.

Combinación: mezcla de los extractos en partes iguales.

La Ciclooxygenasa (COX) es una enzima encargada de convertir ácido araquidónico en prostaglandinas. Existen tres formas: COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-2 en condiciones normales no existe en tejidos y células; excepto en riñón, cerebro, placenta y en plaquetas de nueva formación (López Parra 2001). Sin embargo, esta se regula y aparece cuando el cuerpo sufre una lesión y produce inflamación y dolor, incluso está relacionada con la carcinogénesis. Es conocida como forma inducible ya que se regula en respuesta a estímulos proinflamatorios como LPS, interleucina IL-1 (López Alonso 2011), IL-6 (Díaz Prado *et al.* 2009), entre otros.

Al examinar el efecto de los extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos en la expresión de COX-2 en células HUVEC, se observó que el nopal en concentraciones de 20 ppm tuvo un efecto negativo ya que incrementó la expresión del gen en un 35.85% al compararlo con el control positivo. Mientras que el extracto de tuna en concentraciones de 20 ppm inhibió la expresión del gen en un 39.62% en relación al control positivo (Figura 3). Esto puede ser debido a que la tuna presenta compuestos como las betalaínas las cuales son conocidas por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Stintzing y Carle 2005, Magloire Feugang *et al.* 2006, Sumaya-Martinez *et al.* 2011, Jiménez-Aguilar s.f). En estudios realizados, las betalaínas reducen la expresión de COX-2 (Reddy 2007).

Al combinar los dos extractos se observó que el efecto antiinflamatorio aumentó ya que en concentraciones de 10 ppm y 20 ppm la expresión del gen se un 76.42% y 64.15%, respectivamente al ser comparado con el control positivo (Figura 3). La combinación de fitoquímicos presentes en frutas y vegetales incrementa la actividad antioxidante, existe una sinergia (Hai Liu 2004). La expresión de COX-2 disminuye con el uso de antiinflamatorios (López Parra 2001).

Las prostaglandinas en el cerebro son producidas por la COX-2, influenciadas por las citoquinas y especies reactivas de oxígeno en las neuronas, el aumento de prostaglandinas actúan como señales de inflamación (Martínez-Canabal y Rivas 2005), además este aumento puede causar carcinogénesis debido a efectos ocasionados en la producción celular (Díaz Prado *et al.* 2009). Los compuestos que inhiben la inflamación, están relacionados con la protección de enfermedades que causan el envejecimiento.

Según varios estudios epidemiológicos y clínicos el consumo diario de frutas y vegetales está asociado de manera positiva a una probabilidad menor de enfermedades causadas por los radicales libres. En el cerebro ocurre una actividad elevada de COX-2 cuando hay infección, esta es notoria ya que se presenta aumento de la temperatura corporal, en este estado de fiebre existe producción de radicales libres y prostaglandinas (Martínez-Canabal y Rivas 2005).

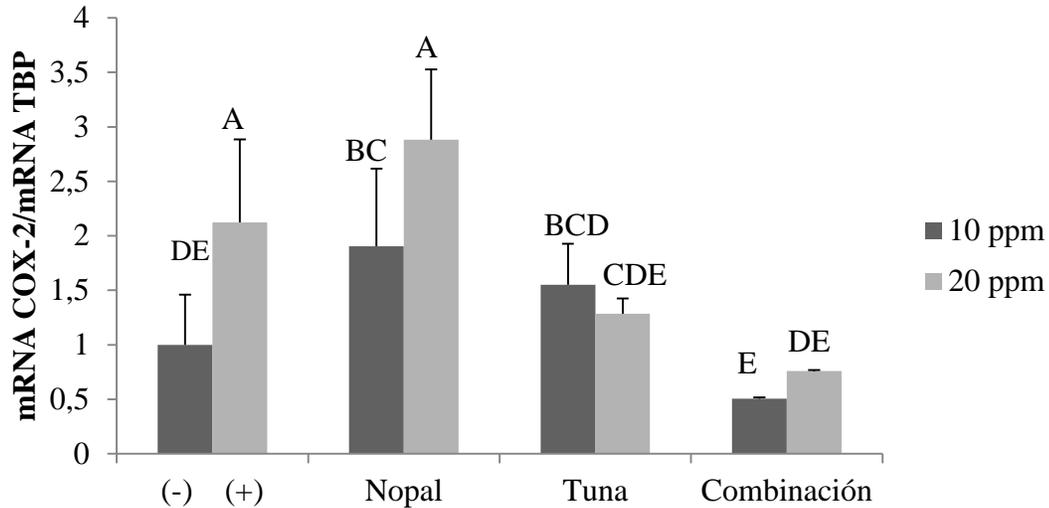


Figura 3. Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de COX-2.

^{A,B,C} Medias con diferente letra indica que hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

(-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas en ausencia de extractos.

(+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con LPS en ausencia de extractos.

Combinación: mezcla de los extractos en partes iguales.

Fue necesario resaltar que el extracto de tuna en concentraciones de 20 ppm redujo la expresión de NF- κ B y COX-2 en células HUVEC, resultando mejor que el extracto de nopal, debido a que el consumo de la fruta (tuna) mejora el estado de estrés oxidativo en las personas (Tesoriere *et al* 2004). Al combinar los extractos de tuna y nopal en 10 ppm la reducción en la expresión de los genes fue de 53.10% y 76.42% respectivamente. Esto pudo ser debido a que al combinar los componentes de cada uno de los extractos, presentan sinergia (Hai Liu 2004).

La enzima iNOS (Óxido nítrico sintetasa inducible) pertenece a la familia de las óxido nítrico sintetasas (NOSs). Produce óxido nítrico y está relacionada con mecanismos fisiológicos y patológicos del sistema inmune, nervioso y cardiovascular (Lowenstein y Padalko 2004).

Al evaluar el efecto de los extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos en la expresión de iNOS, se observó que el extracto de nopal en concentraciones de 20 ppm disminuyó la expresión del gen en un 46.47% en relación al control positivo. Esto puede ser debido a que el nopal presenta importantes compuestos fitoquímicos como polifenoles (Lee *et al.* 2003), los cuales son capaces de atacar los radicales libres producidos por lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Quideau *et al* 2010), entre los flavonoides más efectivos están quercetin, naringenin que actúan en la inhibición de la expresión de iNOS (Hämäläinen 2008). Mientras que al combinar los dos extractos se observó que el poder antiinflamatorio incrementó ya que la reducción de la expresión del gen fue de un 65.77% al compararlo con el control positivo (Figura 4). La inhibición de iNOS es beneficiosa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Aktan *et al.* 2003).

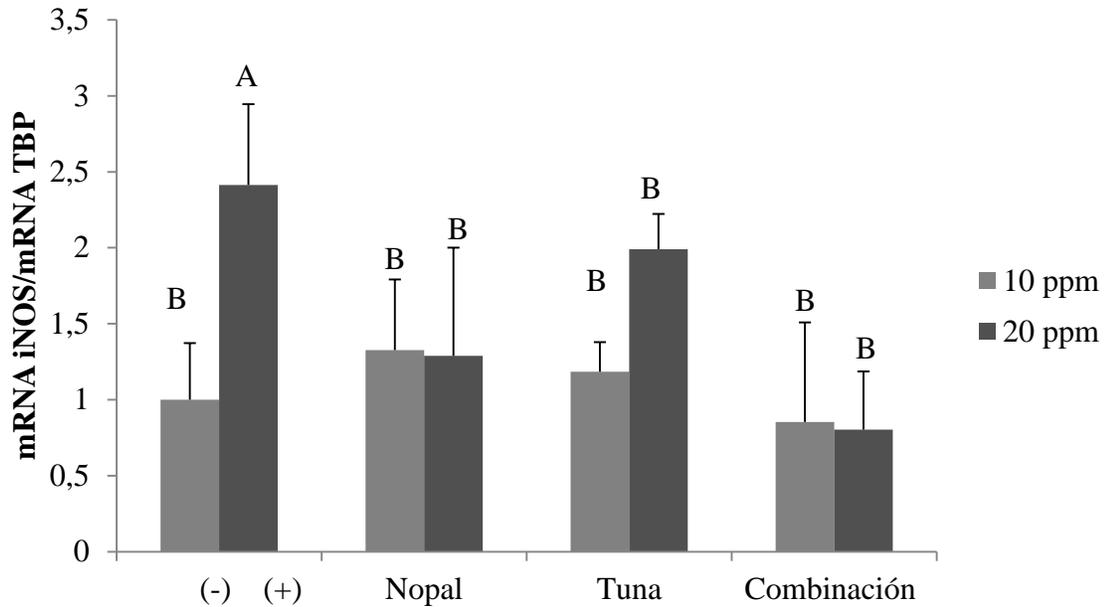


Figura 4. Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de iNOS.

^{A,B,C} Medias con diferente letra indica que hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

(-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas en ausencia de extractos.

(+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con LPS en ausencia de extractos.

Combinación: mezcla de los extractos en partes iguales.

La citoquina tumor necrosis factor alfa ($TNF-\alpha$) está relacionada con la inflamación y con procesos biológicos como proliferación celular, apoptosis (muerte celular), metabolismo de lípidos y coagulación (Vargas 2009). Al evaluar la expresión de $TNF-\alpha$ en células HUVEC tratadas con extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos; se observó que el extracto de nopal en 10 ppm redujo la expresión del gen un 43.33% al compararlo con el control positivo. Al momento de comparar el control positivo con la combinación de los extractos, especialmente en concentraciones de 20 ppm hubo una reducción de 47.22% (Figura 5).

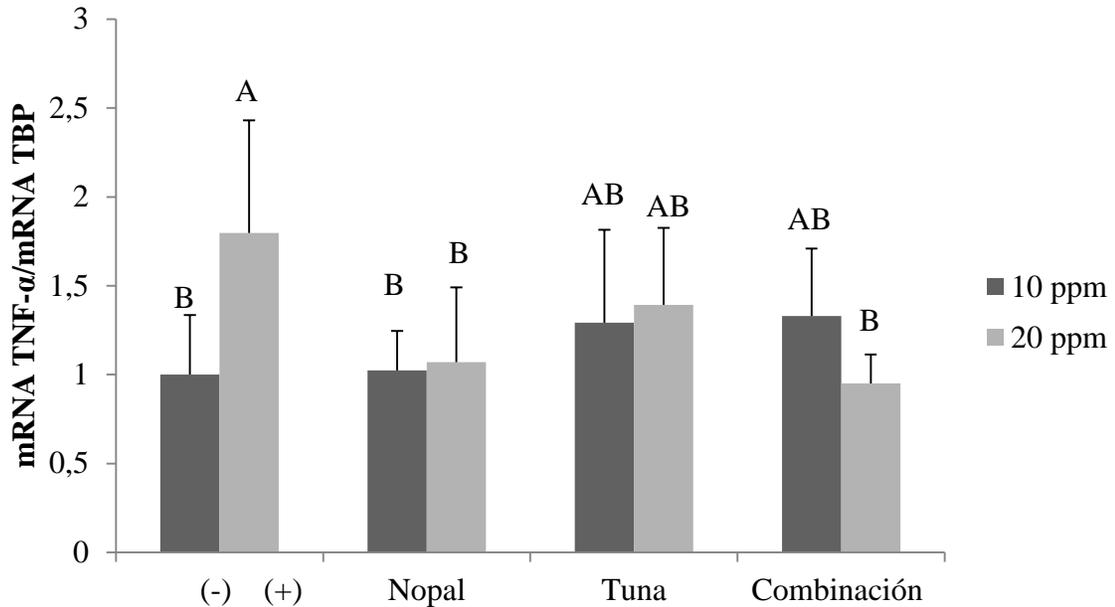


Figura 5. Efecto de los tratamientos en Células HUVEC en la expresión de TNF- α .
^{A,B,C} Medias con diferente letra indica que hay diferencias significativas ($P < 0.05$).

(-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas en ausencia de extractos.

(+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con LPS en ausencia de extractos.

Combinación: mezcla de los extractos en partes iguales.

En la expresión de iNOS y TNF- α el extracto de nopal resultó más efectivo en 10 ppm y 20 ppm respectivamente al compararlo con el control positivo. Al combinar los dos extractos en 20 ppm se observó una reducción de 47.22 y 66.80% respectivamente comparado con el control positivo, lo que coincide con estudios realizados donde afirman que algunos flavonoides tienen poder antiinflamatorio ya que actúan en la inhibición de iNOS (Hämäläinen 2008). Sin embargo la combinación no tuvo un fuerte efecto ya que se observó que los resultados fueron similares comparados con los extractos por separado.

En estudios realizados los extractos de *Opuntia* mostraron efectos analgésicos y antiinflamatorios (Park *et al.* 1998), también presentaron un poder protector de la mucosa gastrointestinal, incrementando el desarrollo de células secretoras de mucosa (Galati *et al.* 2001).

Expresión de proteínas inflamatorias. Mediante Western Blot, ésta técnica se basó en tres pasos: separación de proteínas por tamaño en un gel de electroforesis, transferencia de las proteínas del gel a una membrana y la detección de una proteína de acuerdo con los anticuerpos utilizados (Moore 2009).

El ensayo se llevó a cabo con anticuerpos para la identificación de las proteínas NF- κ B, iNOS, COX-2 y V-CAM, sin embargo los únicos resultados que se obtuvieron fueron los de NF- κ B, ya que factores como tiempo de almacenamiento de los anticuerpos pudieron influenciar en la efectividad de los mismos.

Para la identificación de proteínas se usó β -actin como control para demostrar que la cantidad de proteína que se cargó fue la misma en toda la banda. En los resultados obtenidos en la expresión de NF- κ B se observó que el nopal en concentraciones de 5 ppm disminuyó su expresión; ya que las líneas estuvieron menos marcadas en comparación al control positivo. Mientras que con el extracto de tuna trabajó mejor en concentraciones de 10 ppm en comparación con el control positivo. En la combinación de los dos extractos hubo mayor reducción de la expresión de NF- κ B en 5 y 10 ppm (Figura 6), ya que la combinación de fitoquímicos presentes en frutas y vegetales presentan una fuerte actividad antioxidante que está asociado con beneficios para la salud (Hai Liu 2004).

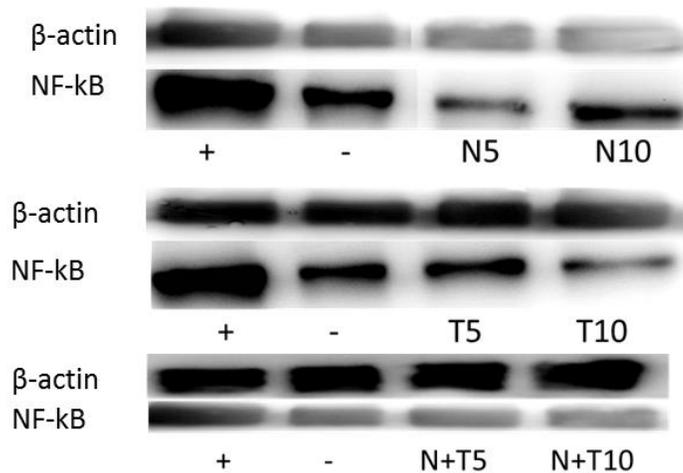


Figura 6. Análisis de Western Blotting. Expresión de la proteína inflamatoria NF- κ B con el uso de extractos de nopal, tuna y la combinación de los dos.

(-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas en ausencia de extractos.

(+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con LPS en ausencia de extractos.

N+T: mezcla de los extractos en partes iguales.

Capacidad antioxidante. ORAC mide la capacidad antioxidante que presenta algunas frutas y vegetales. Este método se basa en medir la fluorescencia que presenta la fluoresceína la cual es sometida a la acción de radicales libres. En esa parte entran los antioxidantes los cuales son los encargados de proteger la degradación de la fluoresceína. Los alimentos con alto índice ORAC pueden actuar eficazmente para disminuir el estrés oxidativo.

En este ensayo realizado se observó que con una probabilidad ($P < 0.036$) existieron diferencias significativas, ya que el nopal tuvo un valor ORAC cuatro veces más alto que la tuna, sus valores fueron $21.04 \mu\text{mol TE/g}$ de muestra y $4.83 \mu\text{mol TE/g}$ de muestra respectivamente, estos resultados son casi similares a los obtenidos por (Jiménez- Aguilar s.f.) en una de la variedades estudiadas $5.3 \mu\text{mol TE/g}$. Los datos indican que el nopal presentó más contenido de antioxidantes según el método evaluado, por lo que tiene mayor capacidad para proteger a las células de los radicales libres. El nopal tuvo mayor capacidad antioxidante que el kiwi y la espinaca al comparar sus valores ORAC de 12.10

μmol TE/g y 15.13 μmol TE/g respectivamente contra 21.04. Mientras que la tuna tuvo valores menores en comparación con la zanahoria 6.97 μmol TE/g (Cuadro 4, USDA 2007). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) recomienda una ingesta diaria de 3,000 – 5,000 unidades ORAC, lo que puede ayudar a combatir el ataque de radicales libres en el cuerpo.

Cuadro 4. Algunos alimentos (frutas y vegetales) con sus valores ORAC (USDA 2010)

| Fruta o vegetal | Capacidad Antioxidante μmol TE[‡]/g |
|------------------------|---|
| Arándanos | 90.90 |
| Mora Azul | 96.21 |
| Ciruelos | 61.00 |
| Kiwi | 12.10 |
| Espinaca | 15.13 |
| Zanahoria | 6.97 |

Fuente: Haytowitz y Bhagwat (2010).

[‡]Equivalentes de Trolox.

4. CONCLUSIONES

- No se encontró efectos positivos de los extractos y las concentraciones utilizadas en el crecimiento de células endoteliales HUVEC.
- El extracto de tuna en concentraciones de 20 ppm disminuyó la inflamación de las células HUVEC en la expresión de COX-2 y NF- κ B, mientras que el extracto de nopal en concentraciones de 10 ppm y 20 ppm disminuyeron la expresión de TNF- α e iNOS, respectivamente.
- La combinación de los extractos de nopal y tuna en 10 ppm disminuyó la expresión de COX-2, y su efecto fue mejor que el de los extractos por separado a la misma concentración (10 ppm).
- La expresión de la proteína inflamatoria NF- κ B disminuyó con la mayoría de los tratamientos evaluados pero fue más notorio con la combinación de los extractos de nopal y tuna en 5 y 10 ppm.
- El extracto de nopal presentó una capacidad antioxidante superior en relación a la tuna.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la expresión de proteínas de COX-2 en células HUVEC tratadas con nopal, tuna y la combinación de los dos extractos.
- Cuantificar el contenido de los ácidos principales presentes en los extractos de nopal y tuna, además cuantificar e identificar otros componentes como betacianinas, flavonoides y antioxidantes naturales presentes en los extractos de nopal y tuna, para identificar las propiedades de esos compuestos.
- Evaluar el efecto de los extractos de tuna y nopal en estudios *in vivo* con ratas.

6. LITERATURA CITADA

Aktan, F., S. Hennes, B.D. Roufogalis, y A.J. Ammit. 2003. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF- κ B-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 8 (4): 235-242.

Brahmi, D., Ch. Bouaziz, Y. Ayed, H. Ben Mansour, L. Zourgui y H. Bacha. 2011. Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutrition and Metabolism* 8: 73.

Csiszar A, K. Smith, N. Labinsky, Z. Orosz, A. Rivera y Z. Ungvari. 2006. Resveratrol attenuates TNF- α induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology* 291: 1694-1699.

Dąbek, J., A. Kułach y Z. Gąsior. 2010. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B): a new potential therapeutic target in atherosclerosis? *Pharmacological reports* 62: 778-783.

Díaz Prado, S., A. Gallegos Guadalupe, J.L. López Cedrún, J. Ferreas Granada y L. Antón Aparicio. 2009. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en lesiones epiteliales orales premalignas. *Revista Española de cirugía oral y maxilofacial* 31 (3): 170-181.

FBMC (Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular). 2010. Purificación de ARN IG 2010. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Fraga, C.G., M. Galleano, S.V. Verstraeten y P.I. Oteiza. 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* 31: 435-445.

Galati E.M., S. Pergolozzi, N. Miceli, M.T. Monforte y M.M. Tripodo. 2001. Study on the increment of production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia ficus indica* (L) Mill. cladodes. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 229-233

Garrido Gutiérrez, M.I., R. Ramos Payán, E. Reyes Maldonado y I.C.E. Estrada García. s.f. Aislamiento de ARN de alta calidad a partir de células en cultivo en suspensión de café (*Coffea arabica* L.).

Gentile, C., L. Tesoriere, M. Allegra, M.A. Livrea y P. D'Alessio. 2004. Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression. *Annals New York Academy of Sciences* 1028: 481-486.

Ginestra, G., M.L. Parker, R.N. Bennett, J. Robertson, G. Mandalari, A. Narbad, R.B. Lo Curto, G. Besignano, C. B. Faulds y K.W. Waldron. 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10323-10330.

Gossiau, A., Sh. Li, Ch.T Ho, K. Yu Chen y N.E. Rawson. 2011. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activities. *Molecular Nutrition and Food Research* 55(1): 74-82.

Guevara Arauza, J.C., J. Órnelas Paz, S. Rosales Mendoza, R.E. Soria Guerra, L.M. Paz Maldonado y D. Pimentel González. 2011. Biofunctional activity of tortillas and bars enhanced with nopal. Preliminary assessment of functional effect after intake on the oxidative status in healthy volunteers. *Chemistry Central Journal* 5:10.

Guevara Figueroa, T., H. Jiménez Islas, M.L. Reyes Escogido, A.G. Mortensen, B.B. Laursen, L.W. Lin, A. De León Rodríguez, I.S. Fomsgaard y A.P. Barba de la Rosa. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.) *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 525-532.

Hai Lui, R. 2004. Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134: 3479S- 3485S.

Hamdi, M. 2006. Nutritional and Medicinal Uses of Prickly Pear Cladodes and Fruits: Processing Technology Experiences and Constraints. *In: Y.H. Hui. (ed) Handbook of Fruits and Fruit Processing. Blackwell Publishing. p. 651-664.*

Haytowitz, D.B. y S. Bhagwat. 2010. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service.

Howlett J, C. Shortt. 2004. PASCLAIM. Report of the second plenary meeting: review of a winner set of interim criteria for the scientific substantiation of health claims. *European Journal of Nutrition* 43(2): 174-183.

ILSI Europe (International Life Sciences Institute). 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: consensus Document. *British Journal of Nutrition* 81 (1): S1-S27.

Jiménez-Aguilar, D.M., C. Hernández-Brenes, J.A. Gutierrez-Urbe y J. Welti-Chanes. s.f. Phenolics, Betalains, Ascorbic Acid, and Antioxidant Activity of *Opuntia ficus-indica*. *Tecnológico de Monterrey.*

Kaplan M, E.A Mutlu, M. Benson, J.Z Fields, A Banan, A. Keshavarzian. 2007. Use of herbal preparations in the treatments of antioxidant- mediated inflammatory disorders. *Complementary Therapies in Medicine* 15 (3): 207-216.

López Alonso, R., C. Ramírez de Lara, L. Rivero, A.E. Ruiz, C.T. Torres Zapata y R. Vicente Ullán. 2011. Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico-enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha. *Ciencias Agronómicas* 19: 021-025.

López Parra, M. 2001. Efectos renales de los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 COX-2 en la cirrosis. Estudios *in vivo* en ratas inducidas a cirrosis y estudios *in vitro* en células mesangiales. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. España.

Lowenstein, C.J. y E. Padalko. 2004. iNOS at a glance. *Journal of Cell Science* 117: 2865-2867.

Magloire Feugang, J., P. Konarski, D. Zou, F.C. Stintzing y C. Zou. 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* 11: 2574- 2589.

Martínez-Canabal, A y S. Rivas-Arancibia. 2005. Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM. México* 48 (5): 210-216.

Medina Torres, L., E.J. Vernon Carter, J.A. Gallegos Infante, N.E. Rocha Guzman, E.E. Herrera Valencia, F. Calderas, R. Jiménez Alvarado. 2011. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food Agriculture* 91(6): 1001-1005.

Moore, C. 2009. Introduction to Western Blotting. MorphoSys UK Ltd. Oxford, Reino Unido.

Ndhala R, A. Kasiyamhuru, C. Mupure, K. Chitindingu, M.A. Benhura y M. Muchuweti. 2007. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*. *Food Chemistry* 103: 2–87.

Nunes, S.A. 2011. Modulation of inflammatory mediators by *Opuntia ficus-indica* and *Prunus avium* bioproducts using an *in vitro* cell-based model of intestinal inflammation. Tesis de Master en Biotecnología. Facultad de Ciencias y Tecnología Universidad Nueva de Lisboa. 99 p.

Ortiz-Escobar, T.B., M. Valverde González y O. Paredes López. 2010. Determination of the Folate Content in Cladodes of Nopal (*Opuntia ficus indica*) by Microbiological Assay Utilizing *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 6472-6475.

Paredes, O., M.L. Cervantes, M. Vigna y T. Hernández. 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life— A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 299-308.

Park, E.H., J.H. Kahng y E.A. Paek. 1998. Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Archives of Pharmaceutical Research* 21: 30–34.

Quideau S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus y L. Pouységu. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Ed.* 50(3): 586-621.

Reddy, M.K., R.L. Alexander-Lindo y M.G. Nair. 2005. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 9268-9273.

Rentaría Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *In: L. Eguiarte, V. Souza y Z. Aguirre (ed.). Ecología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México.* p. 541-566.

Roman-Blas, J.A. y S.M. Jiménez. 2006. Review: NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 839-848.

Sloan, A. E. 2000. The top ten functional food trends. *Food Technology* 54: 33-62.

Stintzing, F.G. y R. Carle. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology and uses. *Molecular Nutrition and Food Research* 49: 175-194.

Sumaya-Martinez, M.T., S. Cruz Jaime, E. Madrigal Santillán, J. García Paredes, R. Cariño Cortés, N. Cruz Cansino, C. Valadez Vega, L. Martínez Cardenas y E. Alanís García. 2011. Betalain, Acid Ascorbic, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Purple, Red, Yellow and White Cactus Pear. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 6452-6468.

Tesoriere, L., D. Butera, A.M. Pintaudi, M. Allegra y M.A. Livrea. 2004. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 391–395.

Vargas S., M. A. 2009. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con infliximab (un agente anti TNF- α). *Revista médica de Costa Rica y Centro América* 67 (590): 345-351.

Yahia, E. 2012. Prickly Pear Fruit and Cladodes. *In: Rees, D., G. Farrell y J. Orchard. (ed.). Crop Post-harvest: Science and Technology. Blackwell Publishing.* p. 264-285.

7. ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas.

BSA: Albúmina de Suero bovino.

cADN: ADN complementario.

COX-2: Ciclooxigenasa.

ECM: Medio para células endoteliales.

FBS: Suero Fetal Bovino.

HPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de masas.

HUVEC: Células Endoteliales de la Vena del Condón Umbilical

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible.

LPS: Lipopolisacárido.

mARN: Ácido Ribonucleico mensajero.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

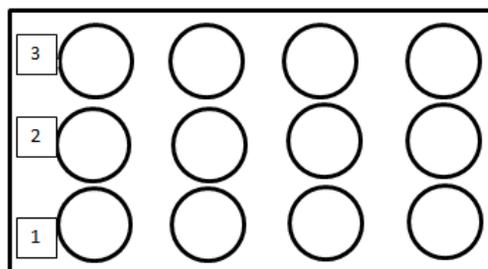
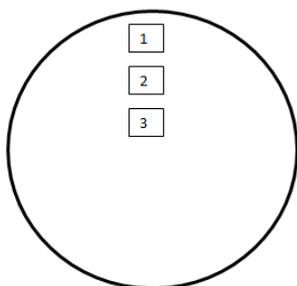
TBP: proteína de Unión TATA

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

β - actin: Beta actina.

Anexo 2. Etiquetado de los platos utilizados en los ensayos realizados.

1. Línea celular con el número de pasaje. 2. Fecha y 3. Iniciales del que realiza el ensayo.



Anexo 3. Ejemplo de cálculos para los tres ensayos realizados.

Conteo celular

1. 928
2. 919

$$928 + 919 = 1847/2 = 923.5$$

$$\frac{923.5 \times 402}{1000} = 371.25$$

$$100,000/371.25 = 269.36 \mu\text{L}$$

Células: $269.36 \times 26 = 7003.36 = 7 \text{ mL}$ (**suspensión celular**)

Total: $1000 \times 26 = 26000 = \underline{26 \text{ mL}}$
19 mL (**medio**)

402= Factor de dilución.

Anexo 4. Cálculo de la dilución de los extractos.

Concentración de los extractos de nopal y tuna 3,000 ppm.

$$2.5 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 2.5 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 1.42 \text{ mL de extracto. Medio} = 1.7 \text{ mL.}$$

$$5 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 5 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 2.83 \text{ mL de extracto. Medio} = 1.7 \text{ mL.}$$

$$10 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 10 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 5.6 \text{ mL de extracto. Medio} = 1.7 \text{ mL.}$$

$$20 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 20 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 11.3 \text{ mL de extracto. Medio} = 1.7 \text{ mL.}$$

Anexo 5. Cálculo para inducción de inflamación (LPS + extracto + medio)

LPS (1 ng) 1 μL de LPS por 2 ml de medio

17 μL de LPS en 8.5 mL de medio.

$$10 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 10 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 5.6 \text{ mL de extracto. Medio + LPS} = 1.7 \text{ mL.}$$

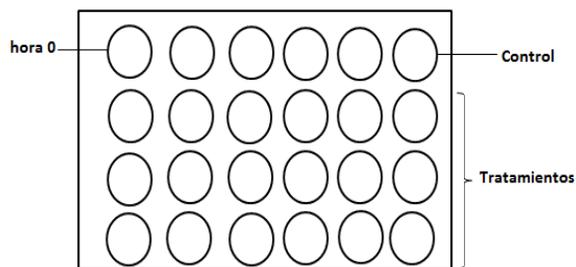
$$20 \text{ ppm} = 3,000 \text{ ppm} \times X = 20 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 11.3 \text{ mL de extracto. Medio + LPS} = 1.7 \text{ mL}$$

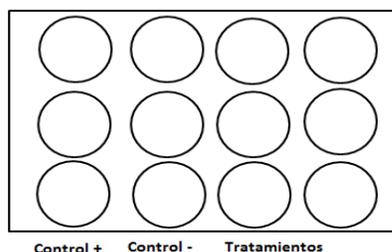
Control - = 1,7 me medio para células HUVEC.

Control + = 1,7 medio + LPS

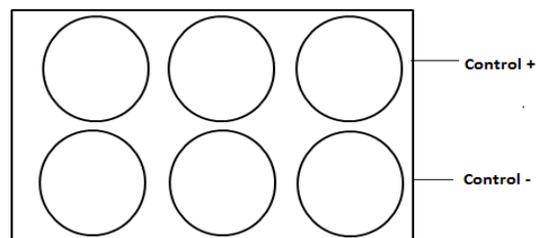
Anexo 6. Ejemplos de ensayos realizados.
Proliferación celular.



Extracción de ARN



Extracción de proteínas.



Anexo 7. Mezcla maestra I y II para cADN.

| Solución | 1 muestra | 20 muestras |
|---------------------|-------------|-------------|
| Mezcla I | | |
| 50 μ M oligo dT | 1 μ L | 20 μ L |
| dNTP | 1 μ L | 20 μ L |
| Mezcla II | | |
| RT buffer | 2 μ L | 40 μ L |
| MgCL ₂ | 2 μ L | 40 μ L |
| DTT | 2 μ L | 40 μ L |
| Rnase out | 1 μ L | 20 μ L |
| Super script IV | 0.8 μ L | 16 μ L |

Anexo 8. Composición de los primers o cebadores utilizados en el ensayo de PCR.

10 μ L Forward
10 μ L Reverse
180 μ L de agua

Anexo 9. Mezcla realizada para PCR.

| Solución | 1 muestra | 20 muestras |
|------------------|------------------|--------------------|
| SYBR Green | 10 µL | 200 µL |
| Primer o cebador | 0.8 µL | 16 µL |
| Agua | 5.2 µL | 108 µL |

Anexo 10. Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados.

| Fuente de variación | Valor F | Pr>F¹ |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|
| Proliferación celular | | |
| Bloque | 148. | <.0001 |
| Parte de la planta | 1.44 | 0.244 |
| Concentraciones | 0.55 | 0.580 |
| Parte planta x concentraciones | 0.30 | 0.876 |
| Extracción de ARN | | |
| Bloque | 42.84 | <.0001 |
| Parte de la planta | 3.12 | 0.032 |
| Concentraciones | 0.00 | 0.969 |
| Parte planta x concentraciones | 0.84 | 0.438 |
| Proteína inflamatorias | | |
| Bloque | 11.30 | 0.0027 |
| Parte de la planta | 2.23 | 0.112 |
| Concentraciones | 5.17 | 0.033 |
| Parte planta x concentraciones | 2.79 | 0.082 |
| ORAC | | |
| Capacidad Antioxidante | 2.06 | 0.036 |

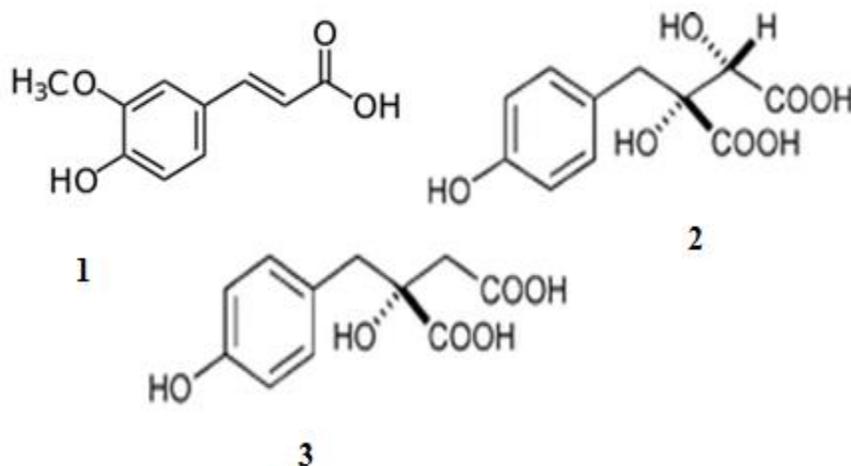
¹ PR<F= valores menores a 0.05 tienen interacción entre tratamientos

Anexo 11. Determinación de compuestos fenólicos por cromatografía y espectrometría (HPLC-MS).

La cromatografía líquida es una técnica muy usada en biología molecular para la identificación de compuestos los cuales son usados en la elaboración de medicinas.

En la determinación de compuestos por medio de HPLC-MS se identificaron compuestos como el ácido ferúlico que es un antioxidante de origen vegetal, neutraliza los radicales libres responsables de la oxidación de membranas celulares (López Alonso *et al* 2011). Según Ndhala *et al* 2007 se encontró ácido ferúlico como uno de los antioxidantes dominantes en *O. Megacantha* (L.) Mill.

Los extractos de nopal y tuna fueron analizados por HPLC-MS para identificar algunos compuestos existentes. Se encontró ácido piscídico, según estudios realizados por Ginestra *et al* (2009) y Stintzing y Carle (2005) al analizar extractos de *O. ficus indica* encontraron que el ácido piscídico fue uno de los mayores compuestos encontrados y en pequeñas cantidades el ácido eucómico.



Estructura química del (1) Ácido Ferúlico, (2) Ácido Piscídico y (3) Ácido Eucómico