



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

**“Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica*
(Cactaceae) sobre la glucemia y los lípidos de ratas diabéticas”**

Valeria Gili

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período correspondido entre el 26 de septiembre de 2006 y el 28 de septiembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Telma S. Alonso, Profesora Adjunta de la UNS e Investigadora Independiente del CONICET y de la Dra. Sara S. Sánchez, Profesora Titular de la UNT e Investigadora Principal del CONICET.

Firma del Alumno



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el / / ,
mereciendo la calificación de (.....)

A mi hijo Santino...

porque cada día me das luz, fuerza, color y forma

A mis padres Graciela y Néstor...

por el amor que se expresa en un incondicional sostén

A Telma...

por el constante acompañamiento

La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable.

Leonardo da Vinci (1452-1519)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur por la formación pública de grado y de postgrado, al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) por el lugar de trabajo y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las Becas de Postgrado tipo I y Tipo II que hicieron posible la concreción de este estudio.

Expreso mi especial agradecimiento a la Directora de esta Tesis, Dra. Telma Alonso, por su tenacidad en el acompañamiento, por respetar mis tiempos y saber esperarme en mi proceso de construcción de la Tesis que es también un proceso de construcción personal. Por confiar en mí. Por instruirme en lo científico y apoyarme y escucharme también en lo humano. Por su fidelidad y compromiso con este trabajo. Por mostrarme que se puede alzar la voz y defender las convicciones sin que se contradigan la palabra y la acción. Por ser genuina y dejarse conocer. Por tantos años compartidos que confluyeron en un vínculo de afecto y respeto. Por ser cariñosa con mi hijo. Por los mimos del Momo. Por sus divertidas anécdotas. Por estar presente en cada renglón de este manuscrito.

Agradezco también a la Co-Directora Dra. Sara Sánchez, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio e instruirme científicamente. Por sus aportes en la realización del manuscrito.

A mi compañera de laboratorio y amiga Jorgelina Buschiazzi, por haber descubierto juntas el maravilloso mundo de las *Opuntia*, por sus valiosos

consejos tanto profesionales como personales y sobre todo por su solidez, sinceridad y transparencia, cualidades que no se encuentran fácilmente. Gracias Jor por tantos lindos momentos compartidos.

Al Dr. Carlos Villamil, por su amabilidad para ayudarme a elegir la población de *Opuntia* y por sus valiosos aportes en el campo de la botánica.

Al Dr. Horacio Maturi, por su importante colaboración en la interpretación de los estudios histopatológicos.

A los Dres. Susana Genta, Alejandra Minnetti, Cristina Bras y Ariel Gandini, por compartir su experiencia y conocimientos desinteresadamente, en particular a Ariel por su generosa ayuda.

A los alumnos que colaboraron en los estudios de toxicidad y permitieron que puedan realizarse de modo prolijo y efectivo.

A Idi Bonini, por la sensación de hogar en el trabajo, porque siempre su presencia fue acogedora, por sus consejos que podrían ser los de una tía.

A todos los integrantes del INIBIBB, en especial a Viviana Soler, por lo compartido y por la corrección del resumen en inglés. A Ramón Quilodrán, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por su generosidad y amabilidad. A Susana Gonzalez, por las jornadas laborales en el Bioterio. A Guada Rodríguez-Diez por su cariño, sinceridad, ayuda desinteresada y estímulo constante para que pueda concretar esta etapa y disfrutar de la siguiente. A Horacio De Genaro y a Gaspar Fernández Nievas... por el hermoso recuerdo de su presencia...

A mis compañeros de docencia y a las chicas del laboratorio de Química Biológica de Palihue, por la palabra de aliento y el positivismo.

A Graciela Gigliotti, por tomarme de la mano y caminar juntas a la par.

A Nati Cozzani, amiga, comadre y colega, por nuestra profunda sintonía, por el amor de familia, por el estímulo y apoyo incondicional. Por ser, junto con Martín y Luana, simples, naturales y alegres.

A mis amigas y amigos, mi gran familia, por recordarme que puedo lograrlo, por el apoyo y la compañía, por alegrarse con mi alegría, por llenar mi vida de gratos momentos. A todas aquellas personas que tuvieron deseos de bien para conmigo y mi tarea.

A mis padres Graciela y Néstor, por el amor inmensurable que comprendí enteramente con la llegada de mi hijo. Por la certeza de su presencia. Por el incondicional sostén. Por darme un remanso cuando las aguas se vuelven turbulentas. Porque, junto a mis hermanos, moldearon el primer trozo de arcilla de la persona que soy ahora. A mis hermanos Natalia y Paulo, por su apoyo y genuino deseo de felicidad. A mis sobrinas Amelia Margarita y Libertad Alelí por su amor y pureza, porque junto con Santino hacen que mi alma florezca y pueda retornar a su niñez.

A mi hijo Santino, sin el cual nada hubiese transcurrido de este modo. Por ser el artesano de mi vida. Porque cada día me da fuerza, color y forma. Porque su existencia me ilumina y da sentido a mi vida.

Doy gracias a la vida que me ha dado tanto... Doy gracias a Dios...

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
Plantas del género <i>Opuntia</i>	9
Descripción botánica	10
Hábitat	13
Agro-tecnología del cultivo	13
Composición fitoquímica	16
Usos etnobotánicos	20
Diabetes	21
Metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos	25
Sistemas experimentales en diabetes	33
Impacto de la diabetes	37
Plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes	38
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Material vegetal	44
2. Administración de la planta	46
3. Animales de experimentación	47

4. Diseño experimental	48
4.1. Ensayos de toxicidad	48
4.1.1. Toxicidad aguda	49
4.1.2. Toxicidad sub-aguda	50
4.2. Ensayos en ratas con hiperglucemia transitoria	51
4.3. Ensayos en ratas diabéticas	52
4.3.1. Inducción de la diabetes experimental	52
4.3.2. Tratamiento de los animales diabéticos con las distintas harinas de la planta	53
5. Obtención de sangre y orina y medición de parámetros hematológicos y de bioquímica clínica	55
6. Estudios histopatológicos	57
7. Determinación de la actividad de enzimas del metabolismo lipídico	58
7.1. Obtención de fracciones subcelulares de hígado de rata	58
7.2. Actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa	58
7.3. Actividad de la enzima ácido graso sintasa	59
8. Cuantificación de las proteínas	60
9. Análisis lipídico	61
9.1. Extracción de los lípidos	61
9.2. Aislamiento cromatográfico de los lípidos	62
9.3. Metanólisis de los lípidos	63
9.4. Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por	

cromatografía en fase gaseosa	64
9.5. Determinación de colesterol total	65
9.6. Determinación de fósforo fosfolipídico	66
10. Análisis estadístico	67
RESULTADOS	69
CAPÍTULO I - EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE <i>Opuntia megapotamica</i>	70
I.1. Estudio de la toxicidad aguda	71
I.2. Estudio de la toxicidad sub-aguda	85
CAPÍTULO II - ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE <i>Opuntia megapotamica</i> EN RATAS CON HIPERGLUCEMIA TRANSITORIA Y EN RATAS DIABÉTICAS	113
II. 1. Contenido y composición de los lípidos de las harinas de cladodios y de semillas de <i>Opuntia megapotamica</i>	114
II.2. Efectos de <i>Opuntia megapotamica</i> sobre la glucemia de ratas normales con hiperglucemia transitoria	119
II.3. Efectos de la administración oral de <i>Opuntia megapotamica</i> en ratas diabéticas	122
II. 3. 1. Efectos sobre la condición general y parámetros hematológicos	122
II. 3. 2. Efectos sobre la glucosa e insulina plasmáticas y sobre la histología del páncreas	124
II. 3. 3. Efectos sobre los lípidos y las lipoproteínas plasmáticos.....	128
II. 3. 4. Efectos sobre la actividad de las enzimas hepáticas 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y ácido graso	

sintasa	131
II. 3. 5. Efectos sobre parámetros de la función del hígado y sobre la histología y el contenido y la composición lipídica del órgano	133
II. 3. 6. Efectos sobre parámetros de la función del riñón y sobre la histología y el contenido y la composición lipídica del órgano.....	145
DISCUSIÓN	159
CONCLUSIONES	200
BIBLIOGRAFÍA	205

ABREVIATURAS

ACP	Proteínas transportadoras de acilos
AGL	Ácidos grasos libres
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPK	Proteína quinasa activada por 5' adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de la Varianza
apoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferasa
Ccr	Aclaramiento de creatinina
CHOD	Colesterol oxidasa
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
C:M	Cloroformo - Metanol
CT	Colesterol total
DAG	Diacilglicéridos
DMS	Diferencia Mínima Significativa
DTT	Ditiotreitol
FAS	Ácido graso sintasa
FID	Federación Internacional de Diabetes
GGT	Gamma-glutamil transpeptidasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL-c	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA reductasa	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-c	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa

LSH	Lipasa sensible a hormona
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
PC	Peso corporal
PL	Fosfolípidos
POD	Peroxidasa
POTG	Pruebas orales de tolerancia a la glucosa
PS	Peso seco
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
QM	Quilomicrones
SD	Desvío estándar
SFA	Ácidos grasos saturados
SREBP	Proteína de unión al elemento regulador de esteroles
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicéridos
TLC	Cromatografía en capa fina
UI	Índice de insaturación
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
16:0	Ácido palmítico
16:1	Ácido palmitoleico
18:0	Ácido esteárico
18:1	Ácido oleico
18:2	Ácido linoleico
18:3n3	Ácido linolénico
20:4n6	Ácido araquidónico
21:0	Ácido eneicosanoico

RESUMEN

Una de las patologías con mayor impacto en la sociedad mundial es la diabetes que está asociada a complicaciones a largo plazo que causan elevada morbi-mortalidad y su origen multifactorial incluye la desregulación del metabolismo de carbohidratos y de lípidos.

Se ha demostrado que numerosas hierbas y suplementos dietarios de origen vegetal poseen propiedades hipoglucemiantes e hipolipemiantes y mejoran el estado general del paciente diabético. Las plantas del género *Opuntia*, principalmente *Opuntia ficus-indica*, han sido y siguen siendo las más utilizadas, en particular en México. Con respecto a la especie nativa *Opuntia megapotamica*, hasta el presente no se ha evaluado su toxicidad ni se han llevado a cabo estudios que analicen sus potenciales propiedades medicinales.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue evaluar la toxicidad y los efectos de las harinas de cladodios, de pulpa de frutos y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia y los lípidos de ratas normales y diabéticas a través de la realización de estudios *in vivo* en los cuales se administró, por vía oral, diferentes dosis de las harinas de la planta. Además, se analizó el contenido y la composición de los lípidos de las harinas de cladodios y de semillas.

De los ensayos de toxicidad aguda y sub-aguda se determinó que la harina de pulpa no posee efectos tóxicos mientras que las harinas de cladodios

y de semillas generan algunas alteraciones histológicas en el hígado y en el riñón que no se traducen en modificaciones en los parámetros bioquímicos ni en cambios en el comportamiento y en el estado general de los animales.

La caracterización lipídica de las harinas de cladodios y de semillas, realizada por primera vez en esta especie de *Opuntia*, indica que la primera por su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados podría tener un potencial valor nutracéutico.

Con respecto a los efectos sobre la glucemia, se estableció que las tres harinas tienen una marcada acción anti-hiperglucemiante en ratas normales con hiperglucemia transitoria mientras que el suministro de las harinas de cladodios y de semillas, durante 30 días, no modifica la glucemia basal en ratas diabéticas. Sin embargo, en estas últimas se observó un leve aumento en los niveles plasmáticos de insulina que podría indicar un incipiente efecto benéfico de la planta sobre el páncreas.

En cuanto a los lípidos, se registró un importante efecto hipolipemiante a nivel plasmático, hepático y renal. Solo la harina de cladodios modifica la actividad de las enzimas hepáticas HMG-CoA reductasa y ácido graso sintasa, claves en la biosíntesis de colesterol y de ácidos grasos, respectivamente.

La administración de las harinas de cladodios y de semillas produce marcados efectos positivos sobre el funcionamiento del hígado y una leve tendencia al mejoramiento de la función renal.

En conjunto, los resultados obtenidos de estos estudios pre-clínicos aportan una información original y muy útil que puede servir como base para futuros estudios clínicos que permitan sustentar el empleo de *Opuntia megapotamica* como recurso terapéutico.

ABSTRACT

Diabetes, one of the pathologies with greatest impact on society worldwide, is associated with long-term complications ending in high morbidity and mortality. Its multifactorial origin includes carbohydrate and lipid metabolism deregulation.

It has been demonstrated that several herbs and dietary vegetal supplements which have hypoglycemic and hypolipidemic properties improve the general conditions of diabetic patients. Plants from *Opuntia* genus, mainly *Opuntia ficus-indica*, have been and still are the most used, specially in México. As to the native species *Opuntia megapotamica*, no studies have been conducted to date to evaluate its toxicity and its potential medicinal properties.

The general objective of this Thesis work was to evaluate *Opuntia megapotamica* toxicity and the effects that cladode, fruit pulp and seed flours exert on glycemia and lipids in normal and diabetic rats. To this end, *in vivo* studies were carried out in which different doses of cladodes, fruits pulp and seeds were orally administered. The content and composition of lipids from cladode and seed flours were also analyzed.

Results from the analyses focused on acute and sub-acute toxicity reveal that whereas fruit pulp flour has no toxic effects, flours from cladodes and seeds produce some histological alterations in liver and kidney which have no correlations with changes in biochemical parameters or in the behavior and general condition of the animals studied.

The lipid characterization of cladode and seed flours, carried out for the first time in this *Opuntia* species, suggests that because of the high polyunsaturated fatty acid content cladode flour could have a potential nutraceutical value.

As to *Opuntia megapotamica* glycemic effects, it was determined that whereas its three flour types have an important anti-hyperglycemic action in normal rats with transient hyperglycemia, cladode and seed flours administration, during 30 days, does not modify basal glycemia in diabetic rats. In the latter, a slight increase in insulin plasmatic levels was registered and it could indicate an incipient plant beneficial effect on the pancreas.

Very important hypolipemiant effects in plasma, liver and kidney lipids were also determined. Only cladode flour was observed to modify the activity of the hepatic enzymes HMG-CoA reductase and fatty acid synthase, both of which have key roles in cholesterol and fatty acid synthesis, respectively.

The administration of cladode and seed flours produces not only significant positive effects on liver functioning but also a slight tendency to improve renal function.

Taken together, the results collected from these pre-clinical studies provide original and useful data that can serve as basis for future clinical research that will enable sustain the use of *Opuntia megapotamica* as a therapeutic tool.

INTRODUCCIÓN



Plantas del género *Opuntia*

Las *Opuntia* (*Opuntia* s.s. Mill) son cactus nativos del continente americano y constituyen el género más numeroso de la subfamilia Opuntioideae, familia Cactaceae, que está representado por alrededor de 190 especies (Anderson, 2001).

De todas las especies conocidas, las más empleadas por el hombre son: *Opuntia ficus-indica* (la más cultivada y estudiada), *O. streptacantha*, *O. megacantha*, *O. dillenii*, *O. rastera*, *O. amyclaea*, *O. xocconostle*, *O. engelmannii*, *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha*, *O. robusta*, *O. chavena*, *O. phaecantha* y *O. cochenillifera*. Con respecto a la especie autóctona *Opuntia megapotamica*, hasta el momento no se registran datos sobre su utilización.

La taxonomía de las *Opuntia* es sumamente compleja debido, entre otras razones, a su gran variabilidad genética, a que los fenotipos cambian según las condiciones ambientales y a que el sistema de reproducción vegetativo enmascara las verdaderas afinidades sistemáticas. Así, se realizaron varios estudios con el fin de dilucidar las relaciones de parentesco dentro de la subfamilia Opuntioideae (Labra y col., 2003) y en el caso de *Opuntia megapotamica* se demostró un cierto grado de variabilidad genética entre poblaciones geográficamente distantes unas de otras (Galvez y col., 2009).

Los nombres populares de la planta varían según los países: en la lengua náhuatl es *nochtli*, en México la llaman nopal, en Argentina y Chile tuna y en Brasil *palma forrageira*. En España se la denomina chumbera y al fruto higo

chumbo, en Italia se la conoce como *fico d'India*, en Francia *figue de Barbarie*, en Estados Unidos y en Sudáfrica *prickly pear*, en Israel *sabras* (espinosa por fuera pero dulce por dentro), en Eritrea y en Etiopía *beles* y en India *nagphani*, *anda torra* o *chapathi balli* (Sáenz, 2006).

La tuna constituye uno de los símbolos nacionales de México y aparece en el escudo del país sosteniendo al águila real que se posa sobre ella mientras sujeta a una serpiente.



Descripción botánica

Numerosos autores han descrito este extenso género desde el punto de vista botánico (Bravo-Hollis, 1978; Pimienta-Barrios, 1990; Sudzuki y col., 1993; Barbera y col., 1999; Nobel y Bobich, 2002; Sáenz, 2006). Abarca especies de diferentes tamaños que van desde pequeñas plantas de no más de 5 cm de altura hasta especies arbustivas o arbóreas que pueden llegar a medir 5 m. Son plantas muy rústicas, adaptadas anatómica y morfológicamente a condiciones de fuerte estrés hídrico. Realizan un tipo particular de fotosíntesis que corresponde al metabolismo ácido de las crasuláceas y abren sus estomas solo durante la noche evitando así la pérdida de agua por transpiración (Nobel, 1994; Nobel e Israel, 1994; Nobel, 1995).

El **sistema radicular** es superficial, extenso y ramificado (Nobel, 1998; Snyman, 2004) y puede variar con los distintos tipos de suelos (Snyman, 2005;

Snyman, 2006). Las raíces soportan los períodos prolongados de sequías absorbiendo rápidamente agua a través de las raicillas que se desarrollan inmediatamente luego de las lluvias y que desaparecen cuando el suelo se seca.

Los **tallos** son suculentos y se articulan en segmentos conocidos botánicamente como cladodios y vulgarmente como pencas. Los **cladodios** son planos, ovales y con apariencia de hojas carnosas. Reemplazan a las hojas en su función fotosintética y tienen capacidad para acumular grandes cantidades de agua. Poseen un parénquima medular blanco que contiene mucílagos responsables de la retención del agua y un parénquima cortical fotosintéticamente activo que está cubierto por espinas y pelos multicelulares o tricomas ubicados en las aréolas. Estas aréolas son estructuras características de la familia Cactaceae y, debido a su actividad meristemática, constituyen el lugar de origen de los nuevos cladodios, flores y raíces aéreas (Sudzuki y col., 1993; Anderson, 2001). Es frecuente que en la literatura, a los segmentos de tallos aplanados se los denomine erróneamente "hojas de cactus". Los términos correctos son: "tallos", "cladodios", "artejos", "pencas", "almohadillas", "parte vegetativa", "filoclados" o "nopalitos".

Las **espinas** son hojas modificadas que generalmente representan el 8,4 % del peso total del cladodio y cuyas funciones incluyen la protección mecánica de los herbívoros, el sombreado de los tallos, la reducción de la pérdida de agua y la condensación del rocío (Anderson, 2001). Además poseen **gloquidios**, espinas cortas, curvas y deciduas (Pritchard y Hall, 1976).

Generalmente, las plantas presentan una floración anual y las **flores** son sésiles, hermafroditas, solitarias, de color blanco, amarillo, rojo, naranja o púrpura.

Los **frutos** son falsas bayas carnosas de forma ovoide y con distintas dimensiones y coloraciones según la especie (Chessa y Nieddu, 1997; Ochoa, 2003). Son agradables y dulces y la epidermis es similar a la del cladodio, con aréolas y abundantes gloquidios y espinas.

Desde el punto de vista de la biología reproductiva, el género *Opuntia* está asociado con la polinización de las abejas y con la dispersión de las semillas y la propagación vegetativa por otros animales. Esta propagación es más eficiente que la reproducción sexual y ambos procesos, junto con las mencionadas adaptaciones anatómicas, morfológicas y fisiológicas, favorecen el gran éxito ecológico y evolutivo de este género (Sudzuki y col., 1993; Reyes-Agüero y col., 2006).

En la especie *Opuntia megapotamica*, las plantas son arbustos suculentos perennes de 1 a 3 m de altura (Kiesling, 2005; Font, 2014). Los cladodios son de color verde oscuro, ovalados y miden de 10 a 20 cm de largo y de 8 a 13 cm de ancho. Las espinas blanco grisáceas, a veces ausentes en los cladodios jóvenes, aparecen solitarias o en grupos de dos o tres y miden alrededor de 5 cm de largo. Las flores son anaranjadas. Los frutos son carnosos, ovoides, de 5 a 7 cm de largo, de color violáceo purpúreo. Las semillas son lenticulares y tienen un diámetro de 5 a 6 mm y un espesor de 1,5 a 2 mm.

Hábitat

Las *Opuntia* son plantas xerófitas que generalmente crecen en climas áridos y semiáridos con precipitaciones anuales menores a 250 mm y entre 250 y 450 mm, respectivamente. Existen en forma silvestre o cultivada y poseen una amplia distribución geográfica ya que se encuentran en los cinco continentes (Nobel, 1995; Mohamed-Yasseen y col., 1996). Su gran capacidad de adaptación climática les permite crecer también en llanuras, zonas costeras, mesetas, territorios de gran altura y zonas con temperaturas de hasta -40 °C (Nobel, 1999).

La especie *Opuntia megapotamica* crece en las Regiones Fitogeográficas de la Llanura Pampeana, el Bosque Chaqueño y el Espinal (Cabrera, 1976) encontrándose en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa, Santa Fe y San Luis (Kiesling, 2005; Font, 2014). Se distribuye también en los países limítrofes de Brasil y Uruguay.

Agro-tecnología del cultivo

En el contexto de la desertificación global, de la declinación de las fuentes de agua y de la deforestación realizada por el hombre, las *Opuntia* constituyen plantas de gran importancia agronómica por sus propiedades adaptativas y nutricionales.

En la actualidad, cerca del 40 % de la superficie terrestre corresponde a zonas áridas o semiáridas que están habitadas por mil millones de personas que

soportan, en forma permanente, la escasez de agua y de alimentos (Granados-Sánchez y col., 2013). En Etiopía y en Eritrea, las *Opuntia* son denominadas "puente de la vida" pues brindan agua y alimento a los campesinos y al ganado (Sáenz, 2006). También han contribuido ecológicamente a frenar la degradación de los suelos deforestados (Pimienta-Barrios, 1994; Nobel y Bobich, 2002) y a contrarrestar el efecto invernadero ya que su biomasa aumenta cuando la concentración de CO₂ atmosférico asciende hasta alcanzar valores deletéreos (Nobel e Israel, 1994; Nobel y col., 2002).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estableció, en 1993, la Red Internacional de Cooperación Técnica en Cactus (CACTUSNET) con la finalidad de facilitar el intercambio de información, la cooperación técnica y la capacitación de las personas en su manejo, de manera de fomentar la utilización de estas plantas y de sus derivados. En este marco, publicó un libro en el que se aborda principalmente la agro-ecología, el cultivo y los usos del nopal (Barbera y col., 1999). Por otro lado, también editó "El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje" que compendia la información científica y práctica sobre su uso forrajero en distintos países (Mondragón-Jacobo y Pérez-González, 2003) y "Utilización Agroindustrial del Nopal" que analiza en profundidad su industrialización tanto para el consumo humano como para otros fines y que lo considera "un tesoro bajo las espinas" de alto provecho para la humanidad (Sáenz, 2013).

Son varios los países que se dedican al cultivo comercial de *Opuntia*:

México (avanzado en la industrialización), Brasil (donde el cultivo se usa en su mayoría como forraje), Perú (destinado principalmente a la producción de cochinilla), Italia y Chile (Inglese y col., 2002). En otros estados como España (Islas Canarias), Estados Unidos, Jordania, India y Túnez se registran menores superficies de cultivo. La villa de Valtierra (Guanajuato, México) es considerada la Capital Mundial del Nopal debido a su producción diaria de 100 toneladas.

En Argentina existen alrededor de 200.000 hectáreas de tuna silvestre y 10.000 hectáreas destinadas al cultivo, principalmente de *O. ficus-indica*, que se distribuyen entre Santiago del Estero, Mendoza, Tucumán, Córdoba, Jujuy, La Rioja, Salta, San Juan y Catamarca (Sáenz, 2013). Estas plantaciones forman parte de la economía de subsistencia de las familias de la región y están destinadas principalmente a la producción de forraje y de frutos que se comercializan en los mercados locales y en el Mercado Central de Buenos Aires (Guevara y col., 2000; Galizzi y col., 2004; Lozano, 2013). Existe cierto grado de industrialización de los frutos y en el comercio se encuentran algunos productos procesados como jarabes (arope), mermeladas y jaleas (Ochoa, 1997). Además, se pueden encontrar cápsulas que contienen extractos de cladodios deshidratados de *O. ficus-indica* que se utilizan para aumentar la ingesta general de fibras. Son varios los laboratorios que las fabrican e inclusive los productos se encuentran disponibles en internet. A pesar de ello, el uso hortícola de la tuna no está difundido en todo el país (Lozano, 2011).

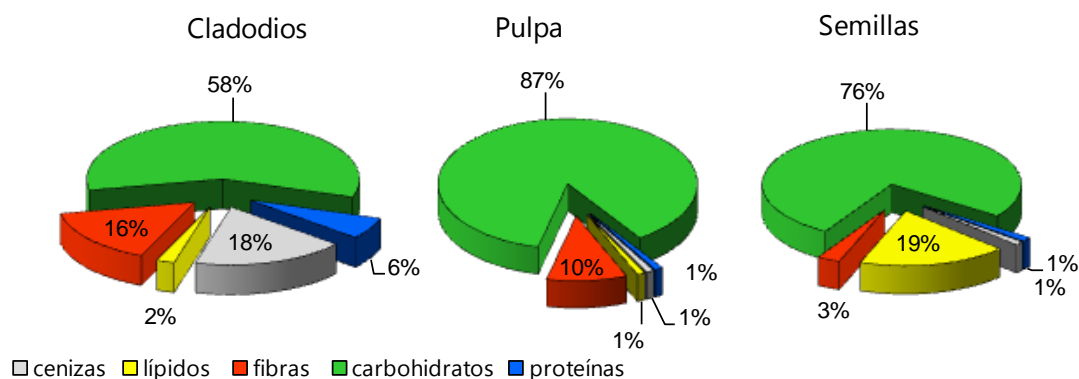
El Proyecto "Frutales de zonas áridas", apoyado por la FAO y llevado a

cabo en la Universidad Nacional de Santiago del Estero, ha divulgado cartillas relacionadas con el manejo agronómico, la cosecha y control de las plagas que afectan a la planta. Se trata de reimpulsar la utilización de la cochinilla como colorante y en el medio rural se usan los cladodios cortados para clarificar el agua de represas o de lluvia recolectada para beber. El mucílago mezclado con cal se emplea como adherente para el blanqueo de las habitaciones de las casas de adobe (Ochoa, 1997). El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) realiza investigaciones sobre el mejoramiento y el desarrollo de la producción de la tuna y organiza jornadas de capacitación a campo para promocionar el manejo del cultivo.

Composición fitoquímica

Las *Opuntia* poseen un valor nutritivo alto ya que contienen cantidades importantes de carbohidratos y fibras seguidos de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Sus propiedades farmacológicas se sustentan en la composición química que varía, entre otros factores, según la especie y la edad de la planta, el estado fisiológico del tejido, los factores edáficos del lugar y la estación del año (Retamal y col., 1987; Rodríguez-Felix y Cantwell, 1988; Enigbokan y col., 1996; Alarcon-Aguilar y col., 2003; Batista y col., 2003; Ginestra y col., 2009).

A partir de los datos obtenidos por distintos autores, se presenta una figura integradora que muestra la composición química de los cladodios, de la pulpa de los frutos y de las semillas de *Opuntia* spp..



Los valores están expresados en porcentaje de peso seco. Fuente: Stintzing y Carle, 2005; Moßhammer y col., 2006; Prieto-García y col., 2006.

Como puede observarse, estas plantas constituyen una abundante fuente de carbohidratos. En los cladodios, la cantidad de almidón varía según la estación del año entre 85 y 171 mg/g de peso seco (PS) (Retamal y col., 1987). Dentro de los polisacáridos no digeribles, las fibras solubles están integradas por pectinas y mucílagos mientras que las fibras insolubles están representadas principalmente por celulosa y hemicelulosa (Peña-Valdivia y col., 2012). La pulpa de los frutos es también rica en fibras solubles (7,8-18,6 %) e insolubles (11,6-16,5 %) y el tipo de polisacáridos que las conforman varía según la madurez (Álvarez Armenta y Peña-Valdivia, 2009). En las semillas, el almidón representa el 93 % del contenido total de carbohidratos mientras que los azúcares reductores y la sacarosa se encuentran en cantidades menores (Prieto-García y col., 2006).

En lo referente a los minerales, en los cladodios el potasio es el mayoritario seguido por calcio, sodio, manganeso, hierro, zinc y cobre (Batista y col., 2003; McConn y Nakata, 2004). La pulpa de los frutos es rica en magnesio (hasta 98,4 mg/100 g PS) y en calcio (hasta 59,0 mg/100 g PS) y contiene también sodio,

potasio, hierro y fósforo pero en cantidades menores (Moßhammer y col., 2006). En las semillas predominan magnesio y calcio seguidos por potasio y sodio (Prieto-García y col., 2006).

La harina de los cladodios es considerada un buen complemento dietario ya que de los 17 aminoácidos que posee, 9 son esenciales. En general, la fenilalanina es el aminoácido mayoritario seguido por treonina e isoleucina. Los niveles pueden variar según la edad de los cladodios ya que los jóvenes tienen mayores niveles de treonina y de isoleucina y en función de la edad aumentan las cantidades de histidina, leucina y lisina (Hernández-Urbiola y col., 2010). La pulpa de los frutos posee un contenido elevado de aminoácidos esenciales libres (Kugler y col., 2006; Moßhammer y col., 2006). En lo referente a la harina de semillas, los principales aminoácidos esenciales son leucina, lisina y arginina (Nassar, 2008). Con respecto a los lípidos, en los cladodios se determinaron contenidos elevados de ácidos grasos-n-3 (Muñoz de Chávez y col., 1995) y se identificaron los ácidos oleico (n-9) y linoleico (n-6) (Stintzing y Carle, 2005). También se encontró un nivel importante de β -sitosterol (Salt y col., 1987). En los frutos, tanto en las semillas como en el aceite de pulpa, el ácido graso mayoritario es el linoleico seguido por los ácidos palmítico y oleico, y en el aceite de pulpa se hallan cantidades importantes de ácidos grasos poliinsaturados como el linolénico. En las semillas y en el aceite de pulpa, los esteroides más abundantes son el β -sitosterol y el campesterol (Ramadan y Mörsel, 2003). Estos mismos autores determinaron que las semillas contienen

distintos isómeros de tocoferoles y que en el aceite de pulpa del fruto predomina el δ -tocoferol, homólogo de la vitamina E. El perfil lipídico del aceite de las semillas de *Opuntia* spp. es similar a los registrados en las semillas de soja y de maíz (Tan y Che Man, 2000; El Finti y col., 2013).

En los cladodios frescos, los constituyentes fenólicos están representados mayoritariamente por derivados flavonoles (Jaramillo-Flores y col., 2003) mientras que en los cladodios deshidratados y molidos se destaca la presencia de agliconas flavonoides típicas (Stintzing y Carle, 2005). En los cladodios frescos de *O. dillenii* Haw se encontraron derivados de α pironas, denominados opuntiósido II y opuntiósido III (Saleem y col., 2005; Qiu y col., 2007). También contienen carotenoides como luteína, criptoxantina y carotenos (Jaramillo-Flores y col., 2003). Estos últimos se hallan en abundancia en el aceite de pulpa mientras que en el de semillas se registran cantidades menores (Ramadan y Mörsel, 2003). En distintas especies de *Opuntia* se determinó que la pulpa de frutos posee un elevado contenido de compuestos fenólicos que le confieren propiedades antioxidantes (Coria Cayupán y col., 2011).

En lo referente al contenido de vitaminas, las mayoritarias son C, A, B2, B3 y B1 (Stintzing y Carle, 2005).

Generalmente, el contenido de agua representa entre el 85 y el 95 % del peso fresco de los cladodios aunque durante períodos prolongados de estrés hídrico puede disminuir hasta 60 % (Nobel, 1994).

Usos etnobotánicos

En general, el hombre ha utilizado las *Opuntia* como fuente de alimento, con fines medicinales, como forrajera, como sustrato en la producción de cochinilla para la elaboración de colores naturales, como cosméticos, como cerco vivo en la protección de huertas, como leña debido a su alto contenido en lignina, para la producción de bioenergía, en la conservación de suelos, para disminuir la contaminación atmosférica y en la construcción de viviendas (Stintzing y Carle, 2005).

Tradicionalmente, los pueblos de Latinoamérica han atribuido a las *Opuntia* un amplio espectro de propiedades medicinales. Los aztecas las consideraban "plantas de la vida" y el valor que les dieron quedó reflejado en el nombre del imperio Tenochtitlán (tetl, piedra y nochtli, nopal). Los frutos se utilizaban en las disfunciones hepáticas y vesiculares y para disminuir la fiebre, las pencas en el alivio de las inflamaciones, el mucílago o "baba" para suavizar la piel y las raíces en el tratamiento de las úlceras estomacales y de la erisipela.

Uno de los productos más conocidos de la farmacopea nativa del norte de Perú es la "*cimora*" cuyo componente principal es la *O. cylindrica* que ha sido empleada especialmente en dolencias de origen renal (Cruz Sánchez, 1951). En los altiplanos de Argentina, Chile, Bolivia y Perú crece la especie *O. soehrensii* Britton & Rose, conocida vulgarmente como "*airampo*", a la que también se le asignan propiedades medicinales (Scarpa y Arenas, 1996). Los pueblos originarios Toba y Wichi, en el norte de Argentina, usan distintas partes de *O.*

ficus-indica para calmar los dolores de cabeza ocasionados por la exposición al sol, como antitusivo y antirreumático y en las afecciones urinarias (Chifa y Ricciardi, 2002). Los indígenas Pilagá, en el centro de la provincia de Formosa, utilizan la *O. chakensis* Speg. para combatir la gripe (Filipov, 1997). Un análisis de las prácticas de curación alternativas empleadas en los barrios periféricos de Bahía Blanca mostró que la tuna se usa como jarabe para aliviar la tos (Benvenuto y Sánchez, 2002).

El uso popular de *Opuntia* spp. a lo largo del tiempo podría ser un dato indicativo de su inocuidad. Sin embargo, aunque la planta es bien tolerada cuando se la administra oralmente, se determinaron algunos efectos adversos como diarrea leve, náuseas, distensión abdominal y dolor de cabeza (de Smet, 2002; Federici y col., 2005).

Diabetes

Se trata de un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por una elevación crónica de la glucosa en sangre resultante de defectos en la secreción de la insulina, en la acción de la hormona o en ambos eventos (Asociación Americana de Diabetes, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2016). Numerosos estudios han demostrado que la hiperglucemia genera un estrés oxidativo que promueve la formación *de novo* de radicales libres que resultan nocivos para varios tejidos (Kaneto y col., 2007; Roberts y Sindhu, 2009). Los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la diabetes van desde la

destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente disminución en la secreción de insulina y deficiencia de la hormona, a anomalías en los mecanismos moleculares que generan la resistencia de los tejidos blanco a la acción de la insulina. Como consecuencia, surgen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas que conducen finalmente a la disfunción e insuficiencia de diferentes órganos (riñones, ojos, corazón, hígado) y al deterioro de nervios y vasos sanguíneos. Estas complicaciones se pueden clasificar en agudas, asociadas con mortalidad, y en crónicas, que son las más comunes (Forbes y Cooper, 2013). Entre las primeras, se encuentran la cetoacidosis diabética y el coma diabético. El segundo grupo incluye daños microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica y autonómica) y macrovasculares (alteraciones coronarias, cerebrovasculares y arteriales periféricas).

Existen distintos tipos de diabetes que actualmente se clasifican en cuatro categorías según su etiopatogenia:

1. Diabetes tipo 1, originada por la destrucción de las células β del páncreas
2. Diabetes tipo 2, generada por la combinación de la resistencia a la acción de la insulina y una secreción compensatoria inadecuada de la hormona
3. Diabetes *mellitus* gestacional, diagnosticada por la intolerancia a la glucosa que aparece durante el segundo o el tercer trimestre del embarazo.

4. Tipos específicos de diabetes originados por otras causas, por ejemplo: síndromes de diabetes monogénicas debidas a defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina (diabetes neonatal y diabetes del adulto de inicio juvenil, MODY); enfermedades del páncreas exócrino como la fibrosis quística; y diabetes inducida por drogas (corticoides, diuréticos tiazídicos, antagonistas β -adrenérgicos).

La diabetes tipo 1 incluye la diabetes inmunomediada y la diabetes idiopática y se presenta en el 5 al 10 % de los pacientes (Asociación Americana de Diabetes, 2016). La primera, antes denominada diabetes insulino dependiente o diabetes de comienzo juvenil, resulta de un proceso patológico autoinmune e inflamatorio selectivo donde la destrucción específica de las células β pancreáticas ocasiona la pérdida de la insulina endógena y conduce a la hiperglucemia. Hay una múltiple predisposición genética para esta destrucción autoinmune y también se la relaciona con factores ambientales aún no muy bien definidos (nitritos y nitratos del agua y de la dieta, proteínas de la leche bovina, polución ambiental). En general, aparece en la primera infancia y en la adolescencia aunque puede manifestarse a cualquier edad y se diagnostica mediante pruebas serológicas o con marcadores genéticos. Se caracteriza por un inicio agudo y requiere tratamiento con insulina y un cuidadoso control del balance entre la ingesta de glucosa, la actividad física y la dosis de la hormona exógena. Algunos pacientes, especialmente los niños y los adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación y tienen propensión a

desarrollar otras enfermedades autoinmunes órgano-específicas como la tiroiditis de Hashimoto y la celiaquía (Doyle, 2015).

La diabetes tipo 1 idiopática es muy poco frecuente y los pacientes presentan insulinopenia permanente y predisposición a la cetoacidosis sin evidencias de autoinmunidad.

La diabetes tipo 2, antes denominada diabetes no dependiente de insulina o diabetes del adulto, es la de mayor prevalencia pues se presenta en el 90 al 95 % de los pacientes (Asociación Americana de Diabetes, 2016). Se caracteriza por la resistencia de los tejidos blanco a la insulina y por una deficiencia variable en la secreción de la hormona sin que haya destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. El músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo son los tejidos donde la insensibilidad a la insulina es más evidente debido al particular requerimiento de captación y metabolismo de la glucosa. Su etiología aún no se ha definido aunque se la asocia frecuentemente con una predisposición genética que sería mayor que en el caso de la diabetes tipo 1.

En la diabetes tipo 2 la hiperglucemia se desarrolla gradualmente durante un período prolongado, causando cambios patológicos y funcionales en diferentes tejidos que no son suficientes para generar indicios de la enfermedad (fase de pre-diabetes). Durante esta etapa asintomática, se puede determinar la alteración en el metabolismo de carbohidratos a través de la medición de la glucemia en ayunas o luego de una sobrecarga oral de glucosa. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, con la obesidad (que en

sí misma causa un cierto grado de resistencia a la insulina) y con el sedentarismo.

Los límites entre la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 no están bien definidos y por este motivo surgieron los términos "diabetes doble", "diabetes 1,5" o "LADA" (*Latent autoimmune diabetes of adults*) que incluyen a aquellos pacientes en los que coexisten características de ambos tipos de diabetes. Por ejemplo, personas con diabetes tipo 1 que tienen resistencia a la insulina o personas con diabetes tipo 2 que poseen anticuerpos contra las células β pancreáticas (Kaufman, 2006).

Metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos

El páncreas, órgano regulador clave de la digestión, absorción y utilización de los nutrientes, es una glándula de secreción mixta dividida funcionalmente en un componente exocrino que abarca el 98 % de su masa total y un componente endocrino que representa el 2 % restante. La porción exocrina está compuesta por las células acinares (acinos pancreáticos) que liberan enzimas digestivas hacia el sistema ductal. Los islotes de Langerhans forman el componente endocrino y están constituidos por agregados celulares en los que se distinguen cinco tipos de células (α , β , δ , F o PP y ϵ). Las células β representan el 80 % del total y producen la hormona polipeptídica insulina mientras que las otras células secretan glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina (Prado y col., 2004; Tassone y col., 2007). Estas hormonas están

implicadas en la regulación del metabolismo de nutrientes y en la homeostasis de la glucosa (Wu y col., 2015).

Los cambios en la concentración de glucosa extracelular afectan en forma directa a las células α y β de los islotes de Langerhans (*Figura 1*). Tras la ingesta de alimentos, los carbohidratos de la dieta generan un aumento en la glucemia que estimula la secreción de insulina por las células β e inhibe la secreción de glucagón por las células α (regulación recíproca). La insulina estimula la absorción y utilización de la glucosa por los tejidos blanco; promueve el almacenamiento del excedente en el hígado y en el músculo en forma de glucógeno, a través de la estimulación de la glucogenogénesis, y en el tejido adiposo como triacilglicéridos (TAG), a través de la lipogénesis; y reprime la hidrólisis de estas macromoléculas de almacenamiento energético mediante la inhibición de la glucogenolisis y de la lipólisis (Saltiel y Kahn, 2001; Frayn y col., 2006; Samuel y Shulman, 2016). En el músculo, la insulina también contribuye al mantenimiento de la masa muscular promoviendo la captación de aminoácidos y su incorporación a las proteínas e inhibiendo la degradación de las mismas (Liu y col., 2006). Todos estos cambios generan una disminución de la glucemia que conduce a la secreción de glucagón por las células α y a la inhibición de la secreción de insulina. Ambos eventos estimulan la liberación de glucosa a partir del glucógeno y de la gluconeogénesis generando así el retorno de la glucemia a niveles normales (Bouillon y col., 2015).

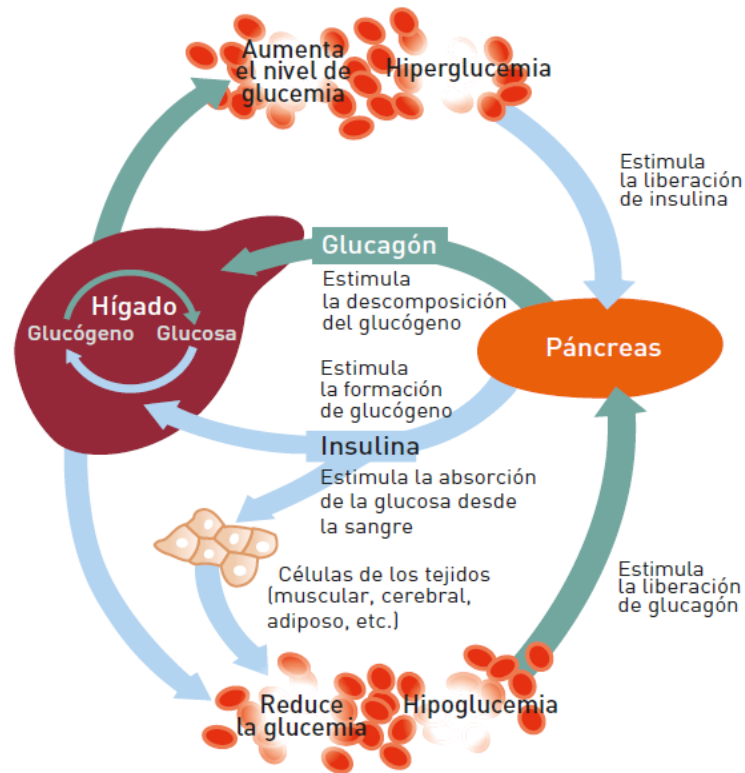


Figura 1. Roles de la insulina y del glucagón en el metabolismo de carbohidratos (FID, 2013).

La masa total de las células β sufre cambios compensatorios a lo largo de la vida para satisfacer la demanda de insulina del organismo y contrarrestar la lenta renovación de las células maduras (Bonner-Weir y col., 2012). Los posibles mecanismos de regeneración incluyen la autorreplicación de las células β , la neogénesis a partir de otro tipo de células precursoras y la trans-diferenciación de las células α (Levetan, 2010; Wu y col., 2015). En condiciones fisiológicas, la neogénesis sería el principal proceso durante el periodo perinatal y postnatal temprano mientras que la autorreplicación contribuiría en etapas más avanzadas del desarrollo (Bouwens y Rooman, 2005).

El sistema gastrointestinal también tiene un rol clave en el control de la

homeostasis de la glucosa, no sólo por su papel en la absorción de los hidratos de carbono sino también por la liberación de las hormonas intestinales que contribuyen a la regulación del metabolismo (Drucker, 2016). Estas hormonas digestivas actúan por vía sistémica estableciendo circuitos que comunican el hígado, el músculo, el tejido adiposo y los islotes del páncreas para coordinar la captación y asimilación de la glucosa. Además, se ha sugerido que estimularían la supervivencia de las células β pancreáticas y la neogénesis de los islotes determinando un aumento en la masa celular total y una mejora en la homeostasis de la glucosa (Drucker, 2003; Bulotta y col., 2004).

Los lípidos de la dieta y la síntesis de los mismos en el hígado están muy relacionados con el metabolismo de la glucosa (Parhofer, 2015). Los primeros son absorbidos por los enterocitos y empaquetados junto con proteínas específicas (apoproteínas) formando agregados lipoproteicos (lipoproteínas) cuya función es transportar los lípidos a través del entorno hidrofílico del plasma desde el sitio de absorción o síntesis hacia los tejidos periféricos y regular la actividad de diferentes enzimas del metabolismo lipídico (Packard y col., 2005; Sacks, 2015). Las lipoproteínas son partículas esféricas complejas que tienen un centro hidrofóbico con cantidades variables de TAG y de colesterol esterificado cubierto por una capa externa polar formada por apoproteínas, fosfolípidos (PL) y colesterol libre. Pueden ser transportadas desde el intestino al hígado a través de la vía exógena y entre tejidos por la vía endógena. La clasificación de las lipoproteínas, según la densidad que les confiere la

proporción relativa de proteínas y de lípidos, se muestra en la siguiente tabla

(Barret y col., 2013):

Lipoproteína	Tamaño nm	Proteína %	Colesterol libre %	Esteres de colesterol %	Triacilglicéridos %	Fosfolípidos %	Origen
Quilomicrones	75 a 1000	2	2	3	90	3	Intestino
Quilomicrones remanentes	30 a 80	Capilares
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	30 a 80	8	4	16	55	17	Hígado e intestino
Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)	25 a 40	10	5	25	40	20	VLDL
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	20	20	7	46	6	21	IDL
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	7,5 a 10	50	4	16	5	25	Hígado e intestino

Los TAG de la dieta dan origen a los quilomicrones (QM) que están compuestos principalmente por TAG seguidos por colesterol libre y esterificado, PL y apoproteínas. Estos QM entran a la circulación por la vía de los conductos linfáticos y son retirados de la misma por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), localizada sobre la superficie del endotelio de los capilares. Esta enzima cataliza la degradación de los TAG a ácidos grasos libres (AGL) y glicerol que entran a las células musculares y adiposas para su utilización y almacenamiento. Alternativamente, los AGL pueden permanecer en la circulación unidos a la albúmina. Los QM depletados de los TAG constituyen los QM remanentes que son transportados al hígado, internalizados y degradados.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se forman principalmente en el hígado y transportan los TAG sintetizados por ácidos grasos y carbohidratos hacia los tejidos extrahepáticos. Después que sus TAG son removidos por la acción de la LPL, se transforman en las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que cuando pierden más lípidos y proteínas dan origen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se sintetizan en el hígado y en el intestino delgado y durante su circulación por la sangre se enriquecen con el colesterol y los fosfolípidos de los tejidos periféricos y de las VLDL y de los QM. Cuando retornan al hígado descargan su contenido lipídico (ruta del transporte inverso del colesterol) para volver luego a la circulación sanguínea.

El colesterol, componente esencial de las membranas celulares, es clave para el mantenimiento de su fluidez y actúa como precursor en la síntesis de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas. Puede obtenerse de la dieta (vía exógena) o biosintetizarse a partir de acetil-CoA (vía endógena). La enzima microsomal 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) cataliza en el hígado y en el intestino la reacción limitante de su biosíntesis que consiste en la reducción, en dos pasos, de la HMG-CoA a mevalonato (*Figura 2*).

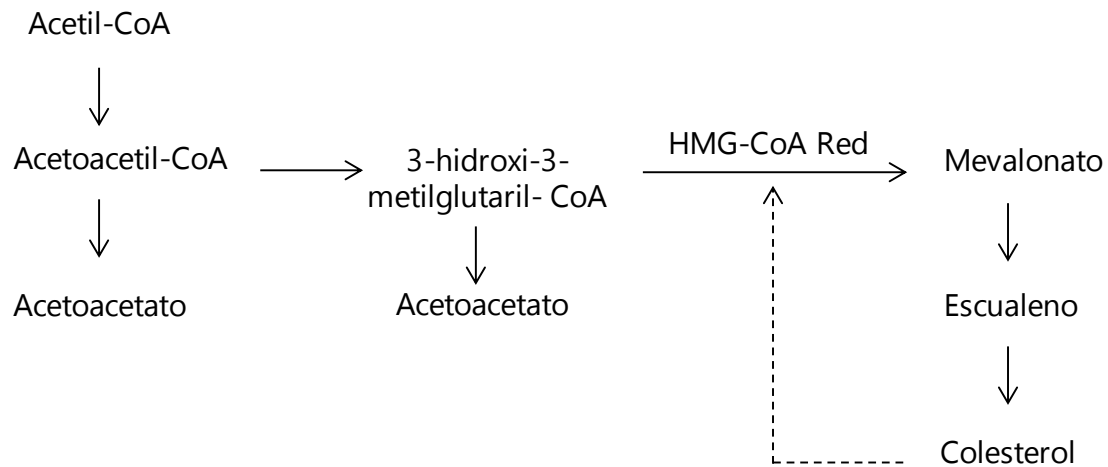


Figura 2. Biosíntesis de colesterol. Seis moléculas de mevalonato se condensan dando lugar al escualeno que al hidroxilarse forma el colesterol. La flecha punteada indica la inhibición por *feedback* de la HMG-CoA reductasa por el colesterol.

La biosíntesis de ácidos grasos ocurre principalmente en el hígado y la fuente de carbono es acetil-CoA, producto de la oxidación del piruvato, de la oxidación de algunos aminoácidos o de la β oxidación de los ácidos grasos. En una etapa preparatoria de la síntesis, se produce malonil-CoA a partir de acetil-CoA por acción de la acetil-CoA carboxilasa. Posteriormente, malonil-CoA y otras moléculas de acetil-CoA se unen a proteínas transportadoras de acilos (ACP). Estas uniones son necesarias para que las reacciones de síntesis puedan llevarse a cabo por medio del complejo enzimático de la ácido graso sintasa (FAS) que está localizado en el citosol y que agrega secuencialmente unidades de 2 carbonos a la cadena del ácido graso en formación (*Figura 3*).

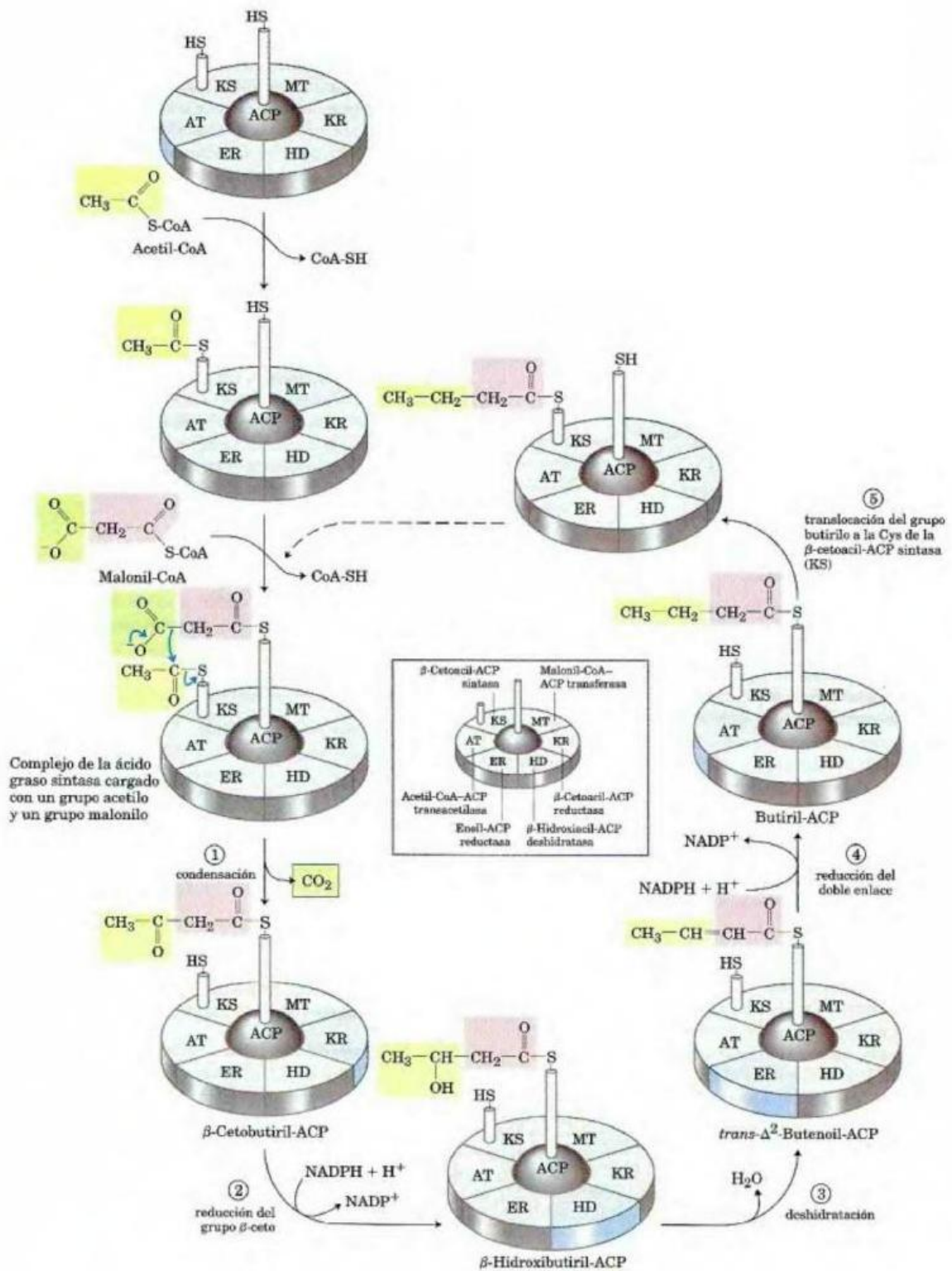


Figura 3. (Leyenda en la página siguiente)

La insulina participa a través de distintas acciones en la regulación del metabolismo lipídico: disminuye la actividad de la lipasa sensible a hormona (LSH) con la consecuente disminución de la lipólisis y de los AGL y el aumento del depósito de los TAG en el tejido adiposo; disminuye la producción de las VLDL; aumenta la síntesis y actividad de la LPL del endotelio de los tejidos adiposo y muscular; activa la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) y la lipasa hepática (LH), modificando así el transporte reverso del colesterol y el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TAG como los QM y las VLDL; y promueve la síntesis hepática de colesterol y de ácidos grasos a través de la regulación positiva de las enzimas limitantes como la HMG-CoA reductasa y la FAS, respectivamente (Kalofoutis y col., 2007).

Sistemas experimentales en diabetes

Los modelos animales y celulares son muy útiles para el abordaje experimental del estudio de las enfermedades y para el diseño de nuevas terapias (McGonigle y Ruggeri, 2014). En los códigos de ética internacionales

Figura 3. Biosíntesis de ácidos grasos. El complejo de la ácido graso sintasa se muestra en forma esquemática. Cada segmento del disco representa una de las seis actividades enzimáticas del complejo. En el centro se encuentra la proteínas transportadoras de acilos (ACP) con su brazo de fosfopanteína que acaba en un grupo -SH. La enzima mostrada en azul es la activa en cada paso. El grupo acetilo inicial está sombreado en amarillo; el C-1 y el C-2 del malonato están sombreados en rosa y el carbono liberado como CO₂ en verde. Se inicia con la condensación de un Acil-ACP con un malonil-ACP para formar un acetoacetil-ACP que, por una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación, conduce a butiril-ACP. Las reacciones anteriores se repiten pero ahora con el butiril-ACP y el malonil-ACP como iniciadores, obteniéndose un producto de 6 carbonos. El proceso se repite hasta obtener un ácido graso de 16 carbonos.

para la investigación biomédica, los ensayos con animales constituyen un requisito ineludible y previo a la realización de ensayos clínicos en humanos y las Agencias Reguladoras los exigen para la aprobación de nuevos fármacos (Rodríguez, 2012).

En relación con la diabetes, se han desarrollado distintos modelos experimentales animales que permiten estudiar la etiopatogenia de la enfermedad a nivel celular y molecular y también desarrollar nuevos compuestos terapéuticos y determinar sus mecanismos de acción (Dhuria y col., 2015). Los roedores representan el modelo animal más utilizado pues reproducen fielmente las condiciones fisiopatológicas de la enfermedad en humanos (Masiello, 2006; Frode y Medeiros, 2008; Arends y col., 2016).

En el caso de la diabetes tipo 1, la deficiencia en la producción de la insulina en los animales se puede lograr por mutaciones genéticas, ablación química o inducción viral (Dhuria y col., 2015). Para la diabetes tipo 2 generalmente se emplean modelos animales con obesidad dada la estrecha relación entre esta condición y la enfermedad. Los animales normales o sanos (normoglucémicos) representan un modelo complementario válido para el estudio de potenciales agentes hipoglucemiantes orales ya que permiten evaluar su efecto terapéutico en una situación en la que el páncreas está intacto y su actividad es normal (Williamson y col., 1996). También se emplea el modelo animal de sobrecarga oral de glucosa en el que se incrementa transitoriamente la glucemia sin dañar el páncreas (Etuk, 2010).

Actualmente, la inducción química con estreptozotocina (STZ) es el método diabetogénico más utilizado (Masiello, 2006; Frode y Medeiros, 2008; Dhuria y col., 2015) pues esta droga produce la muerte de las células β del páncreas dentro de las 24 hs de su administración, con la consecuente disminución en la producción de insulina (Junod y col., 1969). Constituye un modelo apropiado para estudiar los mecanismos subyacentes en la diabetes porque mimetiza las complicaciones agudas y crónicas de la enfermedad y reproduce algunas de sus alteraciones estructurales, funcionales y bioquímicas (Eleazu y col., 2013).

La STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) es un antibiótico antineoplásico de amplio espectro citotóxico aislado a partir de la fermentación de la bacteria gram-positiva *Streptomyces achromogenes*. La unidad de metil-nitrosourea en su estructura le confiere actividad alquilante (Elsner y col., 2000; Eleazu y col., 2013) mientras que la molécula de glucosa le permite el ingreso selectivo a las células por medio del transportador GLUT-2, una isoforma de baja afinidad que está presente en la membrana plasmática de las células β pancreáticas, de los hepatocitos, de las células tubulares renales y de los enterocitos (Bell y col., 1990; Burant y col., 1991). Por esta razón, se ha observado que el tratamiento con STZ no solo induce el estado diabético sino que puede causar daños a nivel hepático, renal y digestivo y producir algunas modificaciones en la sensibilidad sensorial (Rerup, 1970; Kazumi y col., 1978; Bennett y Pegg, 1981; Piyachaturawat y col., 1991; Eleazu y col., 2013; Andersson

y col., 2015). Sin embargo, se acepta generalmente que estas acciones deletéreas extrapancreáticas no tienen lugar cuando se emplean dosis bajas de STZ (Zafar y col., 2009; Qinna y Badwan, 2015).

Una vez dentro de la célula β , la STZ ejerce su acción diabetogénica citotóxica a través distintas vías: i) metilación del ADN por la formación de ión carbonio (CH_3^+) que produce la sobreactivación de la enzima nuclear poli adenosina difosfato ribosa polimerasa (ADPc-ribosa polimerasa), como parte del mecanismo de reparación celular, y que conduce al agotamiento del cofactor NAD^+ , a la inhibición de la oxidación de la glucosa y a la disminución del ATP, generando finalmente la muerte celular necrótica y, por lo tanto, la inhibición de la biosíntesis y secreción de la insulina (Yamamoto y col., 1981; Uchigata y col., 1982; Sandler y Swenne, 1985); ii) producción de óxido nítrico (Kwon y col., 1994; Szkudelski, 2001) que determina la muerte de las células β por necrosis (Kroncke y col., 1995; Konrad y col., 2001) y por apoptosis (Kaneto y col., 1995; Oyadomari y col., 2001; Friederich y col., 2009; Friederich-Persson y col., 2012); iii) acción en las mitocondrias y generación de radicales libres, como peróxido de hidrógeno, que provocan estrés oxidativo y aceleran el proceso de destrucción celular (Uchigata y col., 1982; Tesch y Allen, 2007); y iv) alteración de la vía de señalización del factor nuclear kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) con la consecuente apoptosis (Eleazu y col., 2013).

La inducción de la diabetes por la STZ es dosis dependiente de modo que se pueden lograr diferentes grados de deficiencia de insulina y distintos efectos

metabólicos. En ratas, generalmente se emplean dosis de 35 a 65 mg/kg de PC y se administra por vía intraperitoneal (Gajdosik y col., 1999; Eleazu y col., 2013; Dhuria y col., 2015). Dosis bajas y múltiples de STZ durante 5 días inducen insulinitis (Sotnikova y col., 2006). El suministro de una única dosis de 30 ó 40 mg/kg PC genera una diabetes transitoria retornando la glucemia a los valores normales a los 10 días mientras que la secreción de la insulina y la morfología de los islotes pancreáticos se restablecen a los tres meses. Dosis superiores a 40 mg/kg PC determinan una diabetes persistente (Szkudelski, 2001; Dhuria y col., 2015). Se genera una hiperglucemia estable y prolongada con una marcada alteración de la morfología de los islotes (pocas células secretoras de insulina y acumulación de las células secretoras de glucagón) que puede revertirse por exposición a un agente hipoglucemiante (Ar'Rajab y Ahren, 1993).

Impacto de la diabetes

La diabetes es una de las cuatro enfermedades no transmisibles que tienen una importante incidencia a nivel mundial (OMS, 2016). El envejecimiento de la población, sumado a la presencia de factores de riesgo como obesidad, sedentarismo, tabaquismo y dieta inapropiada, aumenta la prevalencia de la diabetes y la probabilidad de que se transforme en pandémica.

Según la Federación Internacional de Diabetes (FID), esta enfermedad en todas sus formas tiene costos humanos, sociales y económicos muy elevados. A pesar de que se cuenta con tratamientos farmacológicos eficaces, tecnologías

avanzadas y valiosas estrategias educativas y preventivas, no se ha podido lograr el objetivo de brindar a todas las personas una buena protección contra la enfermedad y las complicaciones asociadas. Los cálculos más recientes de la FID, provenientes de estudios estadísticos realizados desde el año 2011 en 110 países, indican que 415 millones de adultos tienen diabetes y predicen que esta cifra se incrementará a más de 642 millones para el año 2040 (FID, 2015). Se estima que actualmente hay un 46,5 % de casos no diagnosticados lo que implicaría que una gran cantidad de personas van a desarrollar progresivamente complicaciones de las que no son concientes.

En Argentina, la Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo del Ministerio de Salud de la Nación (ENFR, 2014) indica que el número de personas afectadas en el año 2013 representaba el 9,8 % de la población total sin cambios significativos con respecto a la Encuesta de 2009 (9,6 %). Se informó además que la diabetes constituía la principal causa de diálisis siendo responsable del 34,7 % de los casos incidentes y de un 22,8 % de los casos prevalentes.

Plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes

A pesar de los grandes avances en la investigación y en el desarrollo de fármacos específicos para el tratamiento de la diabetes, el acceso a los mismos resulta dificultoso para muchas personas en distintas partes del mundo por los elevados costos y por su efectiva disponibilidad (FID, 2015). Es necesario tener

en cuenta que el 80 % del total de los individuos afectados viven en países de ingresos medios y bajos. Este hecho constituye un elemento importante a la hora de analizar estrategias terapéuticas alternativas contra la enfermedad que puedan incluir el uso de diversas plantas. Así, se ha demostrado que numerosas hierbas y suplementos dietarios de origen vegetal poseen propiedades hipoglucemiantes e hipolipemiantes y mejoran el estado general del paciente diabético (Yeh y col., 2003; Shane-McWhorter, 2005; Al-Mustafa y Al-Thunibat, 2008; Najm y Lie, 2010). Estudios realizados en México sobre personas con diabetes tipo 2 evidenciaron que un porcentaje elevado de ellas recurre a terapias no convencionales siendo *Opuntia* spp. el remedio vegetal más utilizado (Shapiro y Gong, 2002; Stintzing y Carle, 2005). La ingesta de cladodios reduce la absorción de glucosa en el intestino y disminuye la glucemia post-prandial en los pacientes diabéticos tipo 2 (Meckes-Lozyoa y Roman-Ramos, 1986; Muñoz de Chávez y col., 1995; López-Romero y col., 2014a). Si bien las interacciones farmacodinámicas aún no se han dilucidado, se ha sugerido que podría existir una acción sinérgica de *Opuntia* spp. con las drogas hipoglucemiantes utilizadas en la medicina convencional (Rodríguez-Fragoso y col., 2008).

Entrevistas a pacientes diabéticos y a expendedores de plantas medicinales mostraron que los cladodios jóvenes y frescos, en forma de licuado, son consumidos tradicionalmente antes del desayuno para el tratamiento de la diabetes mientras que los cladodios a la parrilla se ingieren normalmente como

alimento (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2011).

Las acciones benéficas observadas en humanos que tradicionalmente consumen frutos y cladodios de *Opuntia* spp. han estimulado la realización de estudios pre-clínicos en animales de experimentación como ratones, ratas y cobayos. Se demostró que diversas especies de *Opuntia* poseen acciones hipoglucemiantes e hipolipemiantes (Fernández y col., 1994; Trejo-González y col., 1996; Ennouri y col., 2006b; Heinrich y col., 2014), antioxidantes (Lee y col., 2002; Ammar y col., 2015), analgésicas (Park y col., 2001), anti-inflamatorias (Park y col., 2001), antivirales (Ahmad y col., 1996), hepatoprotectoras (Kaur y col., 2012), antiulcerogénicas (Lee y col., 2002), antiaterogénicas (Budinsky y col., 2001) y antitumorales (Hahm y col., 2015; Hahm y col., 2016), entre otras.

Los datos mencionados sugieren que las *Opuntia* podrían constituir un recurso natural valioso para el tratamiento de distintas patologías, en general, y de la diabetes, en particular. Sin embargo, los pocos estudios toxicológicos realizados en distintas especies de *Opuntia* no son completos y en *Opuntia megapotamica* no se llevado a cabo ninguno. Por lo tanto, hasta el presente, no se cuenta todavía con la información necesaria para evaluar realmente su inocuidad, determinar sus efectos y establecer así su potencial terapéutico.

OBJETIVOS



El *objetivo general* de este trabajo de Tesis es evaluar la toxicidad y los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia y los lípidos de ratas normales y diabéticas a través de la realización de estudios pre-clínicos que puedan servir como base para estudios clínicos que sustenten el empleo de este vegetal como recurso terapéutico.

Como *objetivos específicos* se propone analizar:

- Ⓢ La toxicidad aguda y sub-aguda de las harinas de la planta cuando se las administra oralmente a ratas normales machos y hembras
- Ⓢ La caracterización lipídica de las distintas harinas
- Ⓢ Los efectos del suministro oral de las harinas sobre la glucemia en ratas normales con hiperglucemia transitoria
- Ⓢ Los efectos del suministro oral de las harinas en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina sobre:
 - Condición general y parámetros hematológicos
 - Glucemia, insulina plasmática e histología del páncreas
 - Lípidos y lipoproteínas plasmáticos y enzimas claves del metabolismo lipídico como la HMG-CoA reductasa y la ácido graso sintasa
 - Parámetros vinculados con el funcionamiento del hígado y del riñón e histología de ambos órganos
 - Contenido y composición de los lípidos hepáticos y renales.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. *Material vegetal*

Se trabajó con una población de cactus del género *Opuntia* (Mill.) que crece espontáneamente en el salitral de Villa Arias (partido de Coronel Rosales, provincia de Buenos Aires). Este material, que en un primer momento se denominó *Opuntia* aff. *salagria* (Speg.), ha sido objeto de recientes estudios sistemáticos y pertenece a una variedad aún no descripta del complejo *Opuntia megapotamica* (Villamil, com. pers.). Un espécimen de referencia (Villamil 8829) está depositado en el Herbario del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur (BBB).



Opuntia megapotamica en los alrededores de Bahía Blanca.

En la recolección del material, en el procesamiento post-cosecha y en el almacenamiento se tuvieron en cuenta las pautas generales aplicables a las plantas suculentas (Mizrahi y col., 1997) y a las materias primas vegetales en la

industria de productos fitoterapéuticos (Sharapin y col., 2000).

Los tallos (cladodios) y los frutos se recolectaron en Villa Arias, en dos días de principios de invierno de 7.30 a 9.30 hs. Las condiciones climáticas promedio fueron 3,6 °C de temperatura, 58 % de humedad, viento noroeste a 9 Km/h, 1010,9 Hpa de presión y cielo despejado. Se tomaron al azar 14 plantas adultas y se seleccionaron los cladodios terminales (jóvenes) de alrededor de 15 cm de largo y 10 cm de ancho y los frutos turgentes (maduros) de 7 cm de largo y 4 cm de ancho que aún se encontraban en las plantas.

En la primera etapa del procesamiento post-cosecha se descartaron las partes deterioradas, manchadas y/o con señales de ataque por hongos o insectos. Luego se extrajeron manualmente las espinas y el material vegetal se lavó con agua fría y se secó con papel absorbente. Los cladodios se cortaron en rebanadas, previa eliminación de las aréolas con bisturí. Los frutos se pelaron, se seccionaron por la mitad y la pulpa se separó de las semillas. Tanto los cladodios como la pulpa de los frutos se colocaron en bandejas enlozadas y se secaron en estufa con circulación de aire a 40 °C durante una semana. Las semillas se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. El proceso de secado, al reducir la humedad del material, determinó una pérdida de peso de alrededor del 85 %. Se eligió trabajar con el material vegetal deshidratado porque el proceso de secado interrumpe la degradación causada por enzimas e impide el desarrollo de microorganismos y reacciones de oxidación y de hidrólisis. Una vez seco, el material se molió y las harinas

resultantes se almacenaron, al vacío y protegidas de la luz, a 4 °C hasta el momento de su utilización.

2. Administración de la planta

En todos los experimentos, la administración de las harinas de la planta se llevó a cabo por vía oral teniendo en cuenta que es el modo en el que la planta es ingerida habitualmente por las poblaciones que la consumen.

En los estudios de toxicidad y en los ensayos de diabetes, la planta se administró como suplemento de la dieta estándar. Se armaron pellets con el alimento estándar y las harinas de cladodios, de semillas o de pulpa (pellet completo). Para ello, el alimento estándar se molió y se le agregó la cantidad deseada de harina, se mezcló, se embebió en agua destilada y se colocó en una jeringa de 5 ml con la punta cortada. Se presionó con el émbolo para comprimir la mezcla, se expulsó el pellet y se dejó secar a temperatura ambiente. Primero se suministró a los animales el pellet completo, se los observó hasta que finalizaran su consumo y luego se les proveyó la dieta estándar.

En las pruebas de tolerancia a la glucosa, las harinas de la planta se disolvieron en agua destilada y se administraron por vía oral con una jeringa con boquilla. Es importante mencionar que las suspensiones acuosas de cladodios y de pulpa de frutos son similares a los licuados de consumo tradicional. Si bien en otras especies de *Opuntia* la consistencia de las semillas es blanda, en el caso de *Opuntia megapotamica* su dureza requiere una

pulverización previa a la ingesta.

3. Animales de experimentación

Se emplearon ratas machos y hembras de la cepa Wistar de entre 2 y 3 meses de edad [200 - 250 g de peso corporal (PC)] procedentes del Bioterio del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO, Universidad Nacional de Tucumán - CONICET) y del Bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB, Universidad Nacional del Sur - CONICET).

Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio [temperatura (23 ± 1 °C), humedad (aproximadamente 70 %) y ciclo luz-oscuridad (12 hs)] hasta que se realizaron los experimentos. Se les administró agua y alimento estándar *ad libitum*.

La dieta estándar consistió en alimento balanceado para ratas y ratones de laboratorio de investigación biológica procedente de una fuente comercial (Alimentos Pilar SA – SENASA N° 02-014/A) con la siguiente composición centesimal: 25 % proteína bruta, 4 % extracto etéreo, 10 % fibra cruda, 12 % humedad, 9 % minerales totales, 0,8-1,4 % calcio, 0,6-1,2 % fósforo. Ingredientes: maíz, gluten, afrechillo de trigo, harina de soja, harinas de pescado, carne y pollo, soja integral, trigo, cebada, avena, alfalfa deshidratada, harina de girasol, aceites y grasas animales, metionina, antioxidantes, sal, vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, D3, E, ácido pantoténico, ácido fólico, niacina, cloruro de colina, biotina) y minerales (óxido cúprico, óxido de magnesio, iodato

de potasio, cloruro de potasio).

Una semana antes de comenzar cada experimento, los animales se dividieron en los grupos de trabajo y se realizaron prácticas de manipulación para favorecer su adaptación y disminuir el estrés.

Al finalizar los diferentes períodos experimentales, se practicó la eutanasia a los animales en forma humanitaria por inyección intraperitoneal de acepromazina (5 mg/kg PC) y ketamina (50 mg/kg PC) o por gaseado con CO₂, seguidos por una punción cardíaca. En todos los casos se realizó una necropsia detallada y se extrajeron los órganos de interés que se pesaron, se midieron y se procesaron para los estudios histopatológicos.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio" [Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), National Academy of Sciences, Bethesda, MD, 1996] y con lo establecido en "Utilización de animales para la investigación y docencia: una reflexión ética necesaria" (Feijó, 2005).

4. *Diseño experimental*

4.1. *Ensayos de toxicidad*

La toxicidad aguda y la toxicidad sub-aguda de las harinas de cladodios, de semillas y de pulpa se evaluaron siguiendo las guías de la OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) avaladas internacionalmente. El uso frecuente de *Opuntia* spp. en la medicina folklórica

permite suponer que la planta no tiene efectos tóxicos serios. Por este motivo se realizó el Test Límite en el cual se administró a los animales sanos una sola dosis máxima de las distintas harinas por separado. Este diseño permitió emplear el menor número posible de animales.

Las ratas se distribuyeron en grupos de acuerdo con un diseño en bloques aleatorizados lo que significa que en cada jaula se colocó un animal de cada tratamiento (uno control, uno tratado con cladodios, otro con semillas y otro con pulpa) marcados en la base de la cola con fibra indeleble de distintos colores. Durante el período de tratamiento se realizaron observaciones diarias del estado clínico de los animales y de su patrón de comportamiento. Se dedicó especial atención a la posible aparición de temblores, convulsiones, salivación, diarrea y letargia. El peso corporal de los animales se registró semanalmente antes de la administración del alimento suplementado con las harinas a testear. Al finalizar el período experimental, se realizó la eutanasia de la manera ya descrita, se colectó la sangre para la medición de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica y se extrajeron los órganos (hígado, riñón, páncreas, bazo, estómago, duodeno, íleon y colon) para los estudios histopatológicos.

4.1.1. Toxicidad aguda

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Guía de la OECD N° 423 (Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity Class Method. 2001)

cuyo método resultó el más apropiado para los propósitos de esta investigación y se seleccionó siguiendo el Documento de Orientación sobre las Pruebas de Toxicidad Oral Aguda de la OECD (Guidance Document on Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N° 24. 2000). Siguiendo las indicaciones de esta Guía se usaron solo ratas hembras pues en general tienen más sensibilidad a las drogas que los machos y esto permitió trabajar con una cantidad mínima de animales.

Se emplearon hembras Wistar normales de 13 semanas de edad (232 ± 21 g) a las que se les administró oralmente, como suplemento de la dieta estándar, una única dosis de 2.000 mg/kg PC de las harinas de cladodios, de pulpa o de semillas. Al grupo control se le administró únicamente el alimento estándar. En total se trabajó con 4 grupos (uno control y tres tratados con las distintas harinas por separado) de 6 animales cada uno (N=24). Los animales se observaron durante 14 días, con especial atención en las primeras 24 horas. Durante todo el período se les administró agua *ad libitum* y alimento estándar en una cantidad fijada sobre la base del consumo habitual de las ratas en el bioterio.

4.1.2. Toxicidad sub-aguda

En este caso se siguió la guía N° 407 de la OECD (Guideline for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. 2008). Se utilizaron ratas Wistar normales machos (211 ± 26 g) y hembras (175 ± 15 g) de

8 semanas de edad a las que les administró oralmente, como suplemento de la dieta estándar, 1.000 mg/kg PC de harina de cladodios, de pulpa o de semillas, en forma diaria y por un período de 28 días. En total se trabajó con 4 grupos de ratas machos y 4 grupos de ratas hembras (en cada caso, uno control y tres tratados con las distintas harinas por separado) de 5 animales cada grupo (N = 40). Cada día a las 9.00 hs se ubicó cada animal en una jaula individual, se le suministró el pellet de alimento estándar más la harina correspondiente y se lo colocó nuevamente en la jaula grupal. A los animales controles se los manipuló de la misma manera pero solo se les administró el pellet de dieta estándar. Del mismo modo que en el estudio de toxicidad aguda, durante el período experimental se administró a los animales agua *ad libitum* y alimento estándar en una cantidad pre-establecida, se realizaron observaciones clínicas diarias y se determinó periódicamente el peso corporal.

4.2. Ensayos en ratas con hiperglucemia transitoria

A ratas normales, en condiciones de ayuno, se les administró oralmente diferentes dosis de suspensiones acuosas de las harinas de cladodios, de pulpa o de semillas y 30 minutos después se les suministró, también por vía oral, una sobrecarga de glucosa en solución al 50 % (2 g/kg PC) (Pruebas orales de tolerancia a la glucosa). La glucemia se determinó cada 15 minutos durante un período de 2 horas.

Los animales machos se dividieron al azar en grupos de 4 animales cada

uno según los distintos tratamientos (N=44): Grupo 1: agua destilada (8 ml/kg PC; Control); Grupo 2: glimepirida (droga hipoglucemiante, 5 mg/kg PC; Control Estándar); Grupos 3, 4 y 5: suspensión acuosa de harina de cladodios (100; 200 y 400 mg/kg PC, respectivamente); Grupos 6, 7 y 8: suspensión acuosa de harina de pulpa (37; 73 y 146 mg/kg PC, respectivamente); Grupos 9, 10 y 11: suspensión acuosa de harina de semillas (80; 160 y 320 mg/kg PC, respectivamente). También se realizaron pruebas preliminares en ratas hembras siguiendo el mismo procedimiento pero únicamente con la dosis que resultó más efectiva para los machos.

En cada grupo, la dosis intermedia de harina se estableció suponiendo que un ser humano adulto de 70 kg de peso corporal promedio ingeriría, por día, 1 cladodio y 1/2, 2 frutos ó 500 semillas. A partir de estos valores se dividió y se multiplicó por dos para establecer las dosis mínima y máxima, respectivamente.

4.3. Ensayos en ratas diabéticas

4.3.1. Inducción de la diabetes experimental

Para inducir la diabetes se inyectó a las ratas, por vía intraperitoneal, una única dosis de 45 mg/kg PC de STZ (Sigma, St Louis, USA) disuelta en 0,2 ml de buffer citrato de sodio 10 mM, pH 4,5 (Sánchez y col., 2000). A las ratas controles se les suministró solamente el buffer. Esta única dosis de STZ determina un estado de hiperglucemia y de deficiencia de insulina y, como se

trata de una dosis baja, no son esperables cambios patológicos en los tejidos extrapancreáticos (Zafar y col., 2009; Qinna y Badwan, 2015).

El estado diabético se confirmó a las 48 hs de administrada la droga, a través de la medición de la glucemia en ayunas (Accucheck, Roche Molecular Biochemicals, Switzerland) y de la glucosuria (Glukotest-Boeringher Mannheim, Alemania). Valores de glucosa sanguínea de 350 mg/dl o superiores se consideraron representativos de un estado hiperglucémico y los animales en los que se hallaron estos niveles constituyeron el grupo diabético y se mantuvieron bajo estricto control durante el periodo experimental.

4.3.2. Tratamiento de los animales diabéticos con las distintas harinas de la planta

Quince días después de la inyección de la STZ o del buffer citrato, cada animal fue examinado para comprobar su condición general. Se utilizaron aquellos que mostraron un estado físico aceptable y un aumento significativo, con respecto a las ratas controles normales, en los niveles de glucosa, colesterol total y triacilglicéridos plasmáticos.

Los animales (N=30) se organizaron en 5 grupos de 6 animales cada uno de acuerdo con un diseño completamente aleatorizado (control normal, control diabético y ratas diabéticas tratadas con harina de cladodios, de pulpa y de semillas, por separado). Para determinar el efecto de la planta, se administraron a los distintos grupos, diariamente en forma oral durante 30 días: 200 mg/kg

PC de harina de cladodios, 73 mg/kg PC de harina de pulpa y 160 mg/kg PC de harina de semillas. Los controles normal y diabético recibieron solamente la dieta estándar. Las dosis de harinas empleadas se seleccionaron siguiendo el criterio explicitado en los ensayos de tolerancia a la glucosa.

La condición clínica general se observó periódicamente y se controló el peso corporal de los animales. Una vez por semana, cada animal fue sacado de su jaula para una evaluación que incluyó observaciones de la condición general, comportamiento y características de pelo, piel y mucosas. Se analizó el aspecto del abdomen y de la genitalia externa, la presencia de secreciones, la actividad autonómica (piloerección, lacrimación, tamaño pupilar, perfil respiratorio) y del sistema nervioso central (postura, movimientos exploratorios, presencia de movimientos clónicos o tónicos). También en este caso, durante el período experimental, se administró a los animales una cantidad conocida de alimento estándar establecida sobre la base del requerimiento habitual diario de las ratas en el bioterio.

La glucemia se determinó en el tiempo inicial, en la mitad del período experimental y una vez finalizado el mismo. Se recolectaron muestras de orina tres días antes de concluir el período de tratamiento. Se practicó la eutanasia, se obtuvo la sangre para la medición de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica e inmediatamente se realizó una necropsia detallada y se pesaron los órganos de interés (hígado, riñón y páncreas) que se preservaron para los análisis histopatológicos, enzimáticos y lipídicos.

5. Obtención de sangre y orina y medición de parámetros hematológicos y de bioquímica clínica

Al finalizar los estudios de toxicidad y los ensayos en ratas diabéticas, las muestras de sangre se colectaron por punción cardíaca con jeringas de 5 ml y agujas 21 G. En las pruebas de tolerancia a la glucosa y durante los tratamientos de las ratas diabéticas con las harinas de la planta, la sangre se extrajo mediante una pequeña incisión en la punta de la cola del animal, previa dilatación con alcohol y agua templada.

Para la obtención del plasma, la sangre se colectó en capilares heparinizados, se centrifugó en tubos cónicos durante 30 min a baja velocidad y se conservó el sobrenadante plasmático.

La glucemia se determinó inmediatamente después de la obtención de la sangre con el sistema ACCU-CHEK® (Roche Diagnostics GnbHD-68298 Mannheim, Germany) que se fundamenta en una medición fotométrica mediante tinción con oxidorreductasas.

En el caso de la evaluación de los parámetros hematológicos, la sangre se colectó en tubos cónicos que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mientras que las muestras destinadas a la determinación del tiempo de coagulación se recogieron en tubos con citrato sódico.

Los distintos parámetros hematológicos y de bioquímica clínica en sangre, plasma y orina se determinaron en los "Laboratorios de Análisis Clínicos Integrados" (LACI, Bahía Blanca) y en el "Laboratorio Tucumán" (LT, San Miguel

de Tucumán). La insulina plasmática se midió a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Rat/mouse Insulin ELISA kit, Linco Research, Inc.). La cuantificación de los TAG y del colesterol total (CT) se realizó mediante test enzimáticos *in vitro* con un autoanalizador Hitachi 902 (Roche). El colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) se determinó, luego de la precipitación de las VLDL y de baja densidad (LDL), con polianiones (sulfato de dextrano y cloruro de magnesio) y el colesterol asociado a las LDL (LDL-c) por un método enzimático homogéneo en dos pasos. En ambos casos, se utilizó el mencionado autoanalizador. Las lipoproteínas VLDL se calcularon mediante la fórmula TAG/5 y el riesgo aterogénico a través de la relación entre el colesterol total y el asociado a las HDL (CT/HDL-c). Los ácidos grasos libres del plasma se extrajeron según la técnica de Bligh y Dyer (1959) y se cuantificaron por cromatografía en fase gaseosa como se detalla en la sección 9.

Para evaluar la función hepática se midieron los niveles de las siguientes enzimas marcadoras: aspartato aminotransferasa (método de Reitman y Frenkel), alanina aminotransferasa (método de Reitman y Frenkel), fosfatasa alcalina (método cinético) y gamma-glutamyl transpeptidasa (método cinético). Con respecto a la función renal se dosaron los niveles de creatinina y de urea plasmáticas con un método cinético y con el método de Chaney y Marbach, respectivamente.

Para la obtención de las muestras de orina, cuatro días antes de finalizar el

período experimental los animales se colocaron individualmente en jaulas metabólicas durante 48 hs. Las primeras 24 hs constituyeron un período de aclimatación luego del cual se recolectaron las muestras de orina de 24 hs que se mantuvieron a 4 °C. La creatinina y la glucosa se determinaron por el método de Jaffé utilizando un analizador de química diferenciada Alcyon 300 (Abbott). La concentración de albúmina se dosó con tiras reactivas de Micral-Test II (Boheringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) y el ionograma se realizó por el método de ión selectivo ISE. El aclaramiento de creatinina (Ccr), una medida de la tasa de filtración glomerular, se calculó con la fórmula:

$$\text{Ccr (ml/min)} = \frac{\text{creatinina en orina (mg/l)} \times \text{volumen de orina (ml en 24hs)} \times 1000 \text{ g}}{\text{creatinina en plasma (mg/l)} \times \text{peso corporal (g)} \times 1440 \text{ min}}$$

6. Estudios histopatológicos

Las muestras de los distintos órganos extraídos se fijaron durante toda la noche por inmersión en formaldehído al 10 % en un buffer fosfato salino. Luego del proceso de lavado y deshidratación, los tejidos se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm en un micrótomó Leica RM 2145. Los cortes seriados se tiñeron con hematoxilina y eosina y se analizaron en un microscopio Olympus BX 51 equipado con una cámara digital Olympus C-7070 y acoplado a una placa capturadora de video GForce 6400. El área glomerular se calculó mediante el empleo del software NIS-Elements Basic Research 2.1 (NIKON).

7. Determinación de la actividad de enzimas del metabolismo lipídico

7.1. Obtención de fracciones subcelulares de hígado de rata

Las fracciones microsomal y citosólica se obtuvieron siguiendo la técnica descrita por Kleinsek y col. (1981). Los hígados se homogeneizaron 30 segundos (10 golpes) en un tubo Potter-Elvehjem con émbolo de vidrio empleando buffer fosfato potasio 50 mM, pH 7 que contiene 0,2 M sacarosa y 2 mM ditioneitol (DTT) (2 ml de buffer/g de tejido). Se centrifugó a 15.000 x *g* durante 10 min y el sobrenadante post-mitocondrial obtenido se centrifugó a 100.000 x *g* durante 75 min. Se obtuvieron así el pellet microsomal y el sobrenadante post-microsomal. Los microsomas se lavaron por resuspensión en el buffer de homogeneización complementado con 50 mM EDTA (1 ml/g tejido) y centrifugación a 100.000 x *g* durante 60 min. El pellet microsomal y la fracción citosólica se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Todos los pasos experimentales descritos se realizaron a 4 °C.

7.2. Actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa

Como ya se mencionó, esta enzima que interviene en la biosíntesis del colesterol, cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato y su actividad se determinó en la preparación microsomal de hígado siguiendo el método de Kleinsek y col. (1981). La mezcla de reacción contenía 50 μ moles de buffer fosfato potasio (pH 7), 2 μ moles de DTT, 0,3 μ moles NADPH (Sigma), 0,15

µmoles DL- HMG-CoA (Sigma) y la fuente enzimática (400 µg de proteínas) en un volumen total de 0,5 ml. Esta mezcla, sin el sustrato, se preincubó durante 5 min a 37 °C. El ensayo para la actividad enzimática comenzó con el agregado de HMG-CoA y la disminución de la absorbancia producida por la oxidación del NADPH se midió a 340 nm a distintos intervalos durante un período total de 5 min.

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que oxida 1 nmol de NADPH por min a 37 °C en las condiciones experimentales detalladas. La actividad específica se expresa en unidades de actividad por mg de proteína (U/mg proteína).

7.3. Actividad de la enzima ácido graso sintasa

La ácido graso sintasa constituye un complejo multienzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos. Su actividad se midió en la fracción citosólica, obtenida como se detalló en el punto 7.1, según el método espectrofotométrico de Nepokroeff y col. (1975). La mezcla de reacción (volumen total 1 ml, pH final 7) consistió en 500 µmoles de buffer fosfato potasio, 33 nmoles de acetil-CoA (Sigma), 100 nmoles de malonil-CoA (Sigma), 100 nmoles NADPH (Sigma), 1 µmol EDTA, 1 µmol β-mercaptoetanol y la fuente enzimática (100 µg de proteínas). Para maximizar la actividad enzimática, la fuente de enzima se preincubó en buffer fosfato potasio 500 mM, pH 7 y DTT 5 mM, a 37 °C durante 15 min. La mezcla de sustratos, sin la enzima, se preincubó

a 30 °C durante 5 min. La reacción se inició por la adición de la fuente enzimática a la mezcla de sustratos. La disminución de la absorbancia producida por la oxidación del NADPH se registró a 340 nm durante un período total de 5 min.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para sintetizar 1 nmol de ácido palmítico (equivalente a la oxidación de 14 nmoles de NADPH) bajo las condiciones mencionadas. La actividad específica se expresa en unidades de actividad por mg de proteína (U/mg proteína).

8. *Cuantificación de las proteínas*

Se llevó a cabo por el método colorimétrico de Lowry y col. (1951), previa eliminación de los restos de los solventes orgánicos en el caso de los estudios lipídicos. Las proteínas se solubilizaron en NaOH 0,1 N que brinda el medio alcalino necesario para que ocurra la reacción de color. La técnica combina la reacción del método de determinación de proteínas de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, de color amarillo) por la oxidación de tirosina, triptofano, cisteína y cistina de las cadenas polipeptídicas. Los quelatos de cobre en la estructura del péptido facilitan la transferencia de electrones de los grupos funcionales amino al cromóforo ácido. El proceso de oxido-reducción se visualiza por la aparición de un color azul característico.

A los 30 min de iniciada la reacción, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm. En paralelo se realizó una curva de calibrado utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml en NaOH 0,1 N; Sigma) como estándar.

9. Análisis lipídico

9.1. Extracción de los lípidos

Para analizar los lípidos de hígado y de riñón y también de las harinas de la planta se siguió el método de Folch y col. (1957) que posibilita una buena extracción de estos compuestos y al mismo tiempo detiene todos los procesos enzimáticos por desnaturalización de las proteínas. Las muestras se homogenizaron con cloroformo - metanol (C:M) (2:1, v/v) (20 ml/g de tejido). El extracto se centrifugó 10 minutos a baja velocidad y el precipitado se lavó dos veces con igual proporción de solventes con el fin de obtener una mejor extracción. Luego se particionó con una solución de KCl 0,88 %. La fase inferior se lavó tres veces con fase superior teórica (C:M:KCl 0,74 %; 3:48:47, v/v/v). La fase clorofórmica, que contiene los lípidos, se evaporó a sequedad bajo nitrógeno a una temperatura no mayor de 50 °C y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1,v/v). Las muestras se mantuvieron a 4 °C en atmósfera de N₂ hasta su utilización.

Con respecto a los ácidos grasos libres del plasma, la extracción se realizó según la técnica de Bligh y Dyer (1959) que se emplea en el caso de muestras

acuosas. Se utilizó C:M (1:2, v/v) en un volumen adecuado para llegar a la proporción H₂O:C:M (1,8:2:2, v/v/v). Los tubos se agitaron y se centrifugaron a baja velocidad durante 5 min. Se obtuvieron dos fases, una superior acuosa y una inferior orgánica, quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase. La fase superior y las proteínas se descartaron y la fase orgánica se lavó con un volumen igual al descartado de fase superior teórica compuesta por C:M: KCl 0,1 M (3:47:48, v/v/v). Finalmente, la fase orgánica se llevó a sequedad bajo atmósfera de N₂ y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1, v/v). Las muestras se mantuvieron a 4 °C en atmósfera de N₂ hasta su utilización.

9.2. Aislamiento cromatográfico de los lípidos

Los lípidos polares se aislaron por cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional utilizando placas preparadas con sílica gel H (Kieselgel 60 H, Merck) y acetato de magnesio al 3 % (p/v) previamente activadas a 100 °C durante una hora. Se empleó el sistema de solventes de Rouser y col. (1970) que en la primera dimensión consiste en cloroformo - metanol - amoníaco (65:25:5, v/v/v) y en la segunda dimensión utiliza cloroformo - acetona - metanol - ácido acético - agua (30:40:10:10:4, v/v/v/v/v). Entre ambas corridas cromatográficas las placas se secaron con una corriente de aire frío.

Los lípidos neutros se separaron por TLC monodimensional en placas de sílica gel G (Kieselgel 60 G, Merck) activadas a 100 °C durante 50 minutos. Se utilizó como sistema de solventes hexano - éter etílico - ácido acético (80:20:1,

v/v/v) que retiene los fosfolípidos en la línea de siembra. Se raspó la zona correspondiente a cada lípido neutro. Los diacilglicéridos y el colesterol no se resolvieron bien con este sistema de solventes y por este motivo la zona de la placa se raspó, se eluyó con la mezcla de solventes de Arvidson (1968) y el extracto lipídico resultante se corrió nuevamente por TLC monodimensional utilizando diclorometano - éter (95:5, v/v) que permitió una buena separación de ambas fracciones lipídicas.

La ubicación de los lípidos en las placas se visualizó por exposición a vapores de yodo salvo en los casos de un posterior análisis por cromatografía en fase gaseosa en los que el revelado se realizó con 2'-7'-diclorofluoresceína al 0,2 % en metanol destilado y las manchas se observaron bajo luz ultravioleta. En ambas situaciones, las manchas lipídicas se identificaron por comparación con estándares.

9.3. Metanólisis de los lípidos

La metanólisis es un proceso que permite hidrolizar y subsecuentemente derivatizar los ácidos grasos a metil ésteres que son volátiles a la temperatura de las columnas cromatográficas en las cuales se los separa. Para llevarla a cabo se siguió la técnica descrita por Morrison y Smith (1964). Los lípidos neutros se separaron cromatográficamente y las manchas correspondientes, reveladas con diclorofluoresceína, se rasparon a tubos especiales con tapa a rosca recubierta de Teflon[®]. A cada tubo se le agregó 1 ml de BF₃ (Sigma) y 100 µl de

cloroformo, se gaseó con N₂, se cerró herméticamente y se colocó en una estufa a 45 °C durante 24 h. Se agregaron dos volúmenes de hexano y un volumen de agua, se agitó con vortex y se centrifugó 10 min a 900 x *g*. Este procedimiento se repitió dos veces y los metil ésteres se recuperaron en la fase superior. Luego se purificaron cromatográficamente usando como sistema de desarrollo hexano - éter etílico (95:5, v/v) en placas de sílica gel G (Kieselgel 60 G, Merck) prelavadas con metanol - éter etílico (75:25, v/v), secadas con aire tibio y activadas 15 min en estufa a 100 °C. Los metil ésteres se localizaron bajo luz ultravioleta luego del rociado con diclorofluoresceína y se eluyeron de la sílica con una mezcla de agua – metanol - hexano (1:1:1, v/v/v).

9.4. Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa

Para la separación e identificación de los metil ésteres de ácidos grasos se empleó un cromatógrafo de reparto gas-líquido con temperatura programada (Varian 3700) equipado con 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar, 10 % SP2330 sobre Chromosorb WAW 100/120 (Supelco, Bellefonte, PA), y conectadas a dos detectores de ionización de llama de hidrógeno operados en el modo dual-diferencial desde el electrómetro. El N₂ usado como gas transportador (fase móvil, 30 ml/min) y el aire fueron provistos por cilindros comerciales. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C y 230 °C,

respectivamente. Las separaciones se realizaron con un programa de temperatura lineal (5 °C/min) partiendo de una temperatura inicial de 150 °C hasta llegar a una temperatura final de 230 °C que se mantuvo constante durante el tiempo necesario para lograr la elución completa de las muestras.

Los metil ésteres se identificaron por sus tiempos de retención de acuerdo con el número de átomos de carbono y de dobles ligaduras y por comparación con corridas cromatográficas de mezclas de estándares. Se utilizó como estándar interno el ácido eneicosanoico (21:0) que no está presente en las muestras a analizar y que se agregó en una etapa previa a la metanólisis con el fin de someterlo al mismo protocolo experimental. El contenido de los distintos metil ésteres se calculó por comparación de las áreas de sus picos con la correspondiente al estándar interno. La cuantificación se realizó por integración electrónica (Varian Star Chromatography Workstation, versión 4,51).

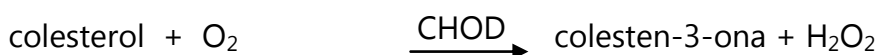
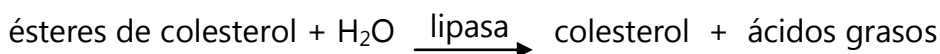
Durante todos los procedimientos detallados, los lípidos se mantuvieron en una atmósfera de N₂ y se emplearon solventes orgánicos de calidad HPLC (high pressure liquid chromatography) (JT Baker, Phillipsburg, NJ o UVE).

9.5. Determinación de colesterol total

La determinación del colesterol total (libre más esterificado) en los extractos lipídicos de hígado y de riñón se llevó a cabo utilizando el kit Colestat enzimático (Wiener). Las alícuotas del extracto lipídico se llevaron a sequedad bajo N₂, se resuspendieron en un volumen adecuado de alcohol isopropílico

(0,1-1,0 ml/mg de proteínas) y se agitaron vigorosamente con vortex (Heider y Boyett, 1978). Se combinaron 2 ml del Reactivo de Trabajo [lipasa fungal 6000 U/l, colesterol oxidasa (CHOD) 60 U/l, peroxidasa (POD) 400 U/l, 4-aminofenazona (4-AF) 1,25 mmol/l, fenol 2,75 mmol/l, pH 7,4] con 20 μ l del extracto de alcohol isopropílico y se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) por 30 min. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 505 nm y se comparó con un estándar.

Este método se fundamenta en la siguiente secuencia de reacciones:



9.6. Determinación de fósforo fosfolipídico

Se realizó por el método de Rouser y col. (1970). Los fosfolípidos individuales aislados cromatográficamente se rasparon de las placas y la materia orgánica se digirió a 180 °C utilizando ácido perclórico al 70 %. El método colorimétrico se fundamenta en la cuantificación del fosfato inorgánico liberado por la digestión ácida y consiste en emplear ácido ascórbico como reductor y medir la absorbancia dada por los óxidos de molibdeno (azules) formados a partir del fosfomolibdato de amonio. Las muestras con los reactivos se calentaron durante 5 min en un baño de agua a 100 °C y se leyeron contra el blanco de reacción en un espectrofotómetro a 800 nm. En el caso de la

determinación de fósforo total se tomaron alícuotas de los extractos lipídicos y, una vez evaporados los solventes, se siguió el mismo procedimiento a partir de la digestión con el ácido perclórico.

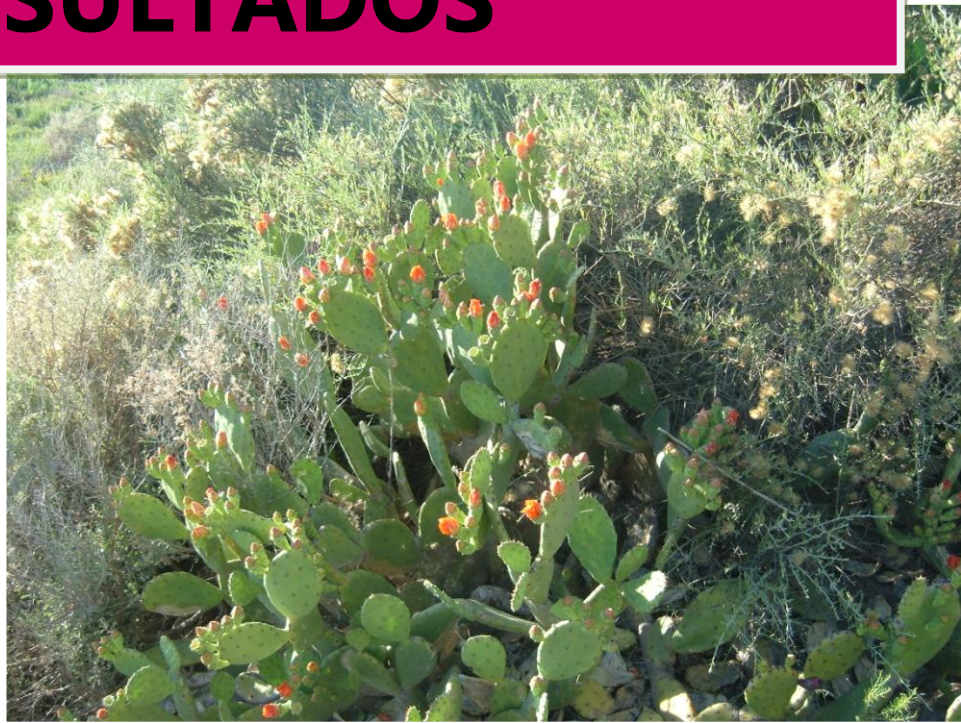
El fósforo inorgánico se calculó por comparación con una curva estándar realizada con una solución de KH_2PO_4 de 80 $\mu\text{g/ml}$ ó de 8 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de utilizar el micrométodo. Este último se adaptó del original (Rouser y col., 1970) introduciendo solamente modificaciones en las concentraciones de los reactivos y se empleó solo para la cuantificación de ácido fosfatídico.

10. Análisis estadístico

Se utilizó el software InfoStat (Versión 2008). El Análisis de la Varianza (ANOVA) se empleó para determinar diferencias entre los valores medios de varias poblaciones estadísticas. En los estudios de toxicidad aguda y sub-aguda se llevó a cabo un ANOVA en bloques mientras que en los ensayos de tolerancia a la glucosa y de diabetes se realizó un ANOVA completamente aleatorizado. Los valores medios se compararon mediante la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni. También se empleó la prueba *post hoc* de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher. En ambos casos, las letras (a-b-c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. Para comparar dos valores medios se utilizó la prueba t de *Student* y los asteriscos indican diferencias significativas (* $p \leq 0,05$) o muy significativas (** $p \leq 0,01$) entre los grupos. Los valores representados corresponden a la media \pm desvío

estándar (SD). El número total de muestras se indica en la leyenda de cada figura o tabla.

RESULTADOS



CAPÍTULO I

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE

Opuntia megapotamica

Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio indicaron que el consumo de las harinas de cladodios, de pulpa de frutos y de semillas de *Opuntia megapotamica* no altera el estado general de los animales lo que sugiere una buena tolerancia a la planta.

Sin embargo, para evaluar realmente la inocuidad de las distintas partes de la planta se consideró necesario llevar a cabo estudios toxicológicos completos cuyos resultados se describen en este capítulo. Es conveniente tener en cuenta que las dosis que se administraron en estos estudios son muy superiores a las que se emplean en otras especies de *Opuntia* con fines nutricionales y/o terapéuticos.

1.1. Estudio de la toxicidad aguda

Se les administró a los animales una única dosis máxima (2000 mg/kg PC) de las distintas harinas de *Opuntia megapotamica* por separado y se los controló durante 14 días.

No se observaron signos de agonía ni mortalidad y el comportamiento grupal e individual de los animales fue normal. Tampoco se observaron otros efectos tóxicos como pérdida de pelo, petequias en la piel y/o alteraciones gastrointestinales. Las mucosas, el abdomen y la genitalia externa presentaron un aspecto normal. No se registraron variaciones en el peso corporal de los animales (*Figura 4*).

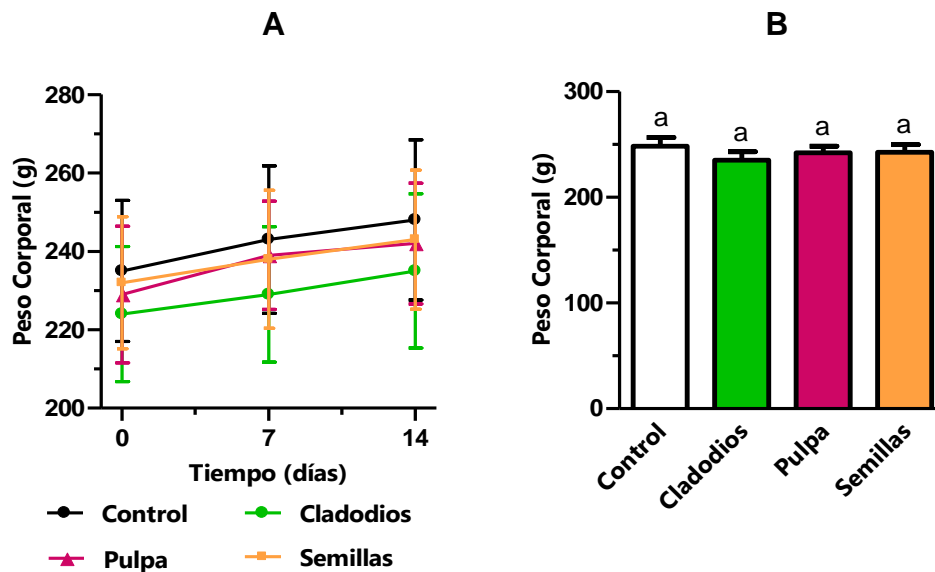


Figura 4. Efectos de la exposición aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso corporal durante los tratamientos (A) y al finalizar el período experimental (B). Los valores representan la media \pm SD de seis muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica, medidos al final del período experimental, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos analizados (*Tabla 1*). Así, los valores de glucemia, los indicadores de funcionalidad renal (creatinina y urea) y las enzimas marcadoras hepáticas no mostraron variaciones.

En cuanto a los niveles de los lípidos y de las lipoproteínas del plasma, no se encontraron variaciones estadísticamente significativas entre los animales expuestos a la planta y los controles (*Figura 5*). Cuando se compararon los distintos tratamientos entre sí, las disminuciones en colesterol total ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de Bonferroni), LDL-c ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de DMS

Fisher) y riesgo aterogénico ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de DMS Fisher) fueron estadísticamente significativas en los animales tratados con la harina de semillas en comparación con aquellos a los que se les suministró la harina de pulpa.

Tabla 1. Efectos de la exposición aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica

Parámetros	Control	Cladodios	Pulpa	Semillas
<i>HEMATOLOGÍA</i>				
Eritrocitos (M/mm ³)	6,49 ± 0,24 a	6,41 ± 0,53 a	6,24 ± 0,27 a	6,63 ± 0,37 a
Hemoglobina (g/dl)	13,45 ± 0,52 a	13,33 ± 0,96 a	13,15 ± 0,64 a	13,91 ± 0,66 a
Hematocrito (%)	47,00 ± 2,36 a	46,33 ± 3,14 a	45,83 ± 1,83 a	48,5 ± 1,38 a
VCM (fl)	54,83 ± 1,47 a	54,66 ± 1,03 a	54,83 ± 0,75 a	55,16 ± 1,60 a
HCM (pg)	20,72 ± 0,29 a	20,80 ± 0,44 a	21,06 ± 0,31 a	21,00 ± 0,37 a
CHCM (g/dl)	37,80 ± 0,84 a	38,08 ± 0,92 a	38,41 ± 0,57 a	38,06 ± 0,59 a
Plaquetas (K/mm ³)	904,50 ± 66,48 a	905,16 ± 83,65 a	919,33 ± 66,58 a	966,50 ± 23,09 a
Leucocitos (K/mm ³)	11,60 ± 2,15 a	8,40 ± 3,18 a	10,22 ± 4,04 a	9,48 ± 2,84 a
<i>BIOQUÍMICA CLÍNICA</i>				
Glucosa (mg/dl)	105,20 ± 5,38 a	100,80 ± 8,44 a	103,60 ± 4,58 a	107,80 ± 10,70 a
Creatinina (mg/l)	5,63 ± 0,57 a	6,01 ± 0,44 a	5,95 ± 0,59 a	5,96 ± 1,06 a
Urea (g/l)	0,43 ± 0,05 a	0,45 ± 0,07 a	0,45 ± 0,06 a	0,45 ± 0,05 a
ALT (U/l)	46,66 ± 6,15 a	42,16 ± 4,66 a	46,50 ± 7,31 a	49,50 ± 8,26 a
AST (U/l)	105,80 ± 10,06 a	103,33 ± 24,47 a	126,80 ± 44,48 a	126,80 ± 42,15 a
ALP (U/l)	338,50 ± 61,66 a	315,66 ± 68,24 a	299,33 ± 87,51 a	283,16 ± 84,98 a
GGT (U/l)	1,60 ± 0,55 a	1,60 ± 0,55 a	1,33 ± 0,52 a	1,50 ± 0,55 a
Proteínas Totales (g/dl)	7,65 ± 0,37 a	7,60 ± 0,50 a	7,61 ± 0,33 a	7,50 ± 0,49 a
Albúmina (g %)	2,82 ± 0,16 a	2,83 ± 0,15 a	2,83 ± 0,18 a	2,84 ± 0,12 a
<i>TIEMPO DE COAGULACIÓN</i>				
Tiempo de Protrombina (s)	8,82 ± 0,18 a	9,15 ± 0,58 a	8,55 ± 0,86 a	8,46 ± 0,51 a
KPTT (s)	20,72 ± 3,88 a	19 ± 2,09 a	20,50 ± 1,61 a	21,60 ± 3,58 a

Los valores representan la media ± SD de seis muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina; ALP: fosfatasa alcalina; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamil transferasa; KPTT: Tiempo de tromboplastina parcial.

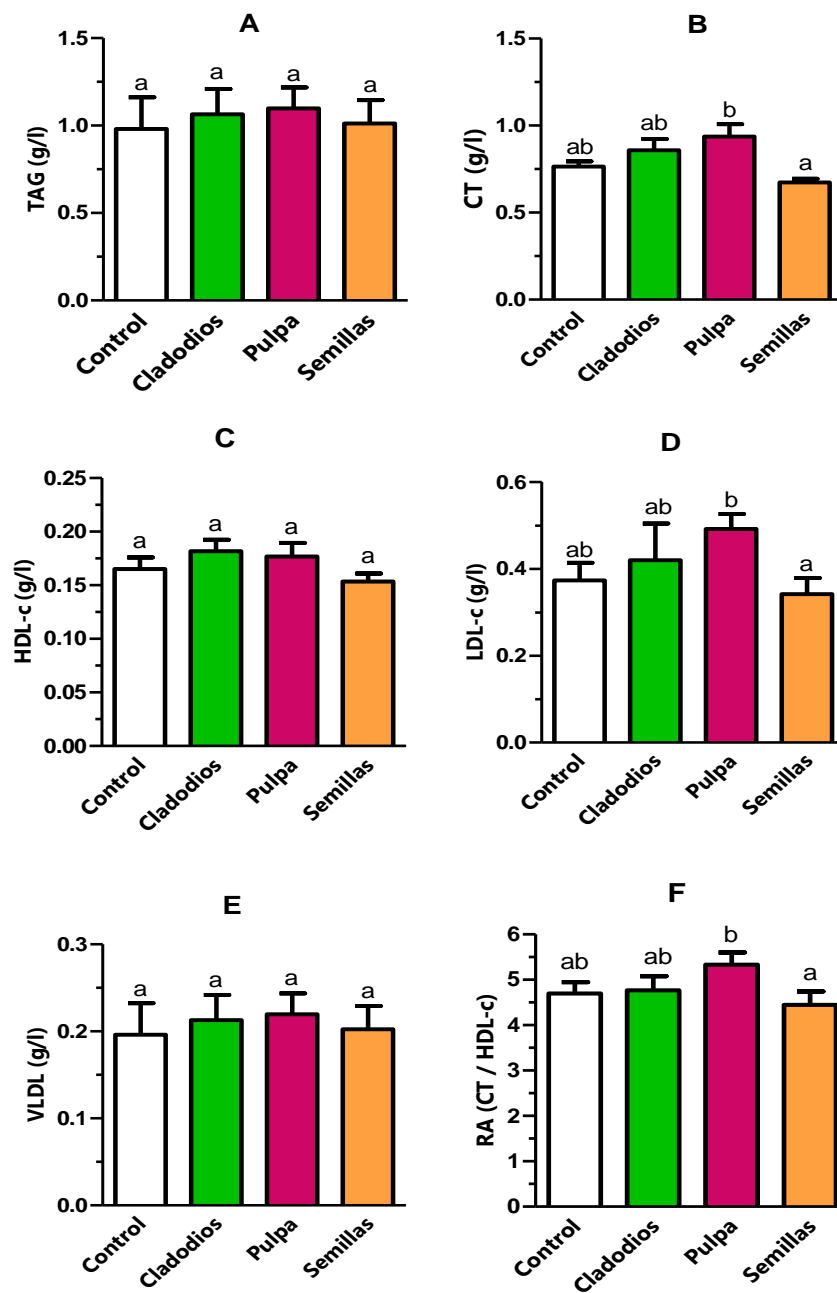


Figura 5. Efectos de la exposición aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de lípidos y de lipoproteínas plasmáticos. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. En los casos de LDL-c y RA se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente con la prueba *post hoc* de DMS Fisher cuyas letras se muestran en la figura. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). TAG: triacilglicéridos; CT: colesterol total; RA: riesgo aterogénico.

Como se indicó en Materiales y Métodos, al finalizar el período experimental se realizó una necropsia detallada de todos los animales y se extrajeron quirúrgicamente hígado, riñón, páncreas, bazo, estómago, intestino delgado (duodeno e íleon) e intestino grueso (colon) para los estudios histopatológicos.

Desde el punto de vista macroscópico, no se encontraron lesiones, hemorragias ni alteraciones en el color en ninguno de los órganos examinados y no se observó la presencia de gases intestinales. Es decir que la exposición a las distintas harinas de *Opuntia megapotamica* no se tradujo en alteraciones orgánicas morfológicas.

La determinación de los pesos absolutos y relativos y de los tamaños de los distintos órganos se muestra en la *Tabla 2*. Como se puede observar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales control y los tratados con la planta.

Tabla 2. Efectos de la exposición aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso y el tamaño de los órganos

	Control		Cladodios		Pulpa		Semillas	
<i>PESO (g)</i>								
Hígado	10,42 ± 1,64	a	9,82 ± 1,35	a	10,06 ± 0,78	a	10,16 ± 1,03	a
Riñones	2,16 ± 0,37	a	2,00 ± 0,27	a	2,04 ± 0,09	a	2,08 ± 0,22	a
Bazo	0,49 ± 0,07	a	0,45 ± 0,03	a	0,48 ± 0,05	a	0,39 ± 0,19	a
Páncreas	0,64 ± 0,15	a	0,63 ± 0,06	a	0,62 ± 0,10	a	0,70 ± 0,20	a
<i>PESO RELATIVO (g/100 g PC)</i>								
Hígado	4,19 ± 0,50	a	4,17 ± 0,35	a	4,17 ± 0,39	a	4,20 ± 0,49	a
Riñones	0,87 ± 0,11	a	0,85 ± 0,07	a	0,85 ± 0,08	a	0,86 ± 0,09	a
Bazo	0,20 ± 0,02	a	0,19 ± 0,02	a	0,20 ± 0,02	a	0,19 ± 0,02	a
Páncreas	0,26 ± 0,06	a	0,27 ± 0,03	a	0,26 ± 0,04	a	0,28 ± 0,06	a
<i>TAMAÑO (cm)</i>								
Bazo (largo)	3,05 ± 0,30	a	2,81 ± 0,13	a	2,95 ± 0,24	a	2,88 ± 0,11	a
Bazo (ancho)	0,69 ± 0,08	a	0,68 ± 0,04	a	0,72 ± 0,05	a	0,67 ± 0,04	a
Riñón(largo)	1,68 ± 0,11	a	1,61 ± 0,14	a	1,68 ± 0,11	a	1,62 ± 0,06	a
Riñón (ancho)	0,87 ± 0,12	a	0,88 ± 0,13	a	0,92 ± 0,08	a	0,96 ± 0,12	a
Estómago (largo)	2,11 ± 0,36	a	2,28 ± 0,27	a	2,02 ± 0,31	a	2,24 ± 0,26	a
Estómago (ancho)	1,12 ± 0,30	a	0,95 ± 0,20	a	0,99 ± 0,13	a	1,20 ± 0,28	a
Intestino delgado (largo)	112,67 ± 9,46	a	112,67 ± 6,19	a	112,33 ± 6,15	a	120,33 ± 9,52	a
Intestino delgado (ancho)	0,38 ± 0,10	a	0,41 ± 0,07	a	0,38 ± 0,11	a	0,36 ± 0,09	a
Ciego (largo)	2,77 ± 0,19	a	2,59 ± 0,22	a	2,65 ± 0,33	a	3,14 ± 0,31	a
Ciego (ancho)	1,37 ± 0,29	a	1,43 ± 0,32	a	1,43 ± 0,12	a	1,47 ± 0,21	a
Intestino grueso (largo)	14,17 ± 1,33	a	15,17 ± 1,94	a	15,67 ± 2,07	a	14,67 ± 1,63	a
Intestino grueso (ancho)	0,38 ± 0,15	a	0,33 ± 0,08	a	0,32 ± 0,08	a	0,36 ± 0,06	a

Los valores representan la media ± SD de seis muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los efectos de la exposición aguda a las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre la estructura microscópica de hígado se muestran en la *Figura 6*. No se encontraron depósitos de grasa, infiltrados inflamatorios ni zonas necróticas en ninguno de los animales sometidos a las distintas situaciones experimentales. En los cortes de hígado de algunas ratas expuestas a la harina de semillas se evidenció una leve dilatación sinusoidal, la presencia de microvacuolas y una balonización (degeneración vesicular hidrópica) incipiente de los hepatocitos.

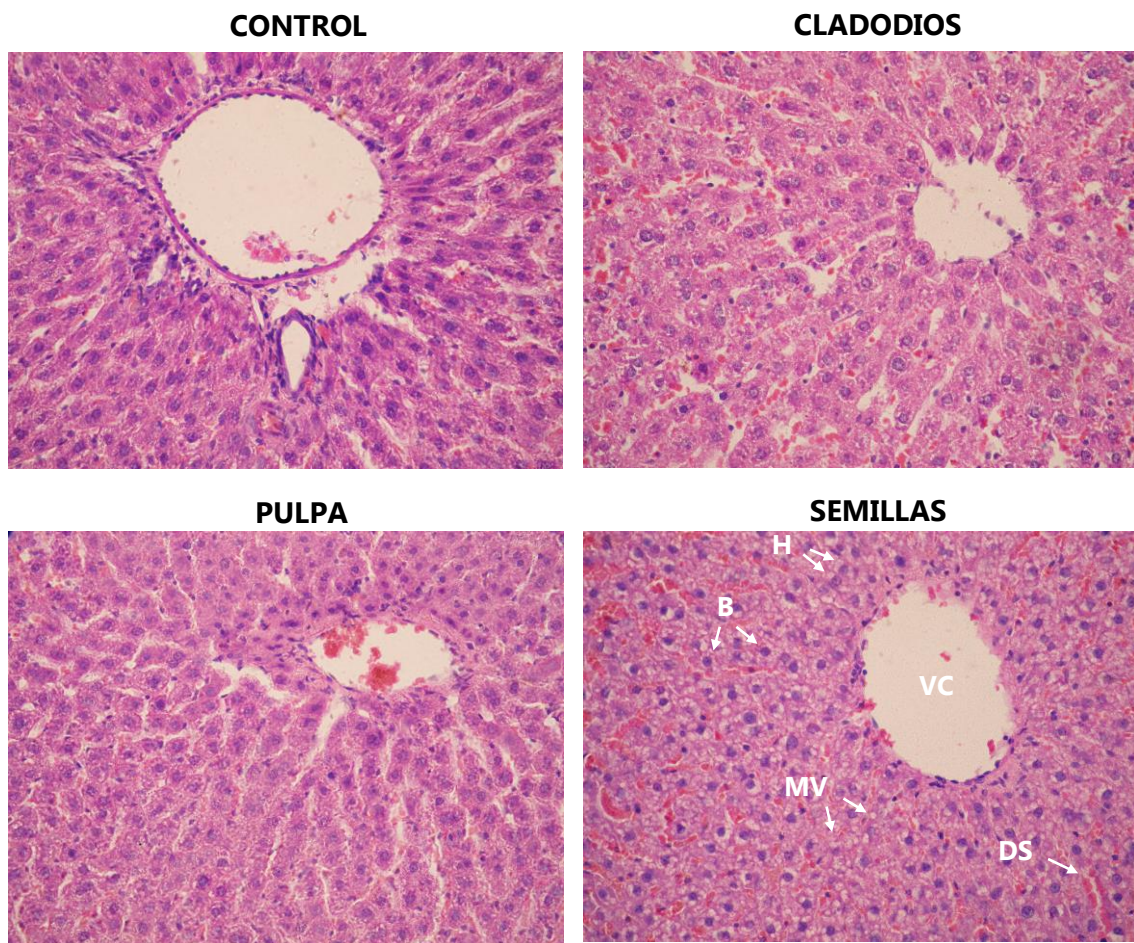


Figura 6. Fotomicrografías (400X) de secciones de hígado de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μ m de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina. B: balonización; DS: dilatación sinusoidal; H: hepatocito; MV: microvacuola; VC: vena central

En lo referente a riñón, la administración de las distintas partes de la planta no produjo alteraciones a nivel glomerular (*Figura 7*). En el caso de la harina de cladodios se observó una degeneración hidrópica generalizada de los túbulos que se presentaron deflecados, vacuolizados y dañados en los intersticios. En cambio, con la harina de semillas este proceso de vacuolización se observó

solamente en algunos sectores del tejido y los túbulos renales mostraron menor grado de deflecación. La exposición a la harina de pulpa no generó alteraciones histológicas.

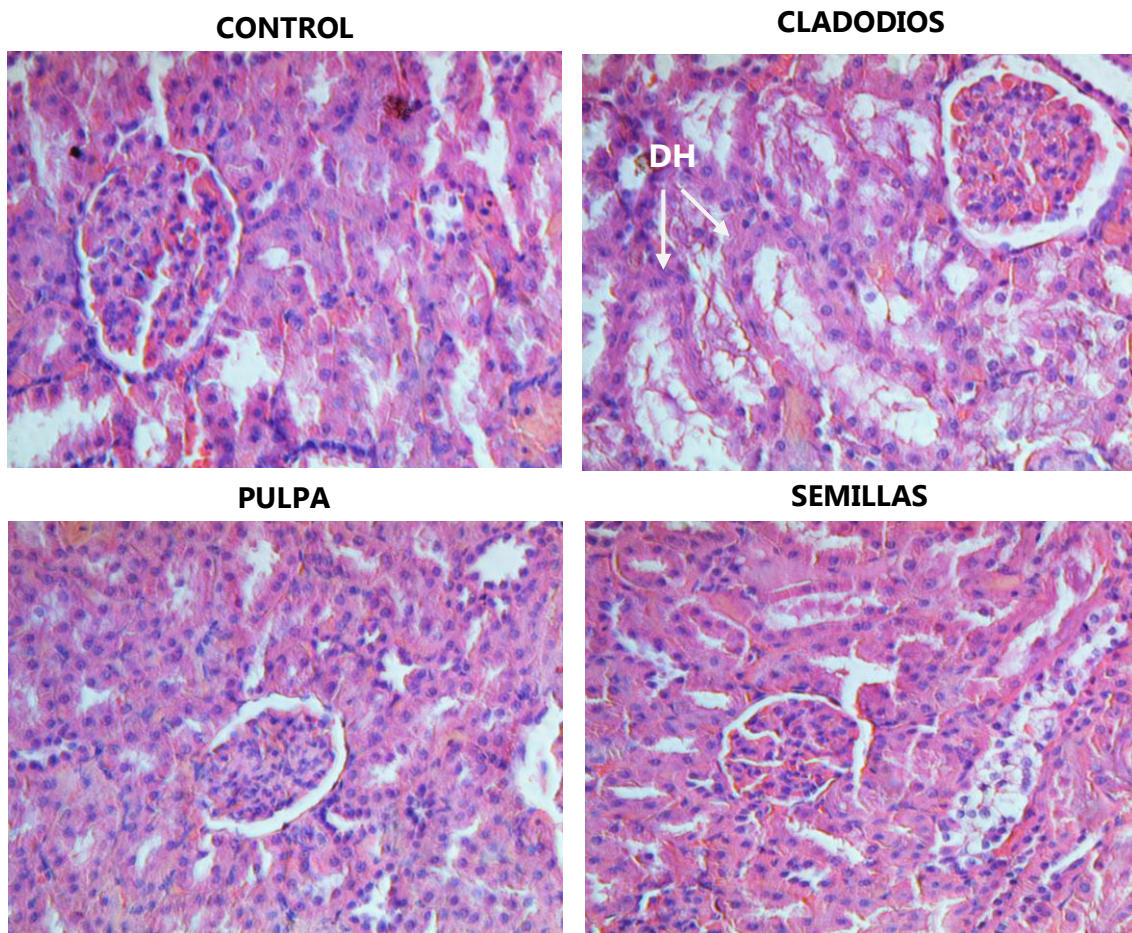


Figura 7. Fotomicrografías (400X) de secciones de riñón de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μ m de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina. DH: degeneración hidrópica.

En las *Figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13* se presentan las fotomicrografías de bazo, páncreas, estómago, duodeno, íleon y colon, respectivamente. En lo referente a estómago, se muestra solo la mucosa fúndica como representativa

de las tres mucosas gástricas. En ninguno de los tejidos analizados se encontraron alteraciones luego de la exposición aguda a las tres harinas de la planta.

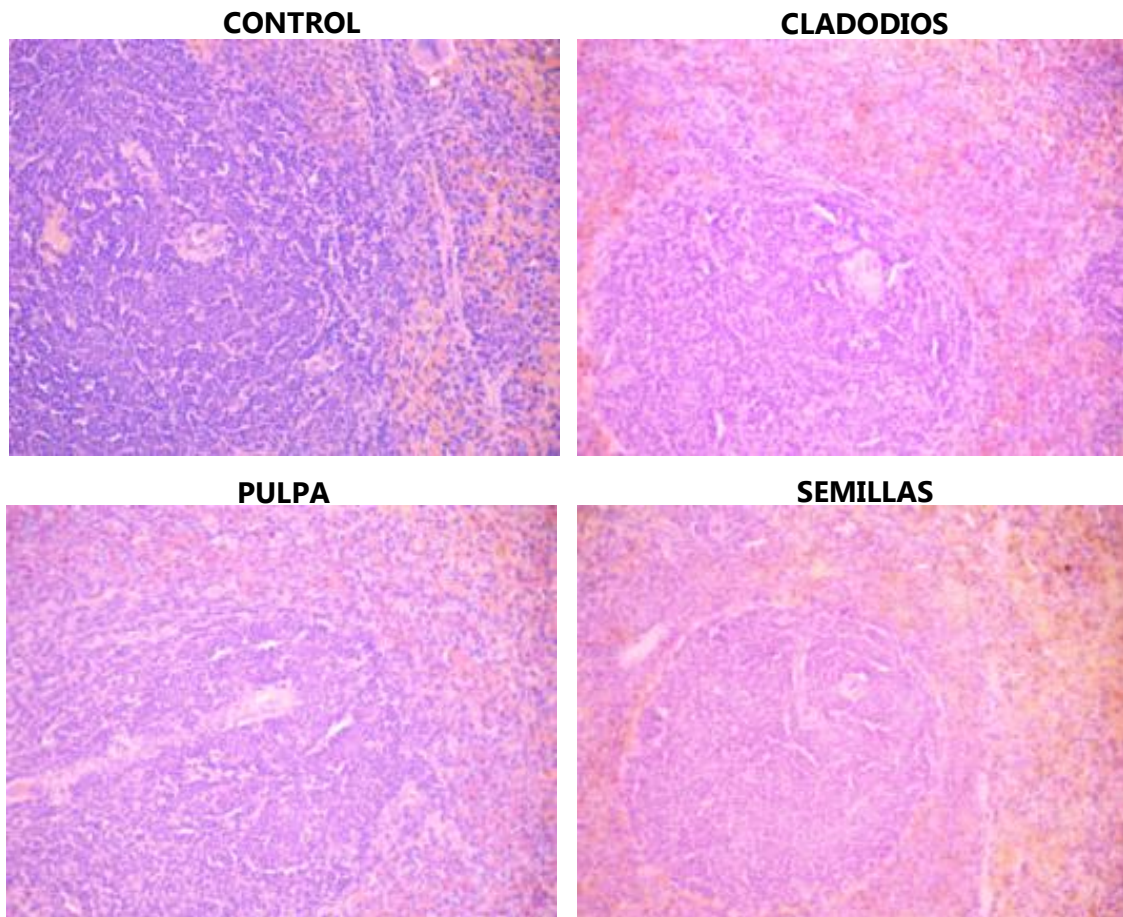


Figura 8. Fotomicrografías (400X) de secciones de bazo de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

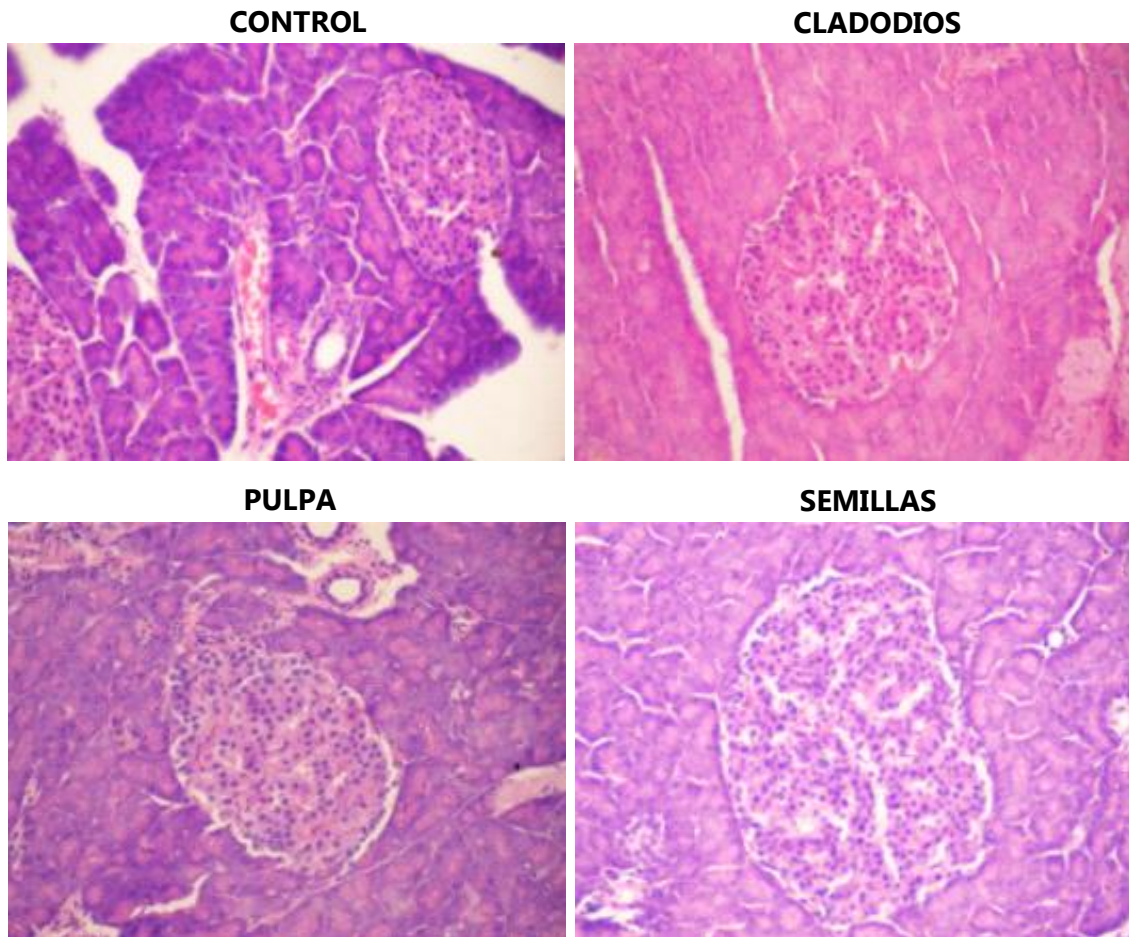


Figura 9. Fotomicrografías (400X) de secciones de páncreas de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

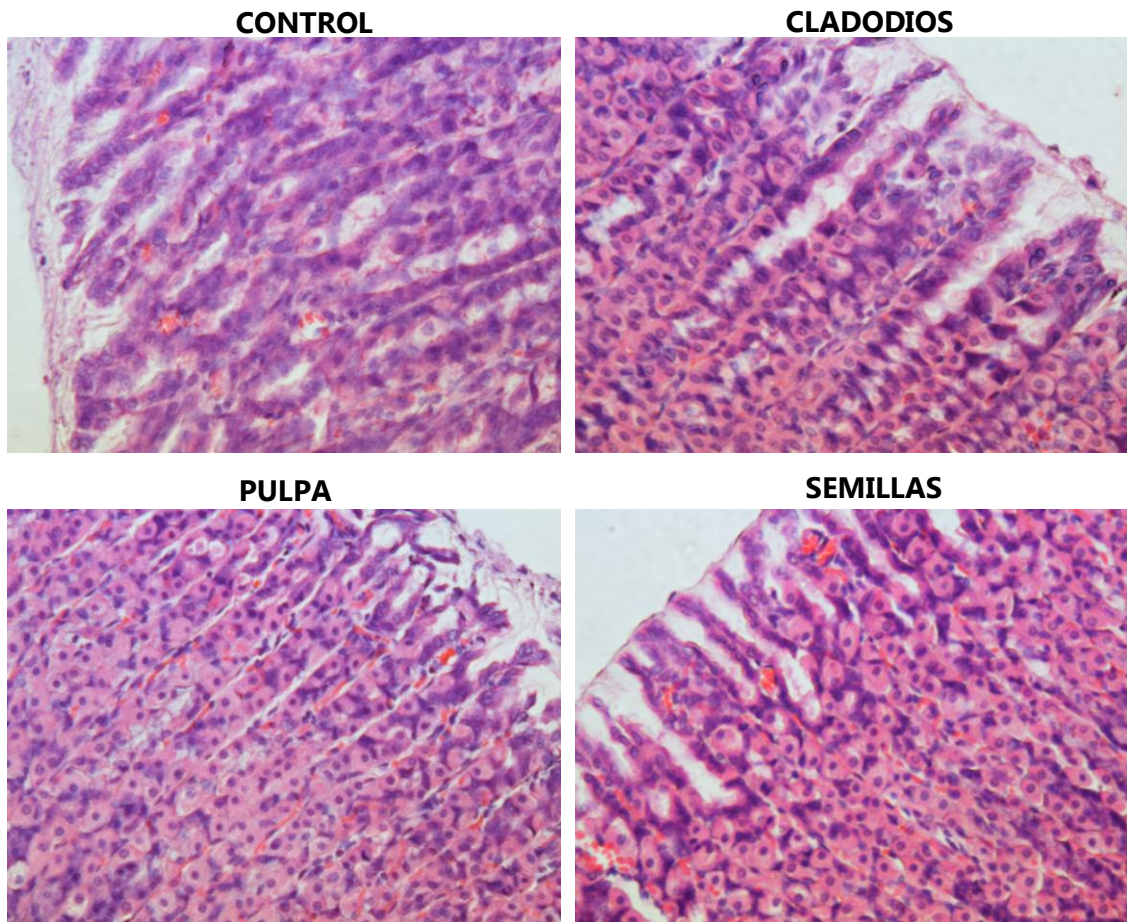


Figura 10. Fotomicrografías (400X) de secciones de estómago de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

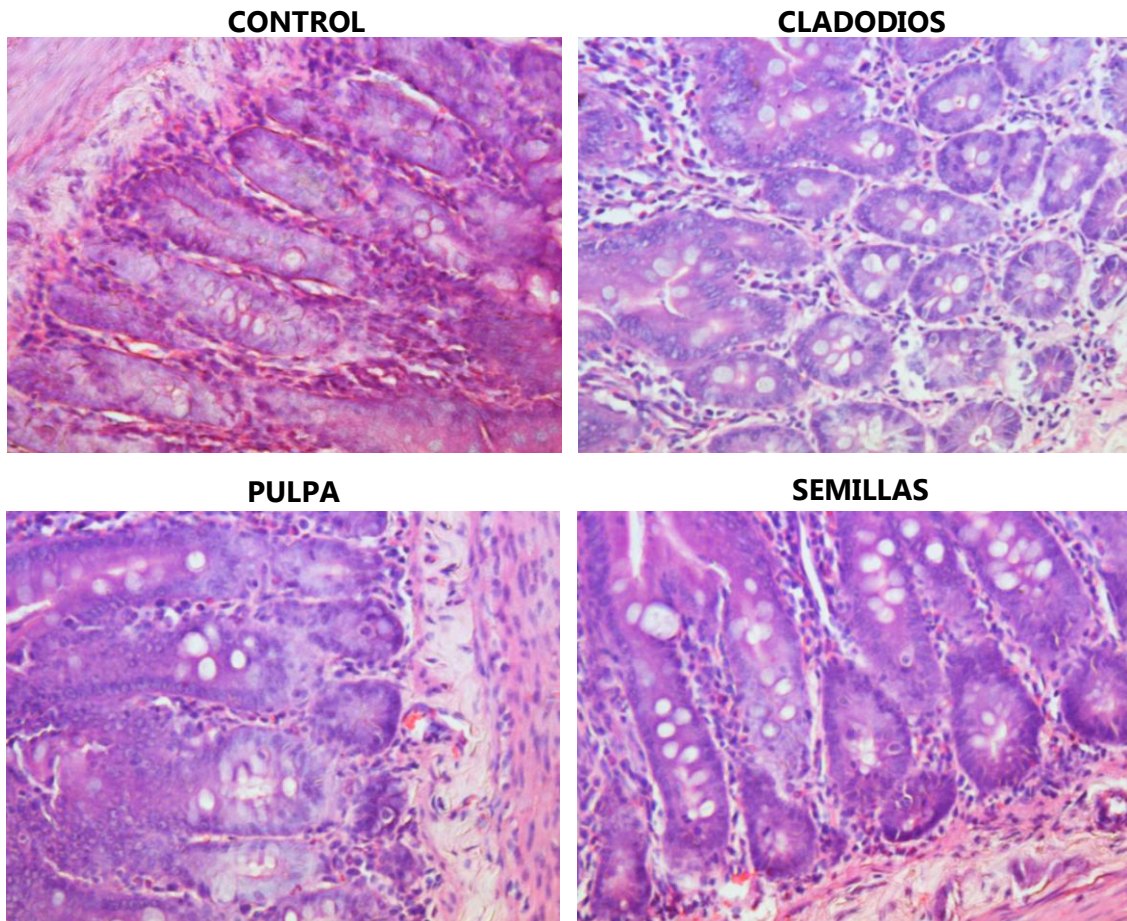


Figura 11. Fotomicrografías (400X) de secciones de duodeno de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

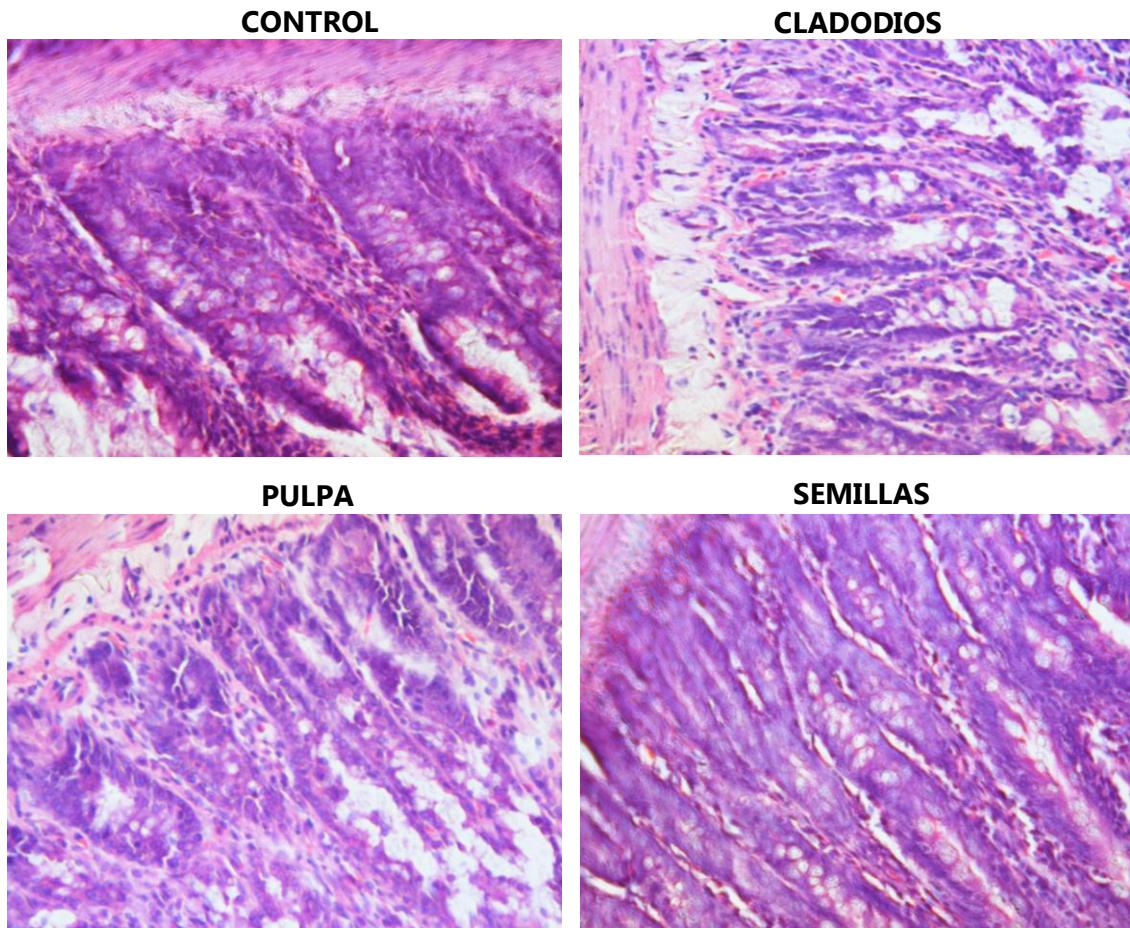


Figura 12. Fotomicrografías (400X) de secciones de íleon de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

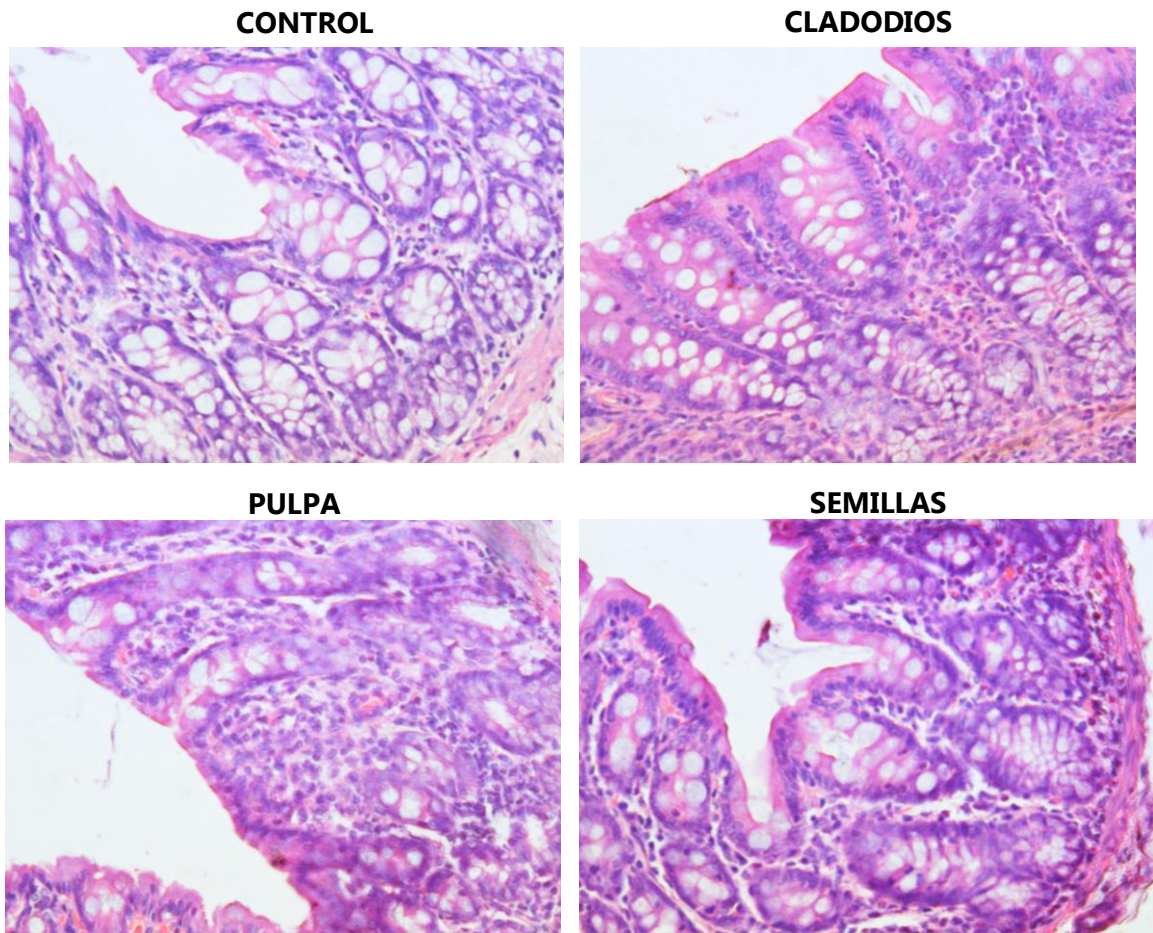


Figura 13. Fotomicrografías (400X) de secciones de colon de ratas control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

1.2. Estudio de la toxicidad sub-aguda

A las ratas hembras y machos, se les administró oralmente, como suplemento de la dieta estándar, 1000 mg/kg de PC de harina de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*, por separado, en forma diaria y por un período de 28 días. Durante los tratamientos se realizaron observaciones clínicas diarias de los animales. Al finalizar el período experimental, se llevó a cabo la eutanasia y se tomaron muestras de sangre, se efectuó una necropsia detallada y un estudio histopatológico de hígado, riñón, páncreas, bazo, estómago, intestino delgado (duodeno e íleon) e intestino grueso (colon).

La exposición sub-aguda a los tres tipos de harinas no generó señales de agonía ni mortalidad en los animales y el comportamiento grupal e individual fue normal durante el período experimental analizado. No se evidenciaron efectos tóxicos vinculados con la ingestión de la planta como caída de pelo, petequias en la piel y/o alteraciones gastrointestinales. El aspecto de las mucosas, del abdomen y de la genitalia externa fue normal.

En la *Figura 14* se muestra el efecto de la administración de la planta sobre el peso corporal de machos y hembras. En los animales controles, el peso corporal de los machos fue significativamente mayor que el de las hembras. No se observaron variaciones estadísticamente significativas en ambos sexos en función del tiempo de tratamiento y de los distintos tipos de harinas empleados.

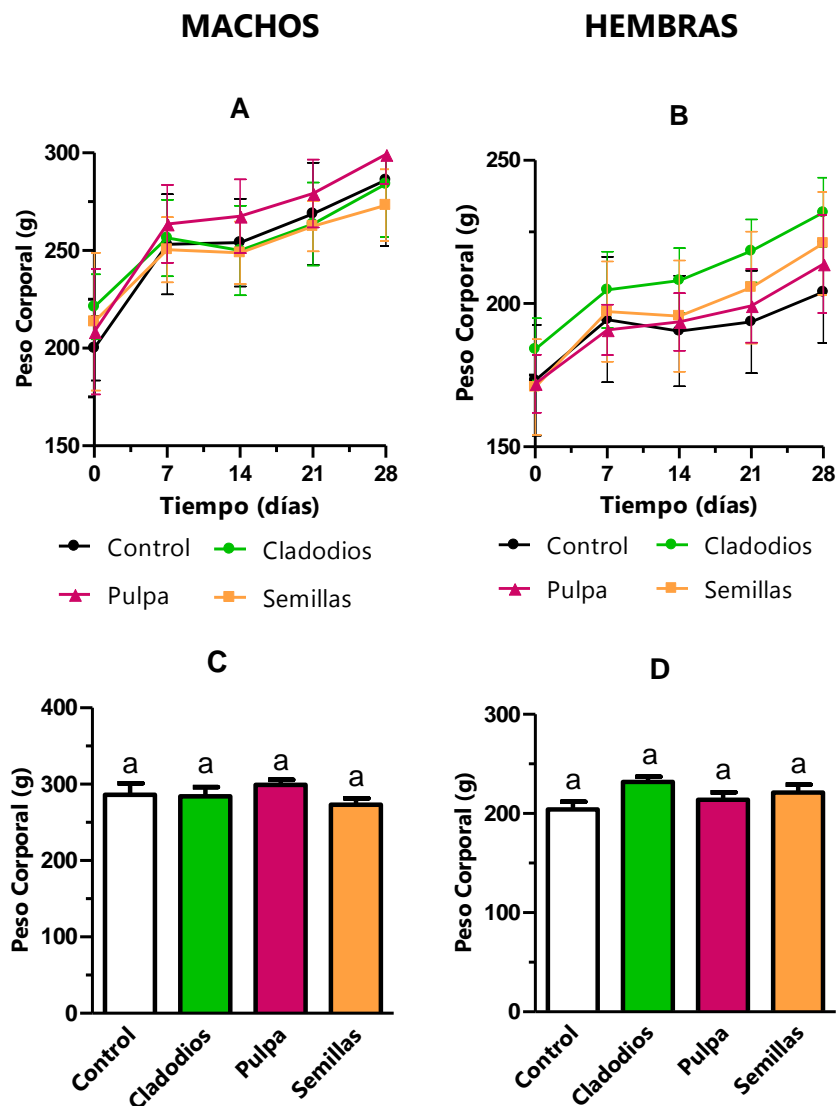


Figura 14. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso corporal de ratas machos (panel izquierdo) y de ratas hembras (panel derecho) durante los tratamientos (A y B) y al finalizar el período experimental (C y D). Los valores representan la media \pm SD de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica de las ratas machos y de las ratas hembras, al finalizar el período experimental, se presentan en las *Tablas 3* y *4*, respectivamente. Los valores de glucemia, los indicadores de funcionalidad

renal y las enzimas marcadoras hepáticas no mostraron variaciones. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales analizados. Si bien este estudio no se realizó con el propósito de evaluar el efecto hipoglucemiante de la planta, muestra que la administración oral, durante un período de 28 días, de una dosis máxima de las tres harinas de *Opuntia megapotamica* no modifica la glucemia basal en ratas normales.

Tabla 3. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica de ratas machos

Parámetros	Machos			
	Control	Cladodios	Pulpa	Semillas
<i>HEMATOLOGÍA</i>				
Eritrocitos (M/mm ³)	6,65 ± 0,43 a	6,96 ± 0,25 a	6,78 ± 0,18 a	7,15 ± 0,23 a
Hemoglobina (g/dl)	14,22 ± 0,59 a	14,26 ± 0,48 a	14,08 ± 0,37 a	14,62 ± 0,45 a
Hematocrito (%)	49,20 ± 1,46 a	50,00 ± 1,58 a	49,40 ± 1,03 a	50,20 ± 2,27 a
VCM (fl)	53,40 ± 0,98 a	53,00 ± 0,32 a	54,20 ± 0,80 a	53,00 ± 1,18 a
HCM (pg)	21,56 ± 0,92 a	20,50 ± 0,10 a	20,76 ± 0,22 a	20,44 ± 0,30 a
CHCM (g/dl)	40,58 ± 2,51 a	38,64 ± 0,16 a	38,32 ± 0,35 a	38,60 ± 0,31 a
Plaquetas (K/mm ³)	801,60 ± 82,38 a	915,00 ± 42,85 a	881,40 ± 34,37 a	940,80 ± 16,26 a
Leucocitos (K/mm ³)	13,18 ± 1,10 a	10,90 ± 1,08 a	10,84 ± 0,96 a	13,44 ± 0,93 a
<i>BIOQUÍMICA CLÍNICA</i>				
Glucosa (mg/dl)	102,80 ± 3,81 a	99,60 ± 3,56 a	108,40 ± 5,56 a	97,00 ± 3,71 a
Creatinina (mg/l)	7,44 ± 0,78 a	7,56 ± 0,77 a	7,82 ± 0,79 a	8,54 ± 0,68 a
Urea (g/l)	0,40 ± 0,03 a	0,39 ± 0,02 a	0,33 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a
ALT (U/l)	51,80 ± 5,86 a	50,00 ± 3,45 a	49,00 ± 3,33 a	43,40 ± 2,32 a
AST (U/l)	218,20 ± 52,78 a	218,20 ± 58,48 a	187,40 ± 28,38 a	151,40 ± 10,14 a
ALP (U/l)	302,60 ± 45,52 a	271,40 ± 21,28 a	329,00 ± 66,79 a	264,25 ± 27,95 a
GGT (U/l)	1,20 ± 0,20 a	1,40 ± 0,40 a	1,20 ± 0,20 a	1,60 ± 0,60 a
Amilasa (U/l)	747,40 ± 100,85 a	757,60 ± 97,17 a	662,80 ± 35,03 a	709,20 ± 84,28 a
Proteínas Totales (g/dl)	7,28 ± 0,32 a	7,20 ± 0,25 a	7,18 ± 0,34 a	7,26 ± 0,30 a
Albúmina (g %)	2,80 ± 0,04 a	2,70 ± 0,03 a	2,81 ± 0,12 a	2,85 ± 0,14 a
<i>TIEMPO DE COAGULACIÓN</i>				
Tiempo de Protrombina (s)	9,46 ± 0,77 a	9,30 ± 0,73 a	10,28 ± 1,00 a	9,06 ± 0,60 a
KPTT (s)	21,46 ± 2,66 a	20,76 ± 1,05 a	28,90 ± 5,31 a	30,8 ± 6,72 a

Los valores representan la media ± SD de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina; ALP: fosfatasa alcalina; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa; KPTT: Tiempo de tromboplastina parcial.

Tabla 4. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica de ratas hembras

Parámetros	Hembras			
	Control	Cladodios	Pulpa	Semillas
HEMATOLOGÍA				
Eritrocitos (M/mm ³)	6,41 ± 0,26 a	6,33 ± 0,18 a	6,48 ± 0,09 a	6,61 ± 0,27 a
Hemoglobina (g/dl)	13,08 ± 0,50 a	13,24 ± 0,29 a	13,38 ± 0,14 a	13,74 ± 0,47 a
Hematocrito (%)	44,40 ± 1,60 a	49,60 ± 1,69 a	47,40 ± 0,24 a	47,80 ± 1,16 a
VCM (fl)	52,40 ± 1,03 a	55,00 ± 0,32 a	54,00 ± 0,63 a	54,20 ± 0,49 a
HCM (pg)	20,42 ± 0,22 a	20,94 ± 0,16 a	20,66 ± 0,14 a	20,82 ± 0,22 a
CHCM (g/dl)	38,98 ± 0,46 a	38,10 ± 0,31 a	38,24 ± 0,25 a	38,40 ± 0,08 a
Plaquetas (K/mm ³)	932,60 ± 27,65 a	943,00 ± 38,19 a	845,40 ± 133,88 a	945,00 ± 40,46 a
Leucocitos (K/mm ³)	9,12 ± 1,38 a	9,76 ± 0,81 a	10,04 ± 1,38 a	9,86 ± 2,33 a
BIOQUÍMICA CLÍNICA				
Glucosa (mg/dl)	102,60 ± 3,30 a	106,20 ± 3,22 a	104,00 ± 3,65 a	104,40 ± 4,84 a
Creatinina (mg/l)	7,54 ± 0,95 a	7,74 ± 0,93 a	7,40 ± 0,94 a	7,74 ± 1,09 a
Urea (g/l)	0,42 ± 0,03 a	0,36 ± 0,03 a	0,40 ± 0,03 a	0,41 ± 0,04 a
ALT (U/l)	42,80 ± 4,05 a	40,40 ± 2,32 a	42,40 ± 4,15 a	44,40 ± 4,53 a
AST (U/l)	161,40 ± 17,40 a	197,80 ± 63,15 a	123,20 ± 26,35 a	206,40 ± 61,41 a
ALP (U/l)	232,40 ± 44,37 a	242,40 ± 29,80 a	219,20 ± 19,45 a	222,80 ± 26,74 a
GGT (U/l)	1,60 ± 0,40 a	1,60 ± 0,41 a	1,60 ± 0,42 a	1,40 ± 0,24 a
Amilasa (U/l)	559,80 ± 107,83 a	551,40 ± 49,56 a	638,20 ± 144,14 a	600,80 ± 92,24 a
Proteínas Totales (g/dl)	7,32 ± 0,25 a	7,38 ± 0,31 a	7,30 ± 0,26 a	7,54 ± 0,31 a
Albúmina (g %)	2,66 ± 0,13 a	2,96 ± 0,05 a	3,16 ± 0,36 a	2,89 ± 0,06 a
TIEMPO DE COAGULACIÓN				
Tiempo de Protrombina (s)	9,10 ± 0,58 a	9,32 ± 0,52 a	9,30 ± 0,52 a	9,80 ± 0,65 a
KPTT (s)	21,12 ± 2,63 a	26,94 ± 6,79 a	20,98 ± 0,35 a	23,38 ± 2,34 a

Los valores representan la media ± SD de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina; ALP: fosfatasa alcalina; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa; KPTT: Tiempo de tromboplastina parcial.

En lo referente a los niveles de lípidos y de lipoproteínas plasmáticos, en las Figuras 15 y 16 se muestran los efectos de la administración de las distintas harinas de la planta en las ratas machos y en las ratas hembras, respectivamente. En el caso de los machos, los valores de TAG, colesterol total, HDL-c, VLDL y riesgo aterogénico permanecieron constantes mientras que los

niveles de LDL-c aumentaron en las ratas expuestas a la harina de semillas ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de DMS Fisher). En cambio, en las ratas hembras la administración de las harinas de cladodios y de pulpa determinó una disminución significativa en los niveles de colesterol total ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de DMS Fisher), HDL-c ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de Bonferroni), y LDL-c ($p \leq 0,05$; prueba *post hoc* de DMS Fisher).

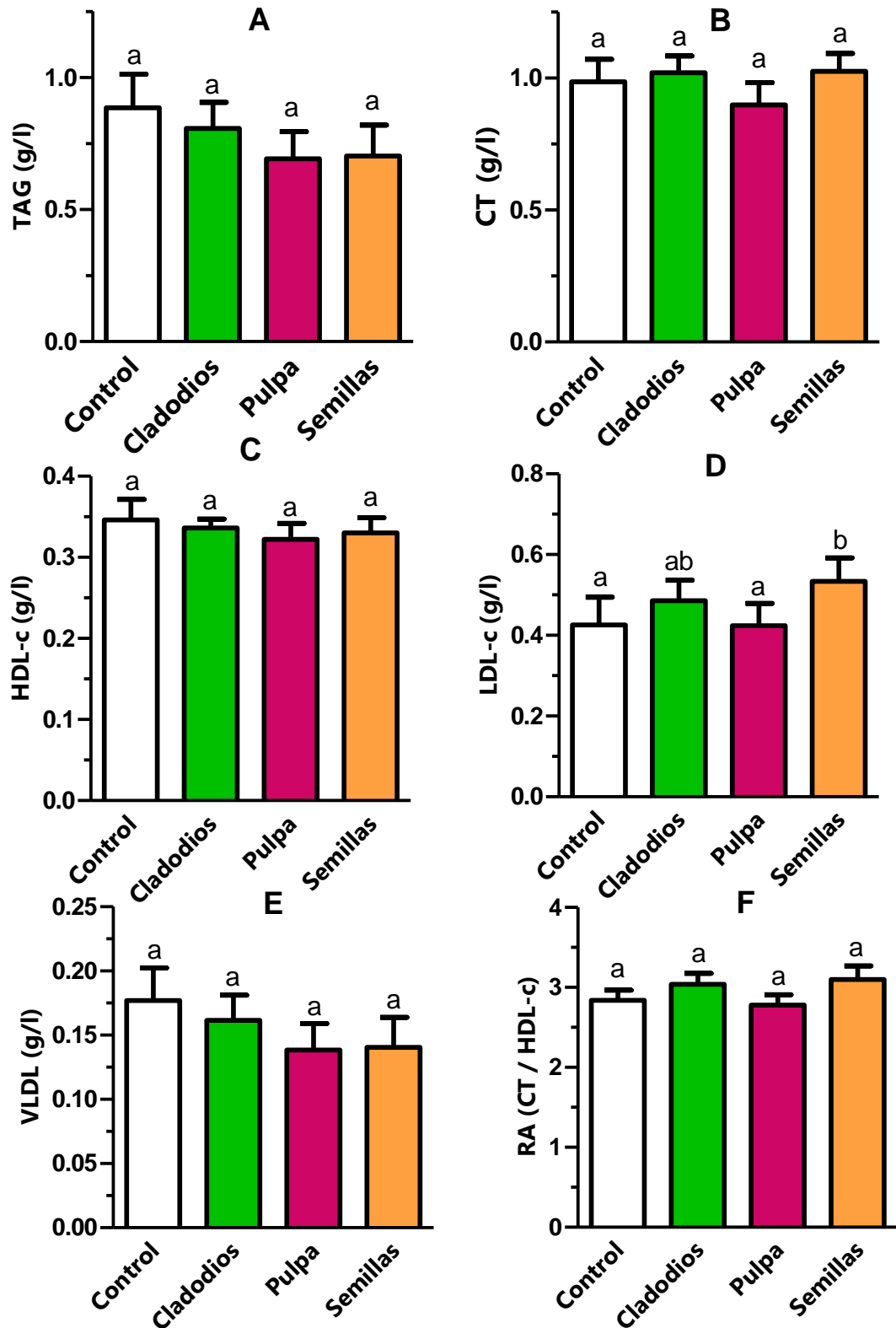


Figura 15. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticos de ratos machos. Los valores representan la media \pm SD de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. En el caso de LDL-c se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente con la prueba *post hoc* de DMS Fisher cuyas letras se muestran en la figura. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). CT: colesterol total; RA: riesgo aterogénico; TAG: triacilglicéridos.

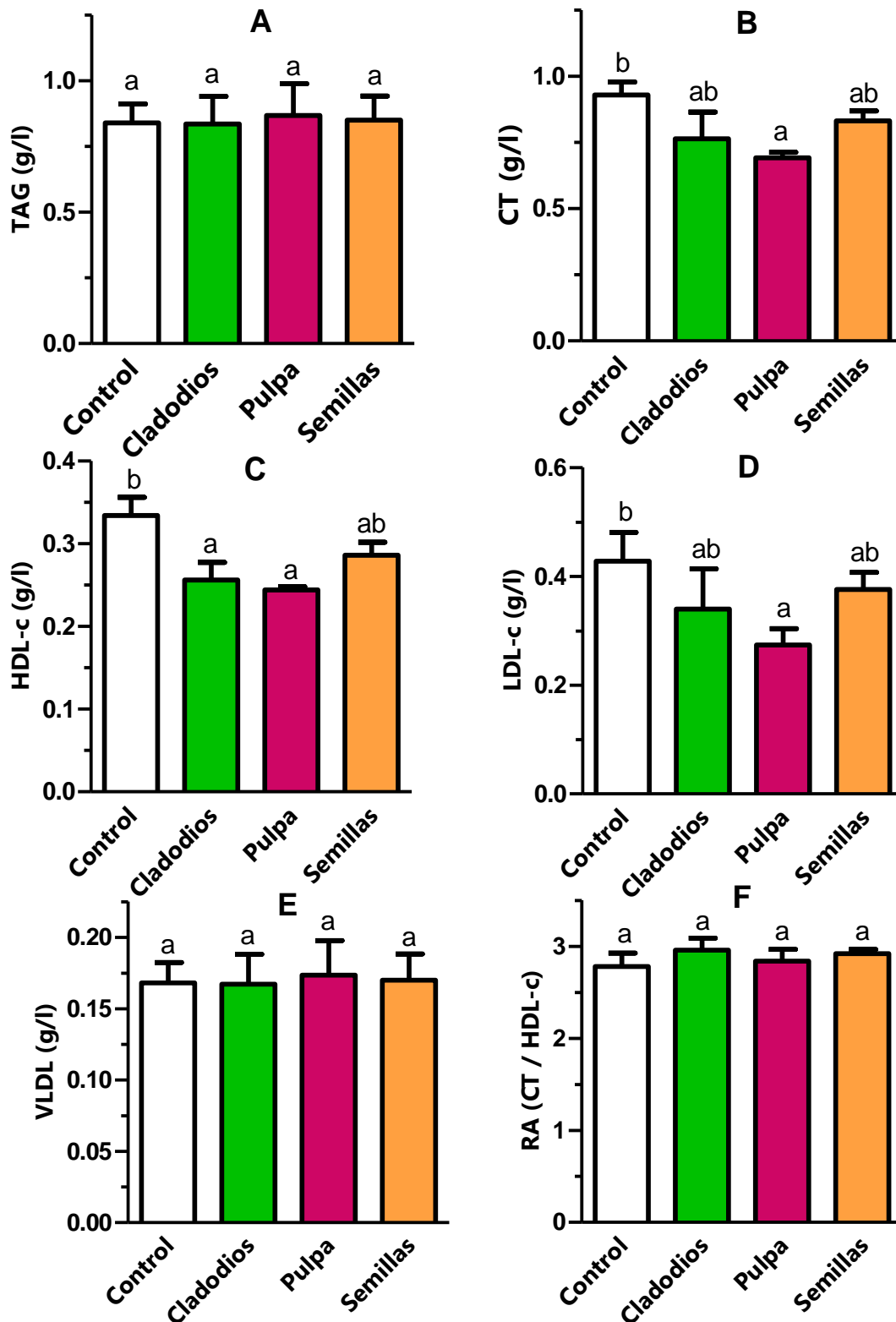


Figura 16. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticas de ratas hembras. Los valores representan la media \pm SD de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. En los casos de CT y LDL-c se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente con la prueba *post hoc* de DMS Fisher cuyas letras se muestran en la figura. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). CT: colesterol total; RA: riesgo aterogénico; TAG: triacilglicéridos.

En la necropsia realizada al finalizar el período experimental, no se observaron alteraciones macroscópicas en ninguno de los órganos analizados.

En las *Tablas 5 y 6* se muestran los pesos absolutos y relativos y los tamaños de los distintos órganos en las ratas machos y en las ratas hembras, respectivamente. En ambos sexos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales control y los tratados con las distintas partes de *Opuntia megapotamica*. A su vez, los valores registrados con las distintas harinas fueron similares.

Tabla 5. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso y el tamaño de los órganos de ratas machos

	Machos			
	Control	Cladodios	Pulpa	Semillas
<i>PESO (g)</i>				
Hígado	11,17 ± 1,75 a	10,91 ± 1,19 a	11,53 ± 1,43 a	10,40 ± 1,41 a
Riñones	2,38 ± 0,25 a	2,25 ± 0,25 a	2,46 ± 0,26 a	2,39 ± 0,28 a
Bazo	0,49 ± 0,03 a	0,49 ± 0,06 a	0,52 ± 0,04 a	0,33 ± 0,20 a
Páncreas	0,57 ± 0,17 a	0,61 ± 0,22 a	0,60 ± 0,16 a	0,61 ± 0,11 a
Testículos	5,31 ± 0,43 a	4,78 ± 0,33 a	5,07 ± 0,24 a	4,60 ± 0,26 a
Grasa epididimal	2,82 ± 1,13 a	2,88 ± 0,85 a	2,97 ± 0,86 a	2,86 ± 0,67 a
<i>PESO RELATIVO (g/100 g PC)</i>				
Hígado	3,90 ± 0,31 a	3,86 ± 0,45 a	3,85 ± 0,41 a	3,80 ± 0,28 a
Riñones	0,84 ± 0,08 a	0,79 ± 0,07 a	0,82 ± 0,07 a	0,88 ± 0,10 a
Bazo	0,17 ± 0,02 a	0,17 ± 0,03 a	0,17 ± 0,01 a	0,12 ± 0,07 a
Páncreas	0,20 ± 0,06 a	0,21 ± 0,07 a	0,20 ± 0,06 a	0,23 ± 0,05 a
Testículos	1,82 ± 0,11 a	1,71 ± 0,14 a	1,70 ± 0,12 a	1,65 ± 0,17 a
Grasa epididimal	1,00 ± 0,39 a	1,01 ± 0,26 a	0,99 ± 0,29 a	1,05 ± 0,27 a
<i>TAMAÑO (cm)</i>				
Bazo (largo)	2,38 ± 1,24 a	2,84 ± 0,14 a	3,02 ± 0,10 a	2,86 ± 0,30 a
Bazo (ancho)	0,68 ± 0,07 a	0,69 ± 0,03 a	0,67 ± 0,07 a	0,65 ± 0,05 a
Riñón(largo)	1,74 ± 0,19 a	1,64 ± 0,15 a	1,76 ± 0,09 a	1,72 ± 0,15 a
Riñón (ancho)	1,06 ± 0,12 a	0,89 ± 0,11 a	0,90 ± 0,12 a	0,96 ± 0,06 a
Estómago (largo)	2,46 ± 0,23 a	2,33 ± 0,17 a	2,30 ± 0,31 a	2,36 ± 0,39 a
Estómago (ancho)	1,03 ± 0,20 a	1,11 ± 0,15 a	1,04 ± 0,23 a	1,09 ± 0,22 a
Intestino delgado (largo)	127,75 ± 10,69 a	129,1 ± 5,88 a	137,2 ± 5,02 a	127,7 ± 9,51 a
Intestino delgado (ancho)	0,30 ± 0,07 a	0,33 ± 0,04 a	0,28 ± 0,08 a	0,37 ± 0,08 a
Ciego (largo)	3,29 ± 0,65 a	2,84 ± 0,73 a	2,96 ± 0,55 a	2,53 ± 0,51 a
Ciego (ancho)	1,60 ± 0,42 a	1,53 ± 0,35 a	1,62 ± 0,29 a	1,42 ± 0,25 a
Intestino grueso (largo)	16,1 ± 3,21 a	15,4 ± 1,98 a	15,5 ± 3,04 a	15,1 ± 2,41 a
Intestino grueso (ancho)	0,28 ± 0,03 a	0,28 ± 0,05 a	0,30 ± 0,10 a	0,26 ± 0,08 a

Los valores representan la media ± S.D. de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tabla 6. Efectos de la exposición sub-aguda a las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso y el tamaño de los órganos de ratas hembras

	Hembras			
	Control	Cladodios	Pulpa	Semillas
<i>PESO (g)</i>				
Hígado	7,85 ± 1,52 a	9,31 ± 0,38 a	8,23 ± 0,44 a	8,51 ± 1,34 a
Riñones	1,67 ± 0,24 a	1,98 ± 0,26 a	1,79 ± 0,11 a	1,85 ± 0,26 a
Bazo	0,50 ± 0,16 a	0,49 ± 0,07 a	0,45 ± 0,08 a	0,49 ± 0,11 a
Páncreas	0,49 ± 0,05 a	0,48 ± 0,13 a	0,47 ± 0,07 a	0,45 ± 0,07 a
<i>PESO RELATIVO (g/100 g PC)</i>				
Hígado	3,83 ± 0,51 a	4,02 ± 0,25 a	3,88 ± 0,43 a	3,85 ± 0,53 a
Riñones	0,82 ± 0,08 a	0,85 ± 0,09 a	0,84 ± 0,08 a	0,84 ± 0,08 a
Bazo	0,25 ± 0,08 a	0,21 ± 0,04 a	0,21 ± 0,04 a	0,22 ± 0,04 a
Páncreas	0,24 ± 0,02 a	0,21 ± 0,06 a	0,22 ± 0,03 a	0,21 ± 0,03 a
<i>TAMAÑO (cm)</i>				
Bazo (largo)	2,97 ± 0,36 a	2,93 ± 0,24 a	2,92 ± 0,23 a	2,87 ± 0,36 a
Bazo (ancho)	0,66 ± 0,13 a	0,70 ± 0,07 a	0,68 ± 0,09 a	0,66 ± 0,06 a
Riñón(largo)	1,54 ± 0,07 a	1,64 ± 0,04 a	1,54 ± 0,07 a	1,57 ± 0,05 a
Riñón (ancho)	0,86 ± 0,08 a	0,87 ± 0,08 a	0,81 ± 0,14 a	0,85 ± 0,15 a
Estómago (largo)	2,33 ± 0,15 a	2,05 ± 0,21 a	2,42 ± 0,18 a	2,22 ± 0,28 a
Estómago (ancho)	1,03 ± 0,09 a	0,96 ± 0,04 a	1,01 ± 0,10 a	1,05 ± 0,12 a
Intestino delgado (largo)	123,0 ± 5,35 a	127,67 ± 5,22 a	119,2 ± 5,17 a	119,4 ± 4,14 a
Intestino delgado (ancho)	0,34 ± 0,08 a	0,34 ± 0,03 a	0,25 ± 0,07 a	0,29 ± 0,06 a
Ciego (largo)	2,26 ± 0,35 a	2,81 ± 0,35 a	2,17 ± 0,29 a	2,81 ± 0,48 a
Ciego (ancho)	1,39 ± 0,28 a	1,22 ± 0,18 a	1,26 ± 0,26 a	1,31 ± 0,25 a
Intestino grueso (largo)	14,80 ± 3,85 a	16,30 ± 1,92 a	15,80 ± 2,25 a	16,00 ± 3,37 a
Intestino grueso (ancho)	0,26 ± 0,05 a	0,34 ± 0,07 a	0,27 ± 0,07 a	0,30 ± 0,06 a

Los valores representan la media ± S.D. de cinco muestras y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En las *Figuras 17 y 18* se pueden observar las fotomicrografías de secciones de hígado de ratas machos y ratas hembras, respectivamente. En general, no se encontraron alteraciones histológicas en los órganos examinados. Solamente en una rata macho, después del tratamiento con la harina de semillas se observaron daños focales reflejados en una vacuolización a nivel centrolobulillar y la balonización de unos pocos hepatocitos (*Figura 19*). A nivel de riñón, bazo, páncreas, estómago, duodeno, íleon y colon, no se observaron efectos adversos de las distintas harinas (*Figuras 20 a 33*, respectivamente). En las fotomicrografías de estómago se muestra solo la mucosa fúndica como representativa de las tres mucosas gástricas.

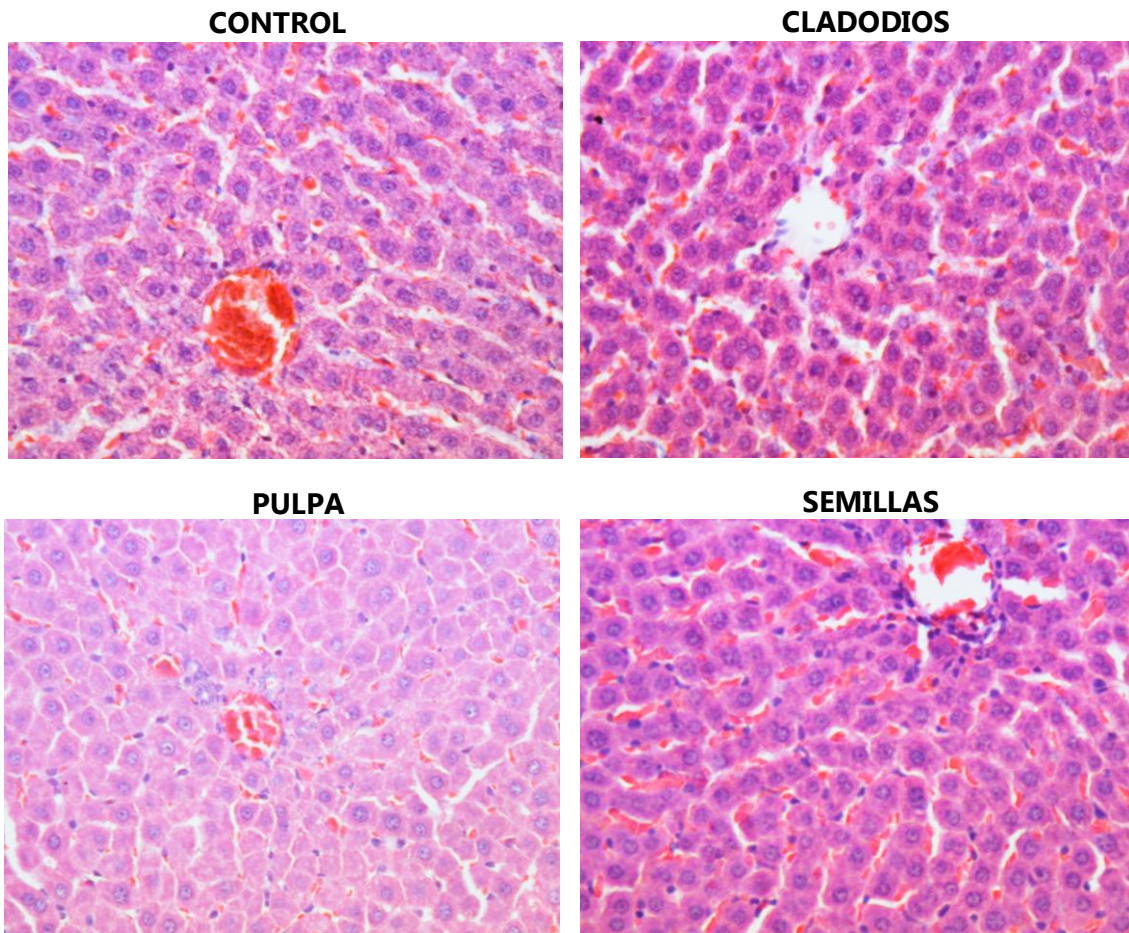


Figura 17. Fotomicrografías (400X) de secciones de hígado de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

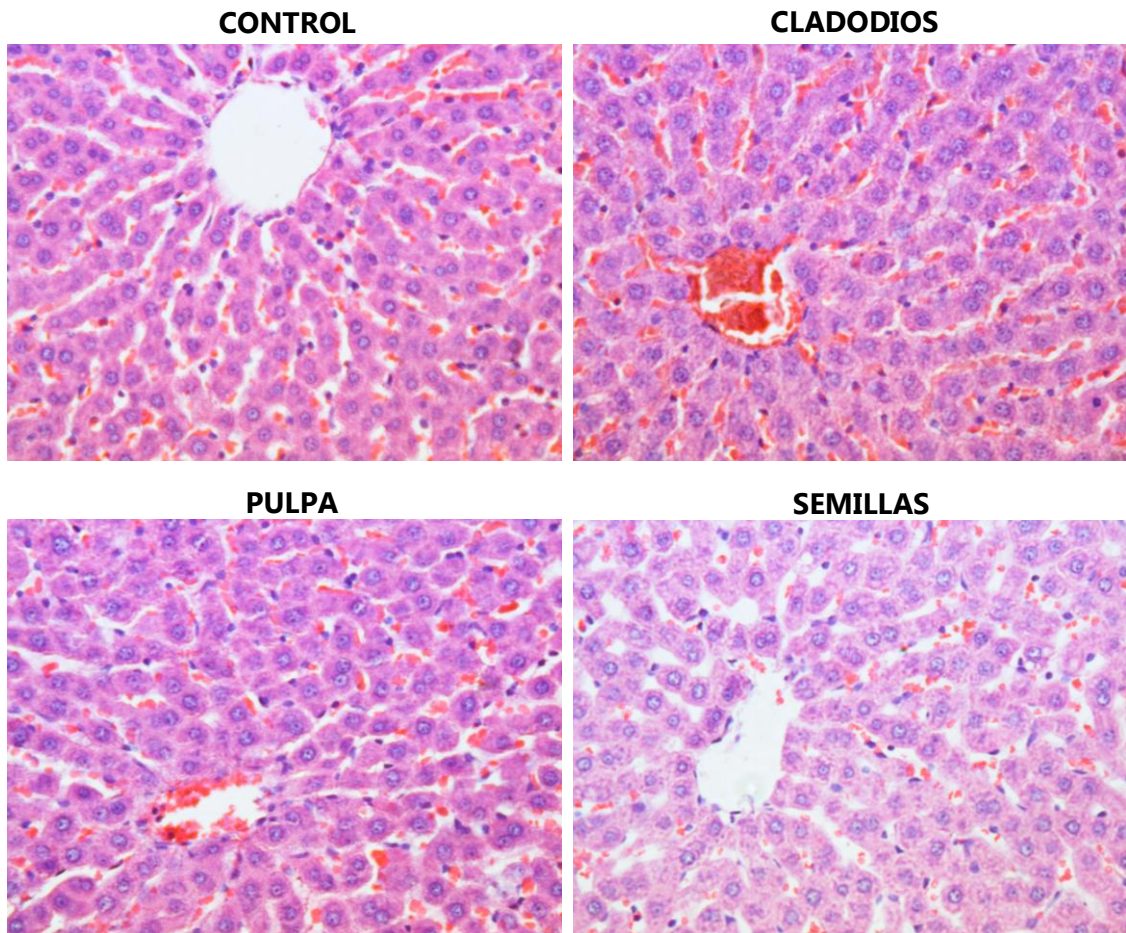


Figura 18. Fotomicrografías (400X) de secciones de hígado de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

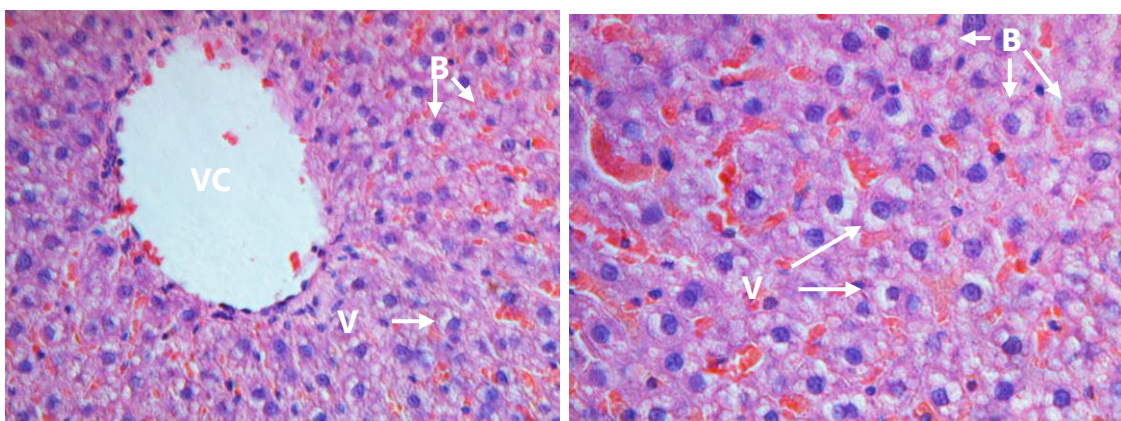


Figura 19. Fotomicrografías (400X, izquierda; 600 X, derecha) de secciones de hígado de una rata macho expuesta a la harina de semillas de *Opuntia megapotamica*. La muestra se fijó en formaldehído al 10 %, se lavó, se deshidrató y se embebió en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina. B: balonización; V: vacuola; VC: vena central.

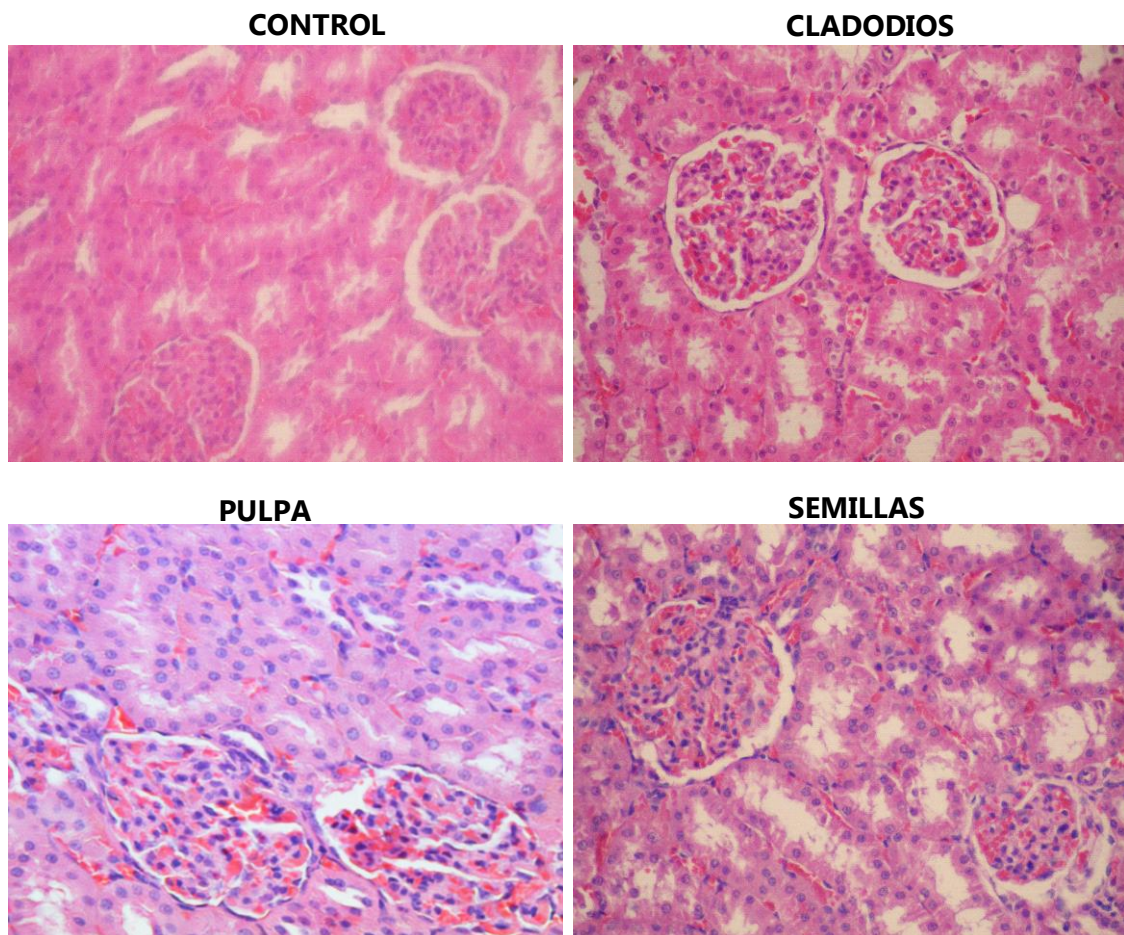


Figura 20. Fotomicrografías (400X) de secciones de riñón de ratos machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

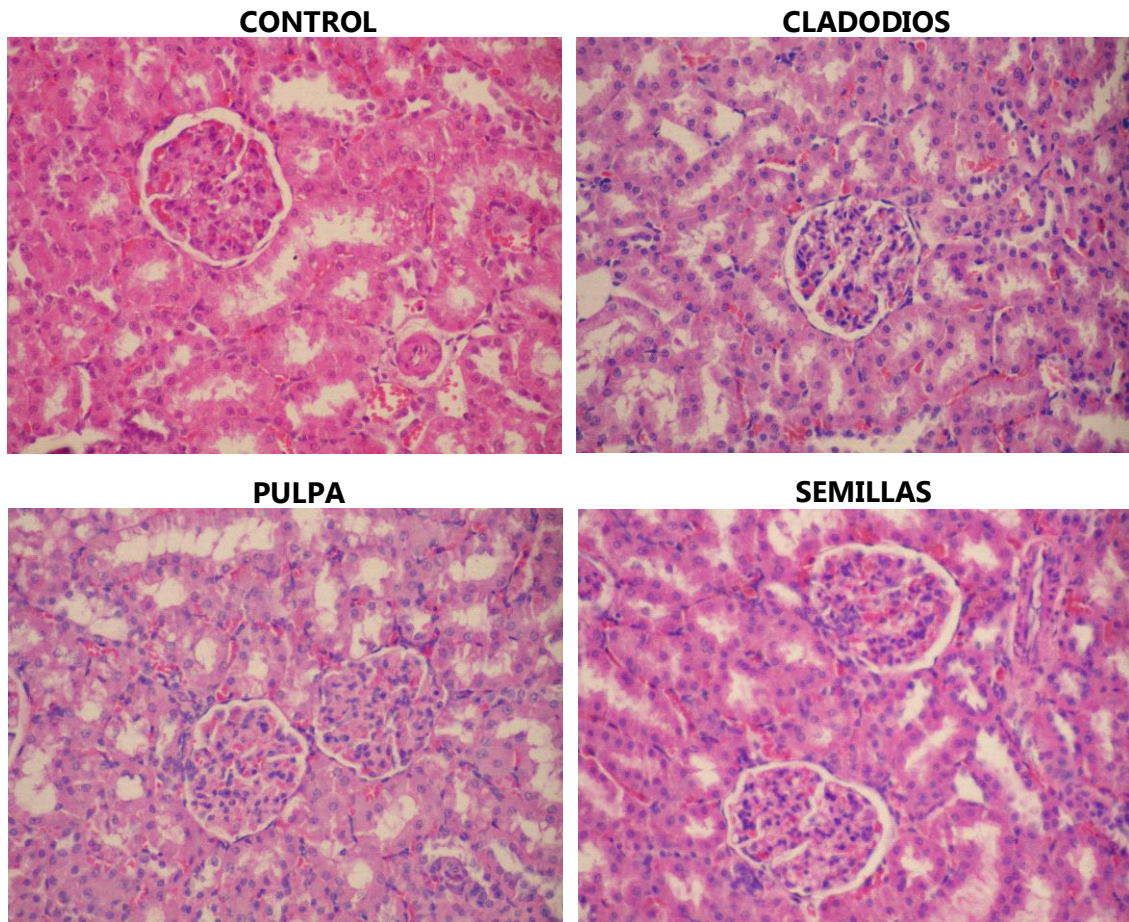


Figura 21. Fotomicrografías (400X) de secciones de riñón de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μ m de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

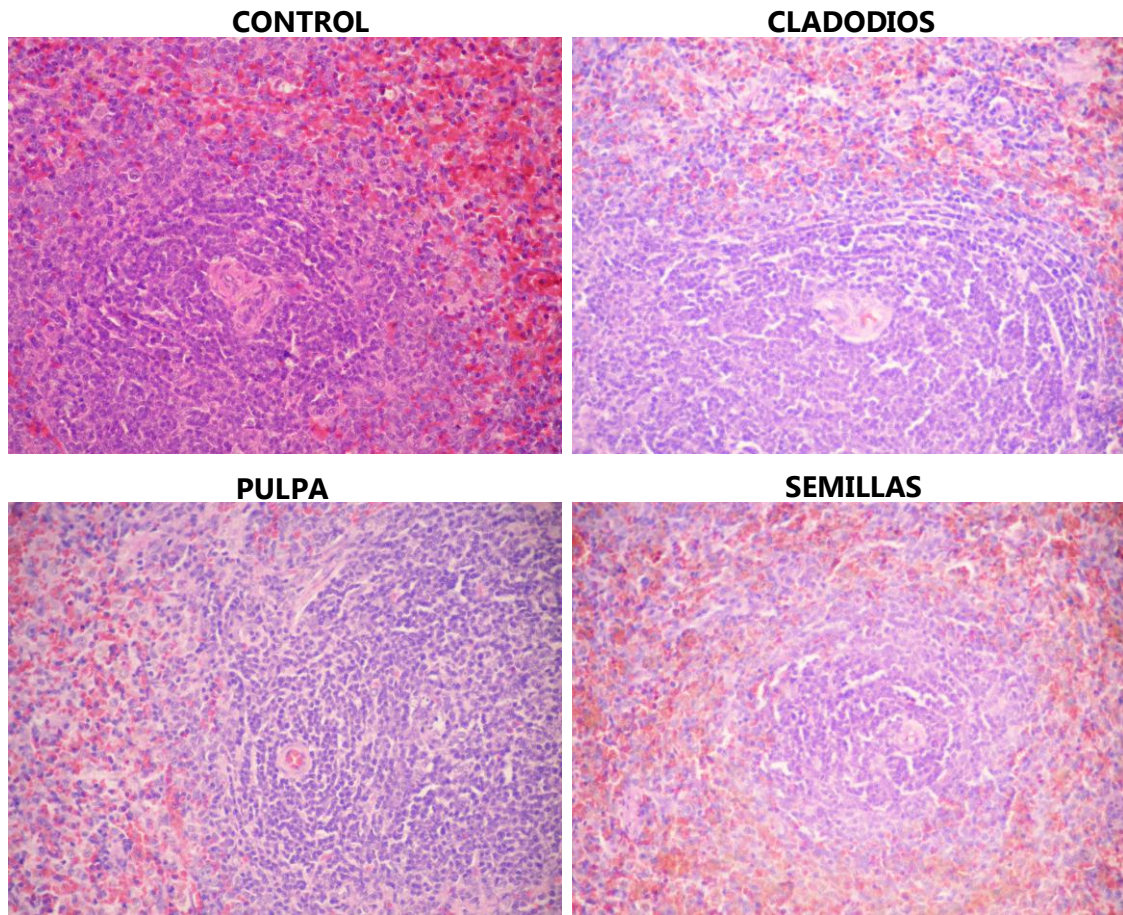


Figura 22. Fotomicrografías (400X) de secciones de bazo de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

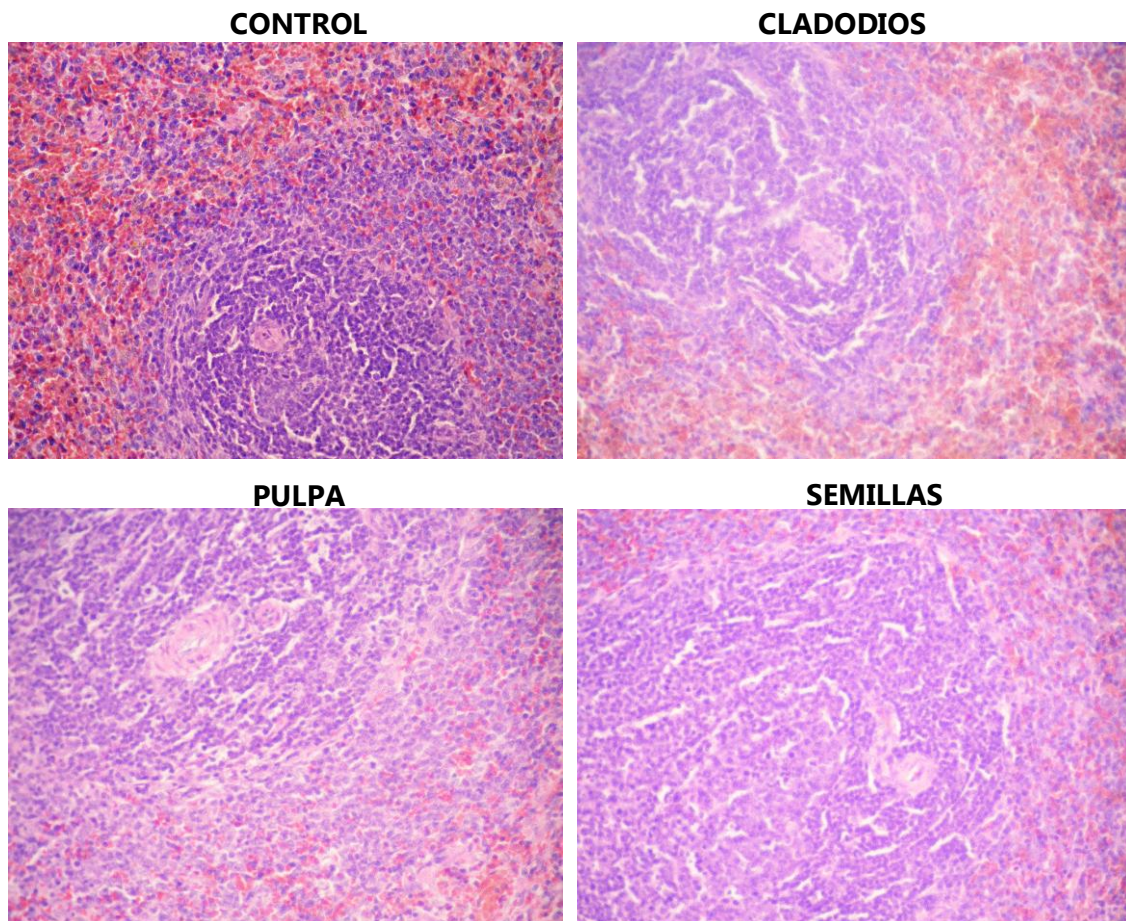


Figura 23. Fotomicrografías (400X) de secciones de bazo de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

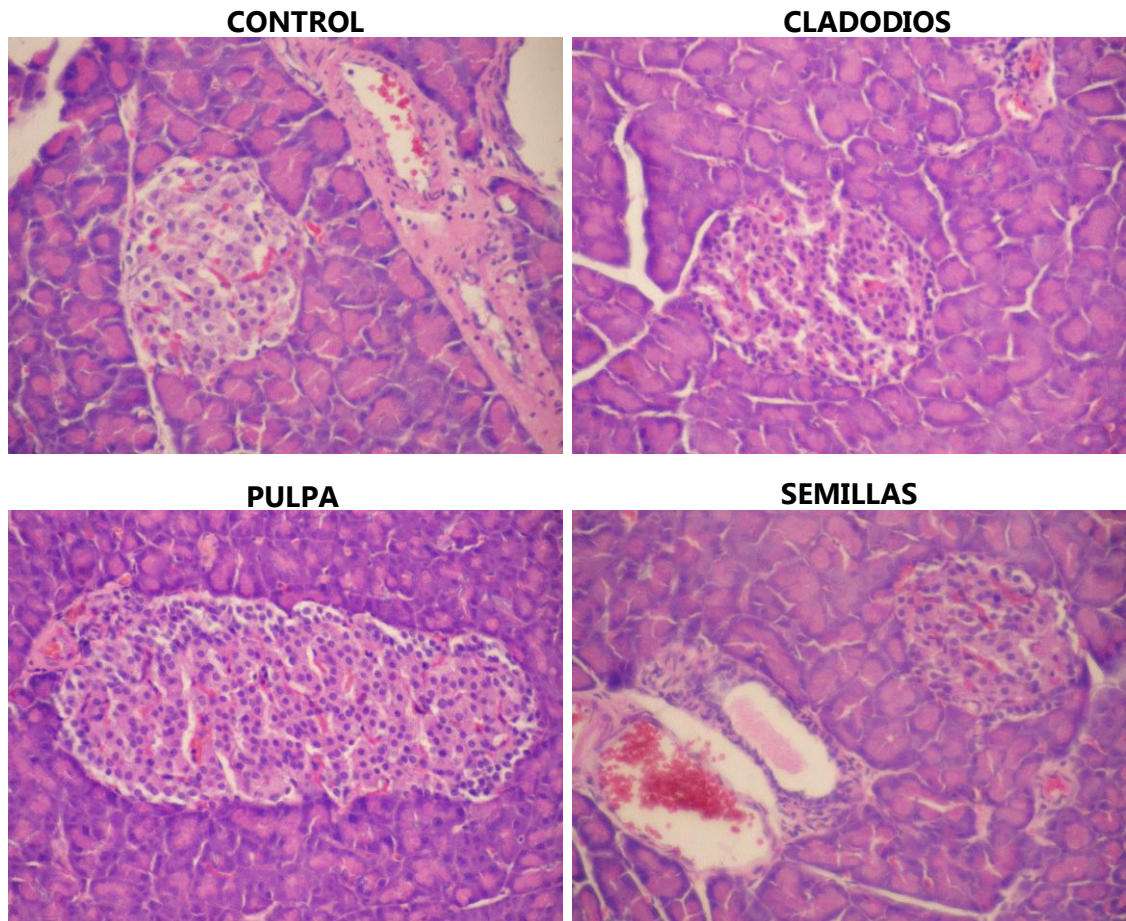


Figura 24. Fotomicrografías (400X) de secciones de páncreas de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

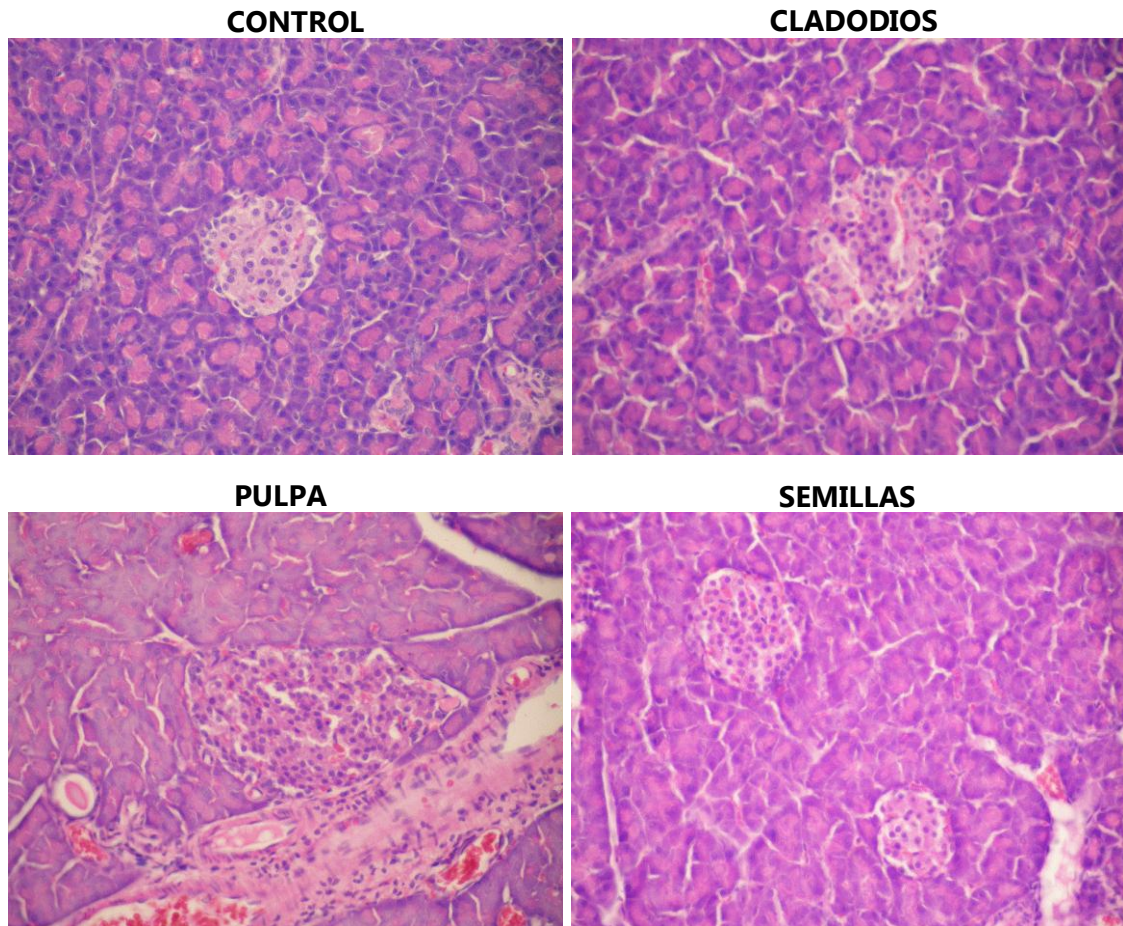


Figura 25. Fotomicrografías (400X) de secciones de páncreas de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

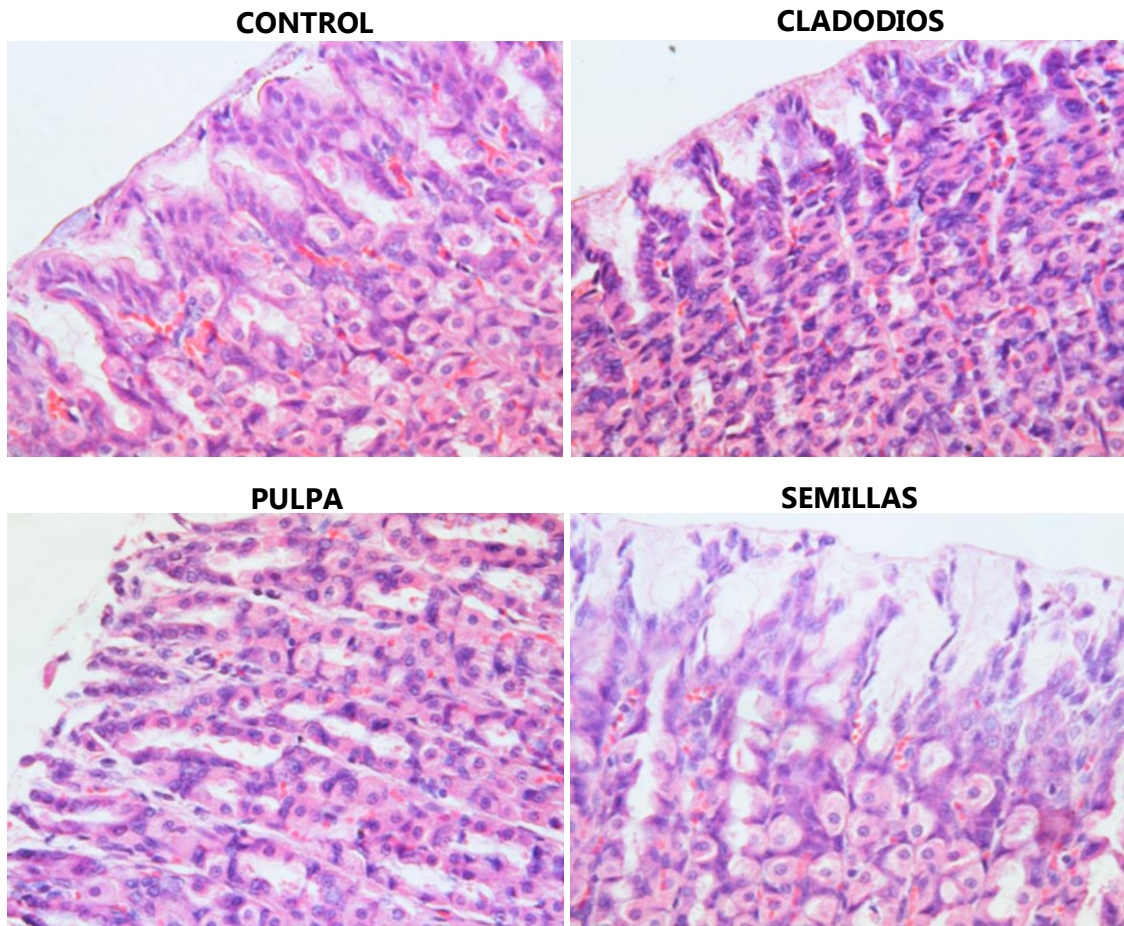


Figura 26. Fotomicrografías (400X) de secciones de estómago de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

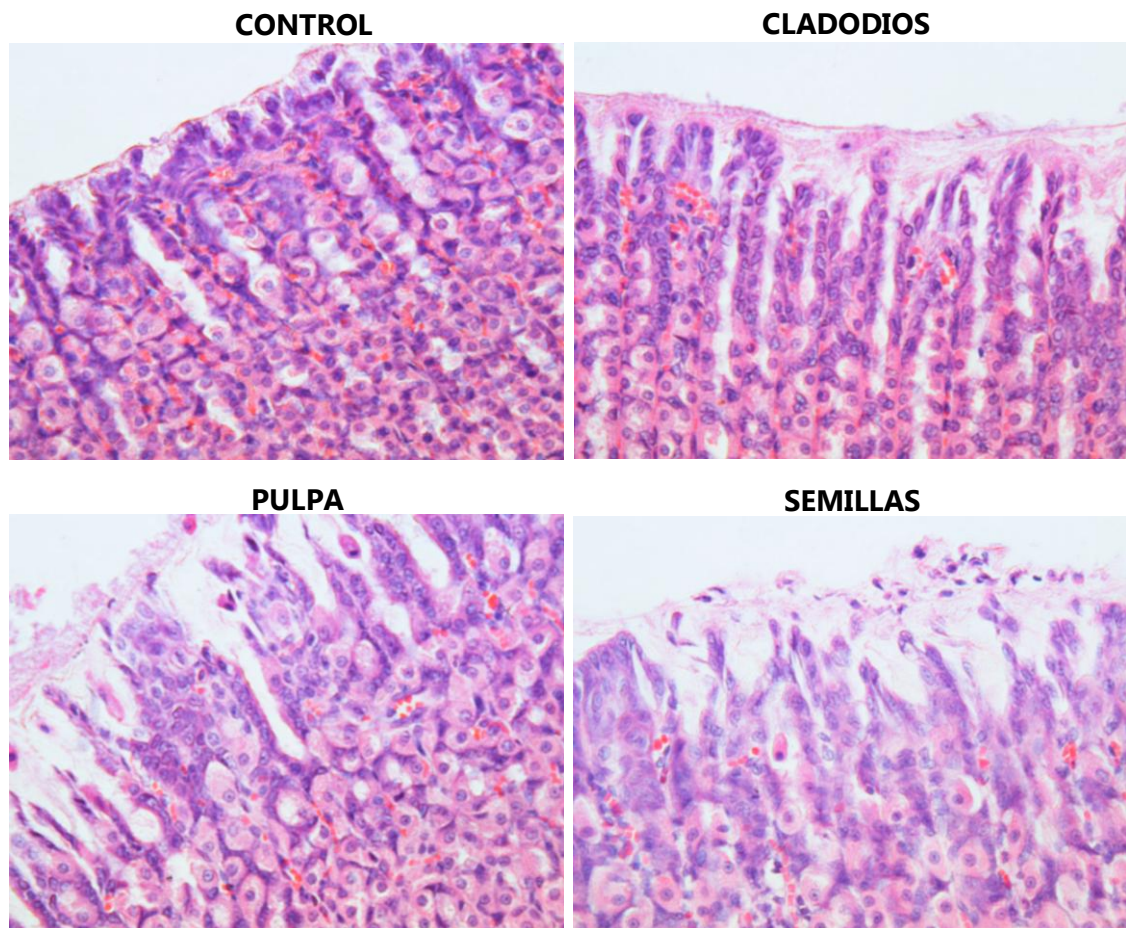


Figura 27. Fotomicrografías (400X) de secciones de estómago de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

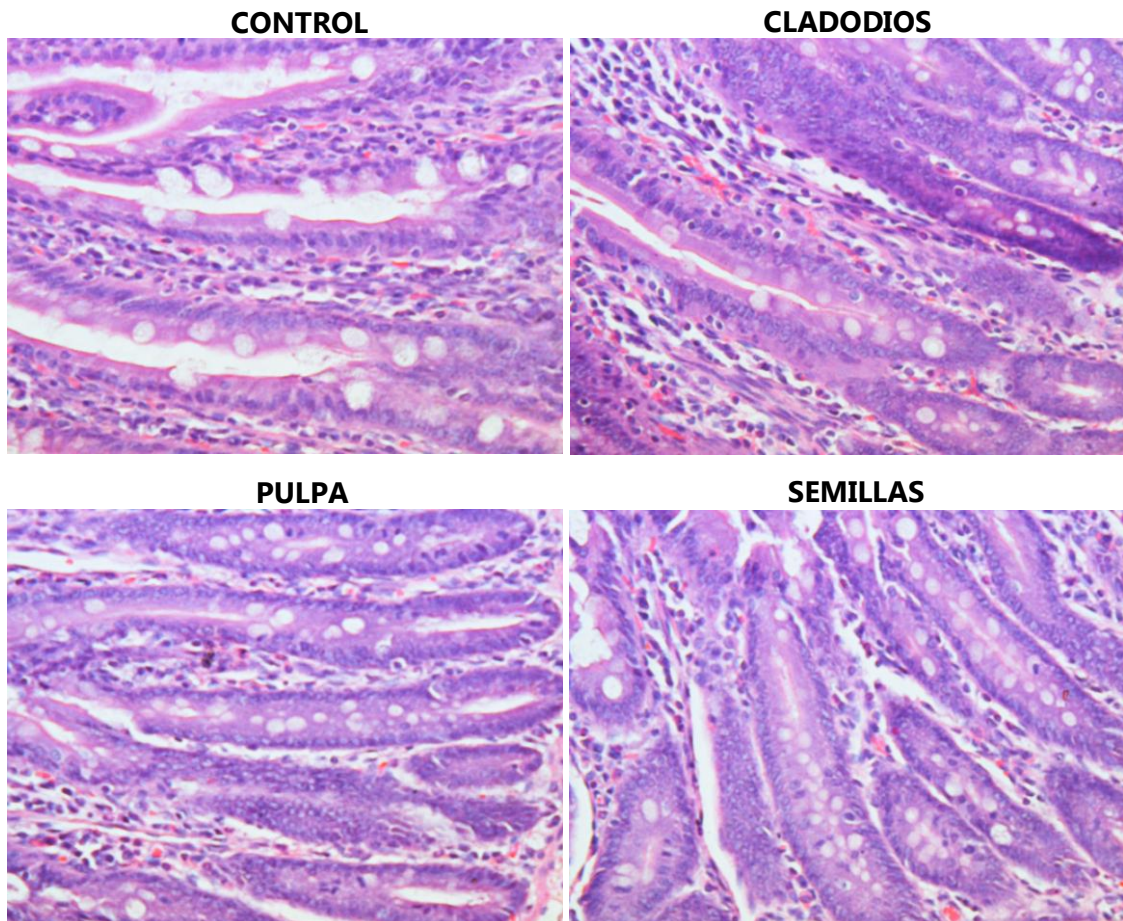


Figura 28. Fotomicrografías (400X) de secciones de duodeno de ratos machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

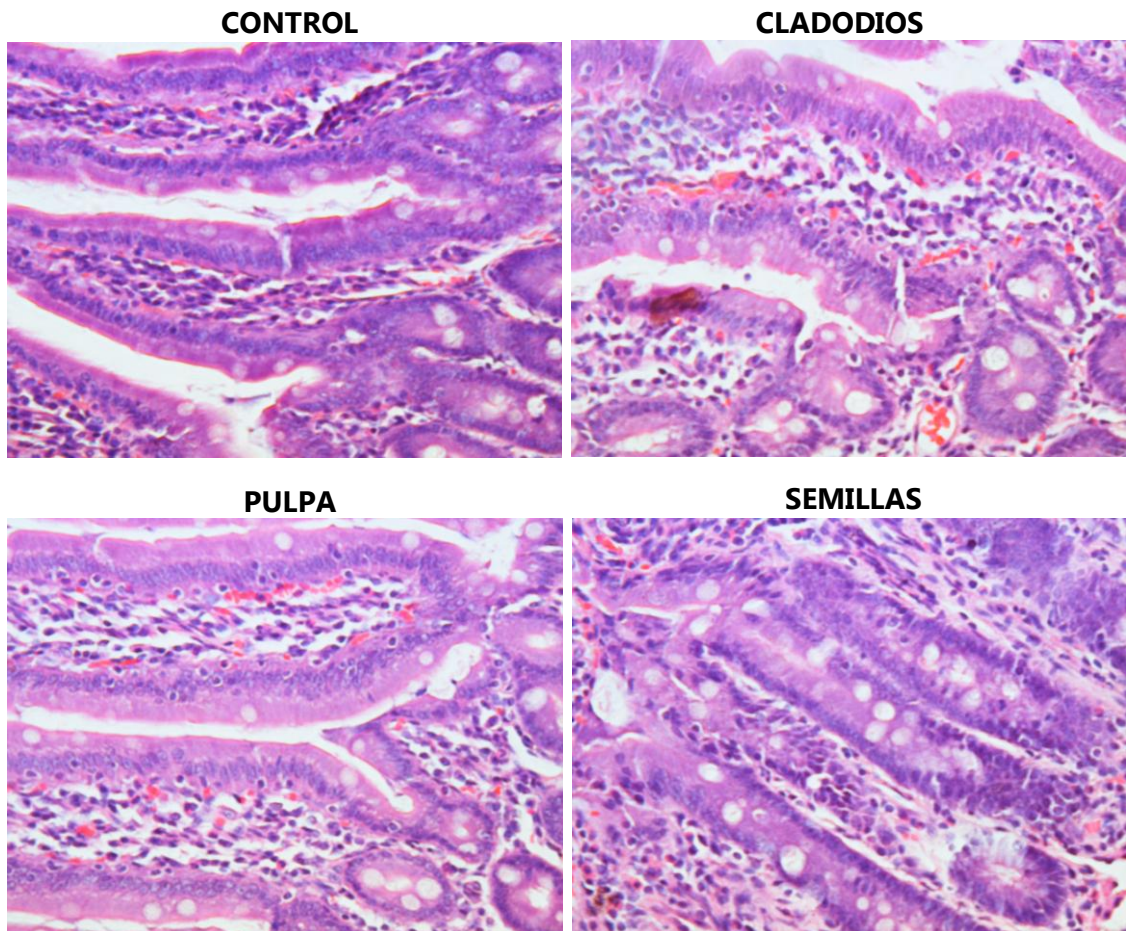


Figura 29. Fotomicrografías (400X) de secciones de duodeno de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

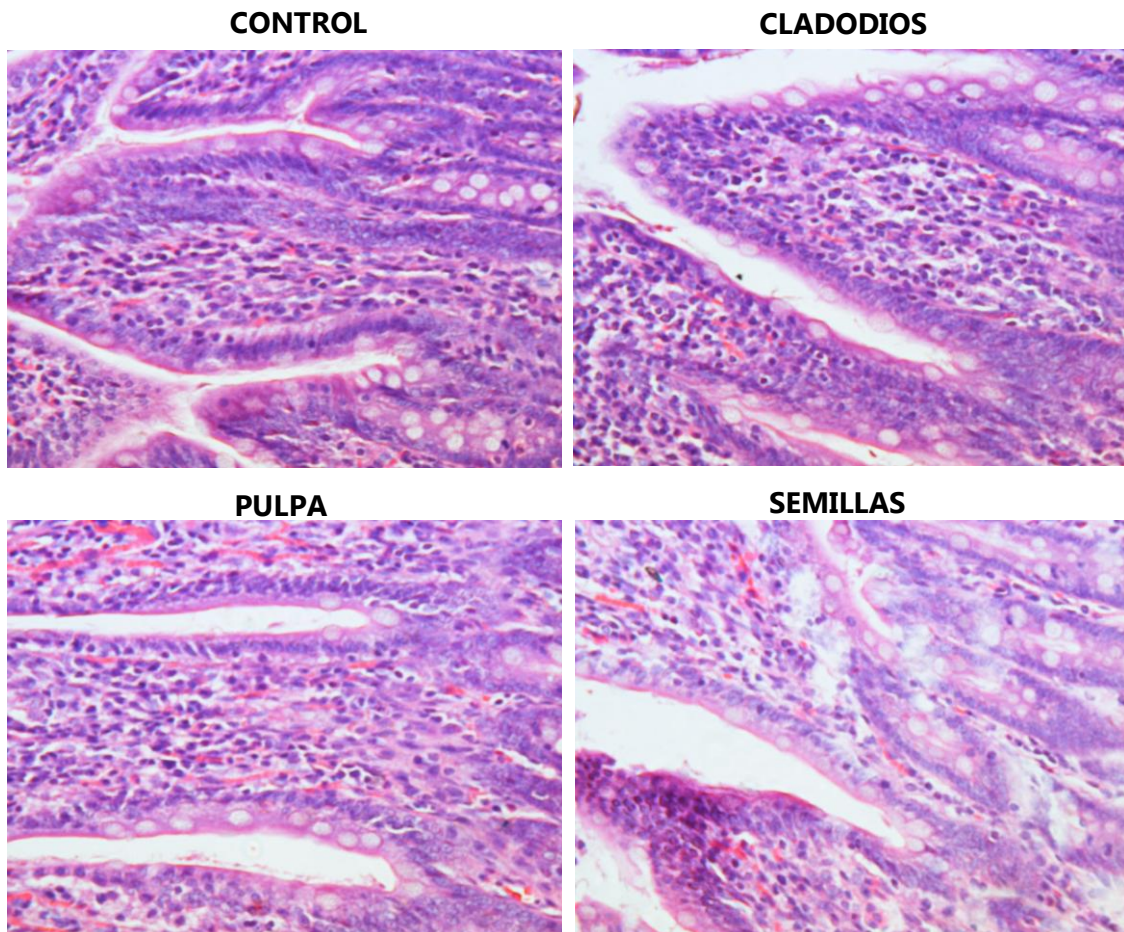


Figura 30. Fotomicrografías (400X) de secciones de íleon de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μ m de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

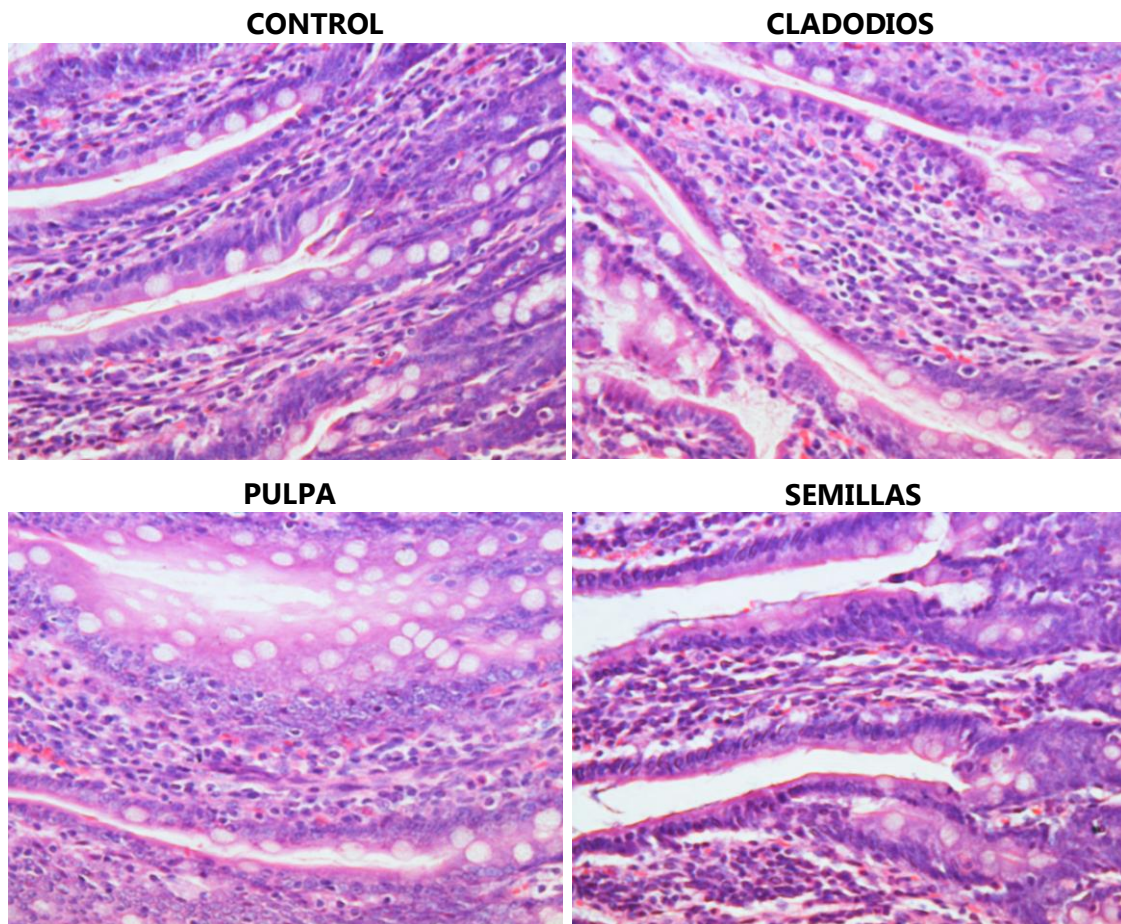


Figura 31. Fotomicrografías (400X) de secciones de íleon de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

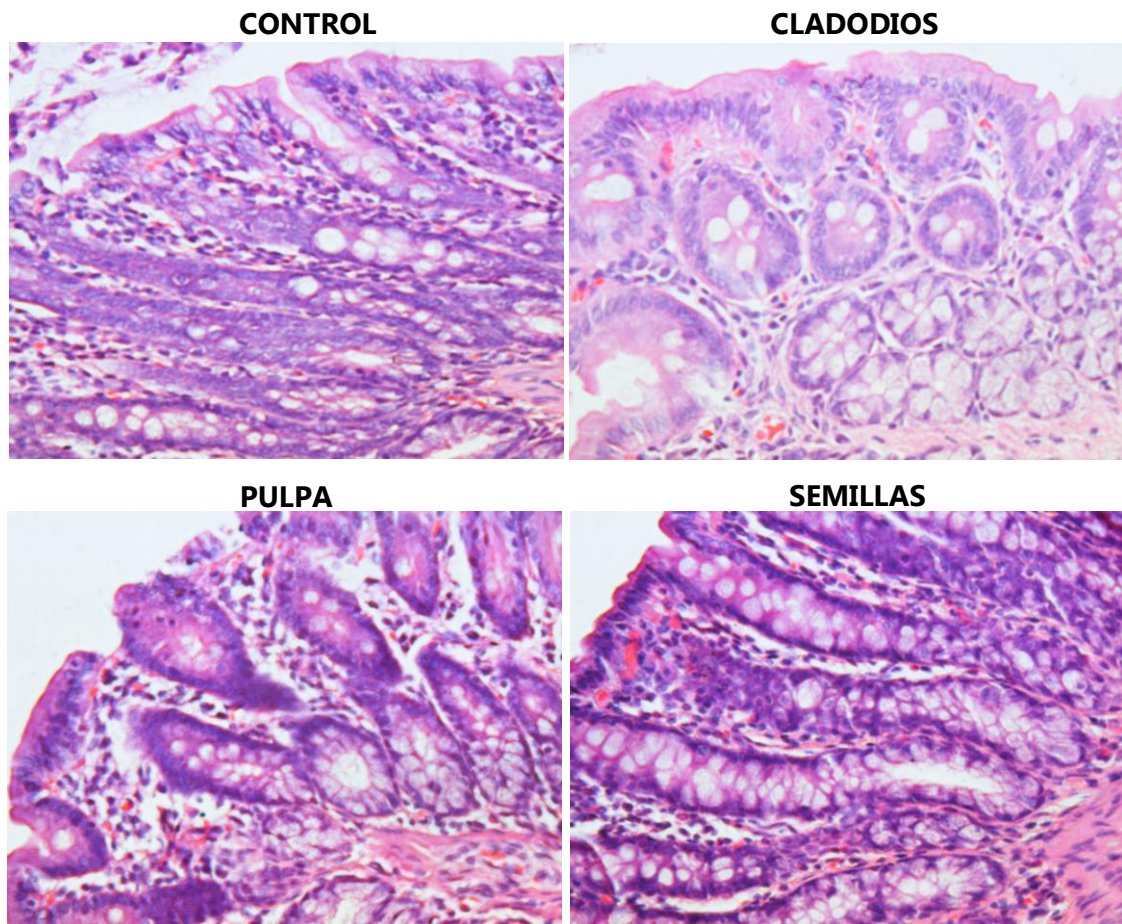


Figura 32. Fotomicrografías (400X) de secciones de colon de ratas machos control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

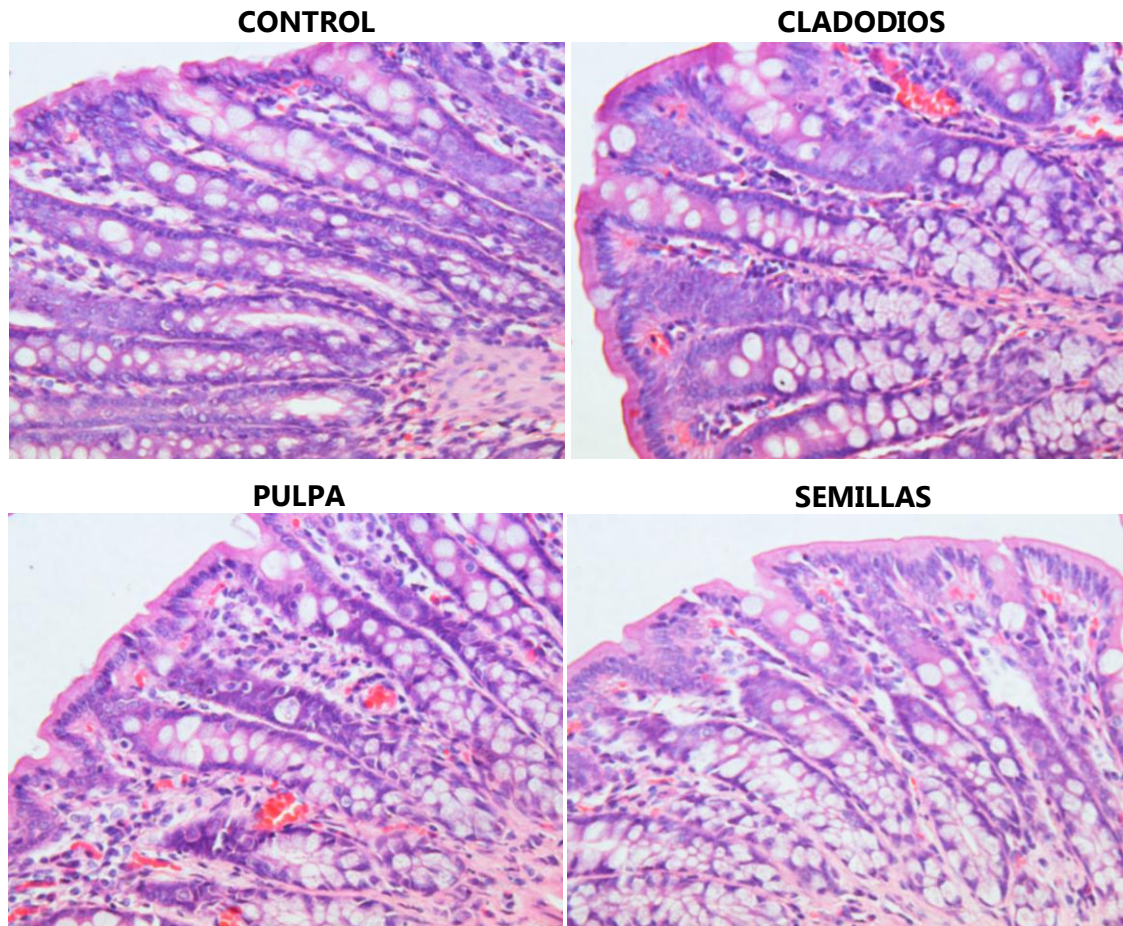


Figura 33. Fotomicrografías (400X) de secciones de colon de ratas hembras control y expuestas a las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras de los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Las secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina.

En conjunto, los estudios de toxicidad aguda y sub-aguda indican que la administración oral de las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica*, en las dosis máximas ensayadas, no tiene efectos tóxicos sobre los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica de las ratas machos y hembras. En lo referente a la histología de los órganos, la administración de la harina de pulpa no tuvo efectos negativos en ninguno de los dos estudios de toxicidad realizados. En el caso de la exposición aguda a la harina de cladodios, solamente se observaron algunas alteraciones a nivel renal. Con respecto a la harina de semillas, en el estudio de toxicidad aguda, se registraron alteraciones en riñón y en hígado mientras que la exposición sub-aguda solo generó alteraciones a nivel hepático.

El nivel de daño observado en los estudios histopatológicos y la ausencia de signos clínicos asociados, indican que se trata de efectos tóxicos leves.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE *Opuntia megapotamica* EN RATAS CON HIPERGLUCEMIA TRANSITORIA Y EN RATAS DIABÉTICAS

En este capítulo se analizaron los efectos de la administración oral de las harinas de cladodios, de pulpa de frutos y de semillas de la especie nativa *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia de ratas normales con hiperglucemia transitoria. Por otro lado, en ratas diabéticas se estudiaron los efectos de la planta sobre la glucosa, insulina, lípidos y lipoproteínas plasmáticos, lípidos hepáticos y renales, enzimas claves del metabolismo lipídico, parámetros vinculados con el funcionamiento hepático y renal y la histología de páncreas, hígado y riñón. En forma previa, se determinó el nivel y la composición de los lípidos de las harinas de la planta para evaluar su posible influencia sobre los resultados y al mismo tiempo concretar la caracterización lipídica de esta especie de *Opuntia* que aún no ha sido abordada.

II. 1. Contenido y composición de los lípidos de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica*

Cuando se determinó el contenido de fósforo fosfolipídico de los extractos lipídicos totales se observó que la harina de cladodios posee el doble de fosfolípidos que la harina de semillas (*Figura 34*).

La separación de las distintas clases de lípidos neutros se abordó a través de cromatografías monodimensionales empleando diferentes sistemas de solventes. La presencia de vitaminas liposolubles y de pigmentos no permitió, en ningún caso, una buena resolución aunque con estándares adecuados se pudieron visualizar las bandas mayoritarias correspondientes a triacilglicéridos y

AGL seguidas por diacilglicéridos (DAG) y monoacilglicéridos, en los extractos lipídicos de ambos tipos de harina. Por este motivo, los resultados que se presentan derivan del análisis de los extractos lipídicos totales.

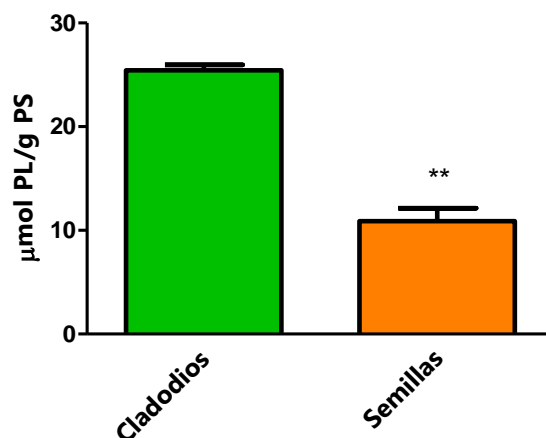


Figura 34. Contenido de los fosfolípidos de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Los resultados representan valores medios \pm SD de cuatro muestras independientes y se compararon con la prueba t de *Student*. Los asteriscos indican diferencias muy significativas (** $p \leq 0,01$) entre los dos grupos. PL: fosfolípidos totales; PS: peso seco.

El contenido y la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales se determinó mediante cromatografía en fase gaseosa. En la *Figura 35* se muestra un perfil cromatográfico representativo de cada harina y en la *Figura 36* se puede observar que el nivel de ácidos grasos totales de la harina de semillas fue casi cinco veces mayor que el registrado en la harina de cladodios. Especialmente en el caso de la harina de semillas, la contribución de los lípidos neutros al contenido lipídico total sería mucho más significativa que el aporte de los fosfolípidos.

En lo referente a la composición de ácidos grasos, los acilos mayoritarios

en cladodios fueron linoleico (18:2), palmítico (16:0) y oleico (18:1), que representaron alrededor del 70 % del total, seguidos por los ácidos linolénico (18:3n3) y esteárico (18:0) (*Tabla 7*). En el caso de las semillas, el ácido linoleico constituyó el 53 % del contenido total de ácidos grasos y se registraron niveles importantes de los ácidos oleico, palmítico y esteárico. De manera complementaria, en la *Figura 37* se puede observar que en ambas harinas los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fueron los más abundantes. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las harinas en los niveles de ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). El índice de insaturación (UI), calculado como la sumatoria de los porcentajes de los de ácidos grasos multiplicados por el número de doble ligaduras de cada uno, fue significativamente más alto en la harina de semillas.

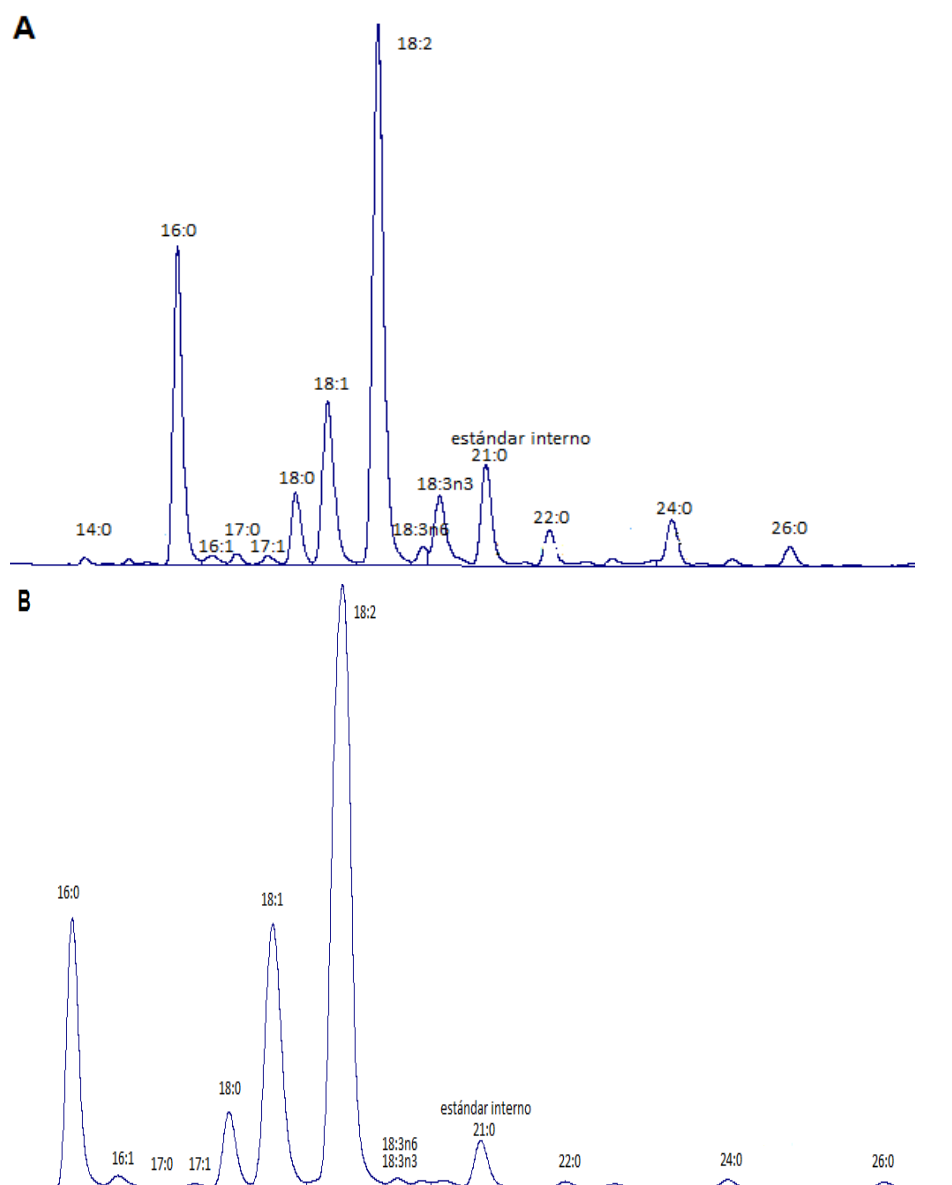


Figura 35. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de ácidos grasos del extracto lipídico total de harina de cladodios (A) y de semillas (B) de *Opuntia megapotamica*. Los metil ésteres se identificaron por sus tiempos de retención de acuerdo con el número de átomos de carbono y de dobles ligaduras, por comparación con corridas cromatográficas de mezclas de estándares. Se utilizó como estándar interno el ácido eneicosanoico (21:0) que no está presente en las muestras a analizar.

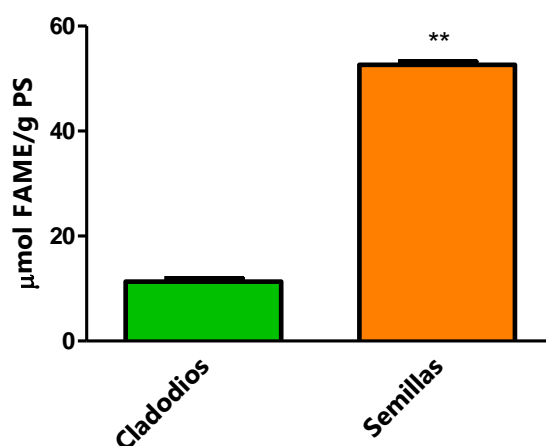


Figura 36. Contenido de los ácidos grasos totales de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Los resultados representan valores medios \pm SD de cuatro muestras independientes y se compararon con la prueba t de *Student*. Los asteriscos indican diferencias muy significativas ($**p \leq 0,01$) entre los dos grupos. FAME: metil ésteres de ácidos grasos; PS: peso seco.

Tabla 7. Composición de los ácidos grasos de los lípidos totales de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica*

ácidos grasos	Cladodios	Semillas		Cladodios	Semillas	
	nmol/g PS			MOL %		
14:0	27,65 \pm 4,25	201,28 \pm 45,16	*	0,24 \pm 0,01	0,38 \pm 0,08	*
16:0	2725,99 \pm 277,03	8956,05 \pm 176,35	**	24,26 \pm 1,65	17,02 \pm 0,15	**
16:1	49,64 \pm 5,26	752,41 \pm 80,14	**	0,44 \pm 0,03	1,43 \pm 0,13	**
17:0	89,96 \pm 14,34	138,50 \pm 22,37		0,81 \pm 0,19	0,26 \pm 0,04	**
17:1	81,15 \pm 7,88	184,53 \pm 26,73	**	0,73 \pm 0,12	0,35 \pm 0,04	*
18:0	557,77 \pm 85,81	2494,68 \pm 146,70	**	4,93 \pm 0,22	4,74 \pm 0,20	
18:1	1481,28 \pm 211,17	10994,85 \pm 356,56	**	13,11 \pm 0,42	20,90 \pm 0,26	**
18:2	4496,26 \pm 761,37	28085,72 \pm 359,58	**	39,72 \pm 2,86	53,40 \pm 0,82	**
18:3n6	151,55 \pm 8,61	113,31 \pm 27,71	*	1,35 \pm 0,12	0,22 \pm 0,06	**
18:3n3	676,37 \pm 58,93	100,83 \pm 1,55	**	6,02 \pm 0,20	0,19 \pm 0,01	**
22:0	315,20 \pm 31,17	263,16 \pm 41,05		2,84 \pm 0,55	0,50 \pm 0,07	**
24:0	458,05 \pm 70,51	322,23 \pm 51,75	*	4,12 \pm 0,95	0,61 \pm 0,09	**
26:0	156,37 \pm 12,66	nd		1,41 \pm 0,25	nd	

Los lípidos se extrajeron por el método de Folch y col. y los metil ésteres se cuantificaron por cromatografía en fase gaseosa. Los resultados se expresan en nmoles/g de peso seco (PS) y en mol%, representan valores medios \pm SD de cuatro muestras independientes y se compararon con la prueba t de *Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($*p \leq 0,05$ o $**p \leq 0,01$) entre los dos grupos. nd: no detectado.

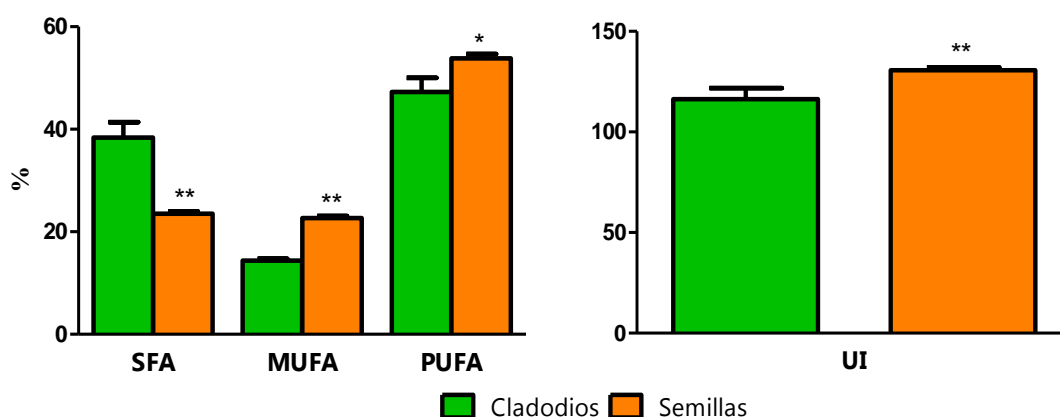


Figura 37. Distribución porcentual de los SFA, MUFA y PUFA y valores de UI en los lípidos totales de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica*. Los resultados representan valores medios \pm SD de cuatro muestras independientes y se compararon con la prueba t de *Student*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($*p \leq 0,05$ o $**p \leq 0,01$) entre los dos grupos. SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

II.2. Efectos de *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia de ratas normales con hiperglucemia transitoria

Para evaluar el posible efecto anti-hiperglucemiante de las harinas de la planta se realizaron pruebas orales de tolerancia a la glucosa en ratas machos normales. Como control estándar se utilizó la droga hipoglucemiante de referencia, glibeipirida.

La glucemia de las ratas control alcanzó un valor máximo a los 15 minutos de la administración oral de la glucosa y luego disminuyó en forma gradual (*Figura 38*). La glibeipirida produjo una caída del 33 % en este pico hiperglucémico y un retorno más rápido de la glucemia a los valores de ayuno. Las tres harinas de la planta tuvieron un importante efecto anti-hiperglucemiante ya que generaron disminuciones estadísticamente

significativas (alrededor del 30 %) en el pico hiperglucémico y determinaron además un retorno más rápido de la glucemia a los valores de ayuno en comparación con el grupo control (*Figura 38 A-C*). Las dosis más efectivas fueron 200 mg/kg PC de harina de cladodios, 73 mg/kg PC de harina de pulpa y 160 mg/kg PC de harina de semillas y cuando se compararon se pudo observar claramente que las tres partes de la planta tuvieron un efecto similar al de la droga hipoglucemiante de referencia (*Figura 38 D*).

Además, se realizaron pruebas preliminares en ratas hembras para determinar, con el menor número posible de animales, si había diferencias entre los sexos. Se observó un efecto anti-hiperglucemiante similar al registrado en los machos (datos no mostrados). Las pruebas de tolerancia a la glucosa se llevaron a cabo únicamente en animales normales debido a que un ensayo acotado realizado en ratas diabéticas tuvo efectos muy nocivos que condujeron a la muerte de los animales.

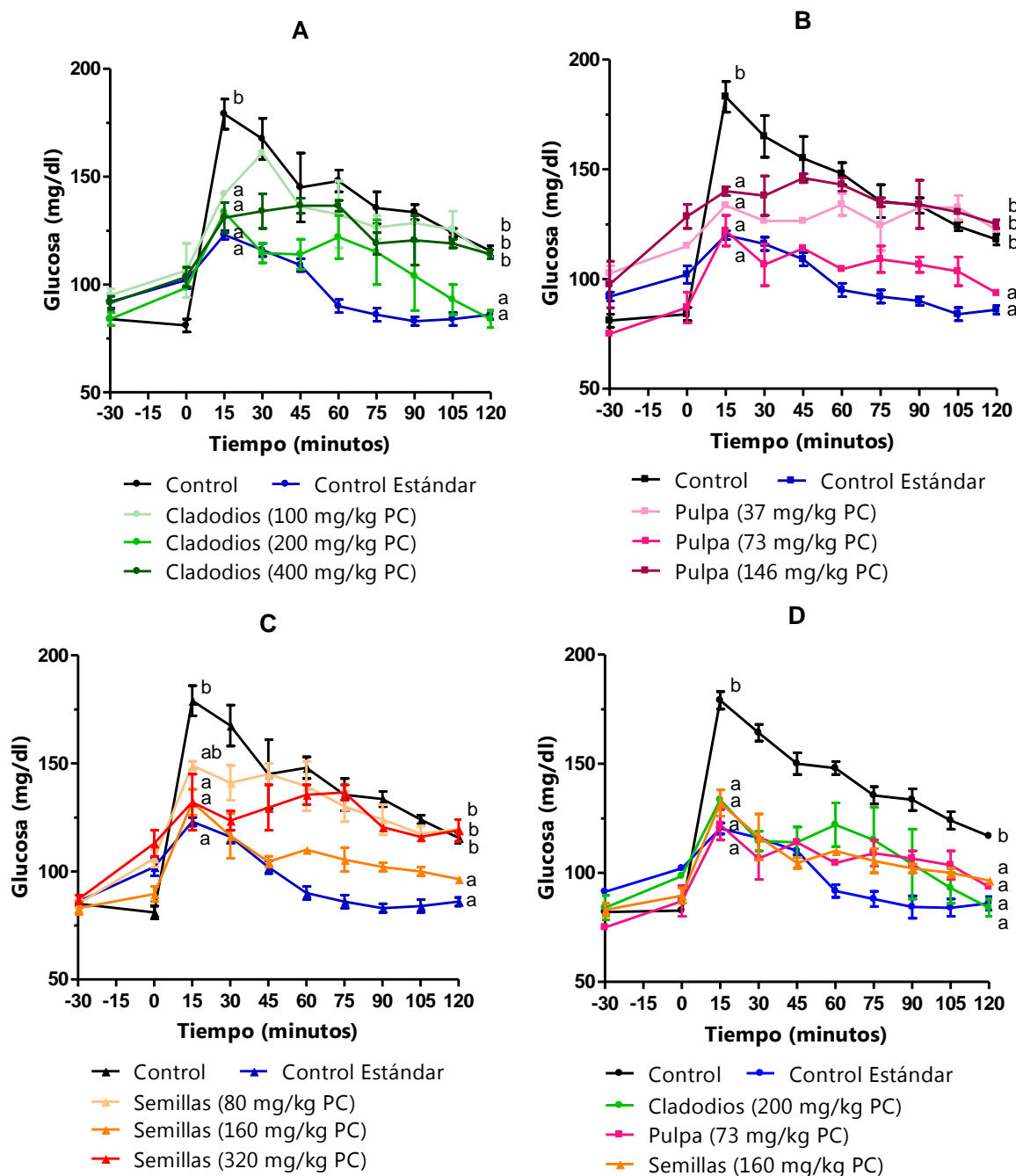


Figura 38. Pruebas orales de tolerancia a la glucosa en ratas machos normales con hiperglucemia transitoria. El tiempo inicial (0 min) corresponde al momento en que se administró la sobrecarga oral de glucosa. **(A)** Harina de cladodios, **(B)** harina de pulpa y **(C)** harina de semillas. **(D)** Comparación entre las dosis más efectivas de los tres tratamientos. Los valores representan la media \pm SD de cuatro muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos en cada tiempo experimental.

II.3. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* en ratas diabéticas

Como ya se mencionó, el estado diabético se generó por la administración de STZ por vía intraperitoneal. Los animales se organizaron en cinco grupos: control normal, control diabético y ratas diabéticas tratadas durante 30 días con las harinas de cladodios (200 mg/kg PC), de pulpa (73 mg/kg PC) y de semillas (160 mg/kg PC), por separado. Es necesario aclarar que no se muestran los datos correspondientes a los animales a los que se les administró la harina de pulpa porque complicaciones surgidas en el bioterio permitieron realizar registros solamente hasta el día 21 del período experimental.

II. 3. 1. Efectos sobre la condición general y parámetros hematológicos

En comparación con los animales normales, las ratas diabéticas presentaron polidipsia y poliuria, pelo hirsuto, ojos irritados, testículos y penes atrofiados y un estado de letargo. Toleraron bien la administración de los tres tipos de harinas ya que no se observaron efectos negativos sino que, por el contrario, se notó una leve mejora en la condición general de los animales que se tradujo especialmente en una mayor actividad física.

Como se puede ver en la *Figura 39 A*, el peso corporal de los animales diabéticos control, luego de 15 días de inducida la diabetes y al comienzo del período experimental, fue significativamente menor al de los animales normales y no varió luego de los tratamientos con la planta. La administración de las

harinas generó una tendencia a la disminución en la ganancia de peso corporal que fue más evidente en el caso de la harina de cladodios (Figura 39 B). En el caso de la harina de pulpa, el perfil determinado hasta el día 21 fue similar al de la harina de cladodios (datos no mostrados). Es necesario tener en cuenta que todos los animales consumieron la misma cantidad diaria de alimento.

Cuando los animales se sometieron a la eutanasia, se observó adiposidad abdominal y epididimal en los animales normales. Los animales diabéticos mostraron una drástica reducción en el tejido adiposo que no se revirtió luego del suministro de las harinas de *Opuntia*.

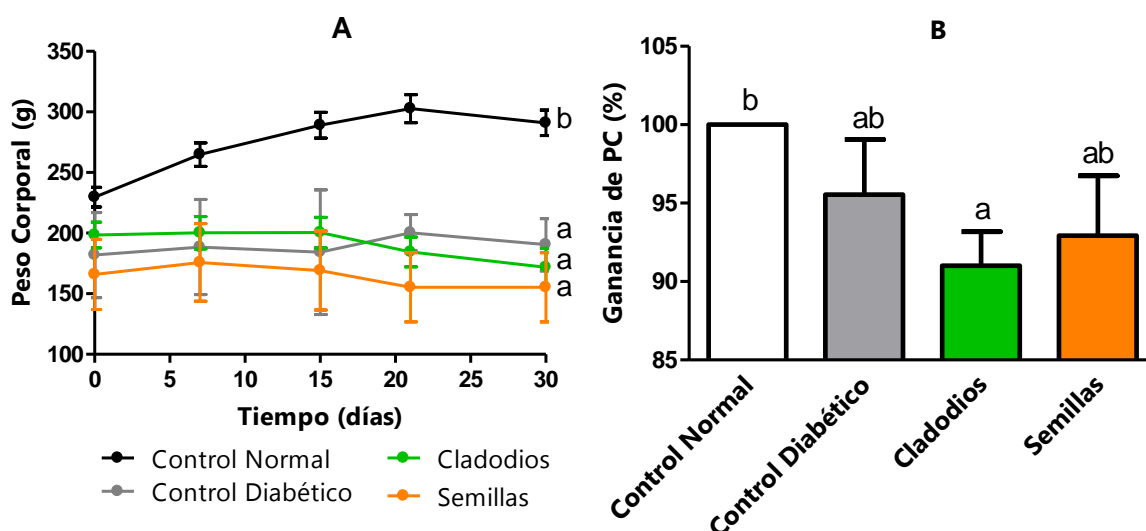


Figura 39. Efecto de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre el peso corporal (A) y sobre la ganancia de peso (B) de ratas diabéticas tratadas con las harinas de cladodios y de semillas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni (A) y con la de DMS Fisher (B). Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). PC: peso corporal.

En la *Tabla 8* se muestran los parámetros hematológicos de los animales diabéticos control y tratados con las harinas de cladodios y de semillas al finalizar el período experimental de 30 días. Los valores registrados fueron similares en todos los casos analizados.

Tabla 8. Efectos de *Opuntia megapotamica* sobre los parámetros hematológicos de ratas diabéticas tratadas con las harinas de cladodios y de semillas al finalizar el período experimental

Parámetros	Control Normal	Control Diabético	Cladodios	Semillas
Eritrocitos (*10 ⁶ /ul)	7,16 ± 0,46 a	8,0 ± 0,50 a	7,78 ± 0,39 a	6,37 ± 0,52 a
Hematocrito (%)	67,25 ± 4,37 a	78,16 ± 7,19 a	75,28 ± 3,61 a	62,10 ± 5,60 a
Hemoglobina (g/dl)	13,65 ± 0,45 a	15,00 ± 1,31 a	14,95 ± 0,94 a	12,57 ± 1,72 a
VCM (fl)	93,93 ± 0,96 a	97,69 ± 1,30 a	96,74 ± 0,85 a	97,85 ± 2,14 a
HCM (pg)	19,07 ± 0,10 a	18,75 ± 0,18 a	19,29 ± 0,18 a	19,78 ± 0,35 a
CHCM (g/dl)	20,30 ± 0,35 a	19,20 ± 0,62 a	20,10 ± 0,27 a	20,22 ± 0,21 a
RDW (%)	19,00 ± 0,49 a	18,85 ± 2,05 a	19,25 ± 0,65 a	18,60 ± 0,85 a

Los valores representan la media ± SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$); VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina; RDW: Índice de Distribución de Glóbulos Rojos.

II. 3. 2. Efectos sobre la glucosa e insulina plasmáticas y sobre la histología del páncreas

El efecto de la administración oral de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia de ratas diabéticas se muestra en la *Figura 40*. En el período experimental analizado, la administración de los distintos tipos de harina no tuvo efecto hipoglucemiante. Los resultados registrados hasta el día 21 con la harina de pulpa fueron similares a los obtenidos con las otras dos harinas (datos no mostrados).

Con respecto a los niveles de insulina plasmática, los valores en las ratas diabéticas control fueron menores que en los animales normales. Luego de la administración de las harinas de la planta, no se registraron cambios cuando se compararon todos los grupos entre sí (*Figura 41 A*) aunque se determinó un aumento significativo cuando se compararon los grupos diabéticos tratados con el grupo diabético control solamente (*Figura 41 B*).

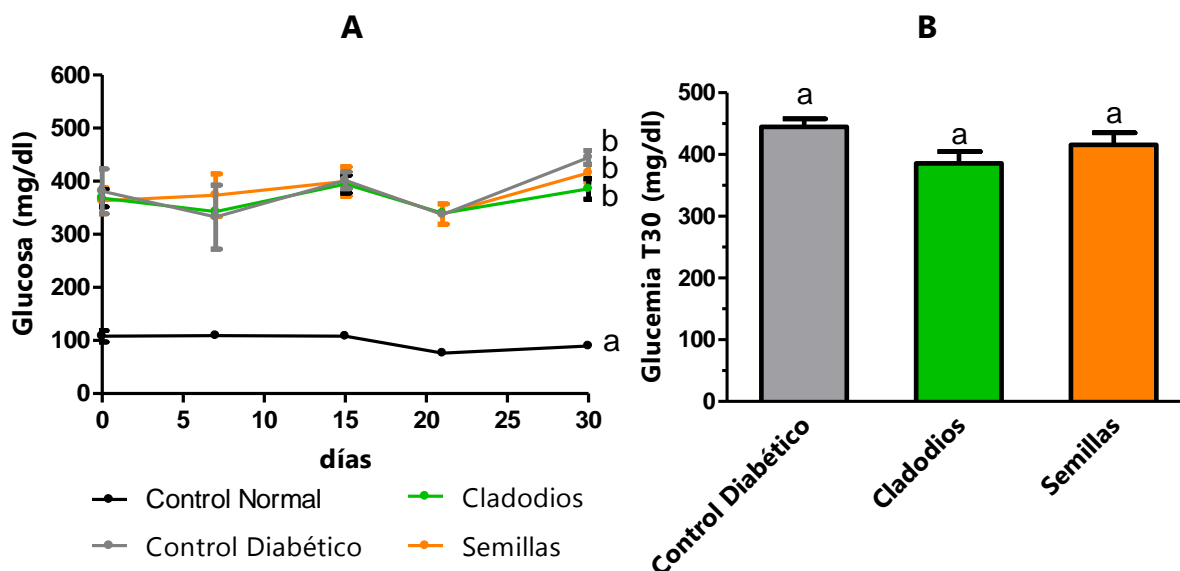


Figura 40. Efecto de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre la glucemia de ratas diabéticas tratadas con las harinas de cladodios y de semillas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

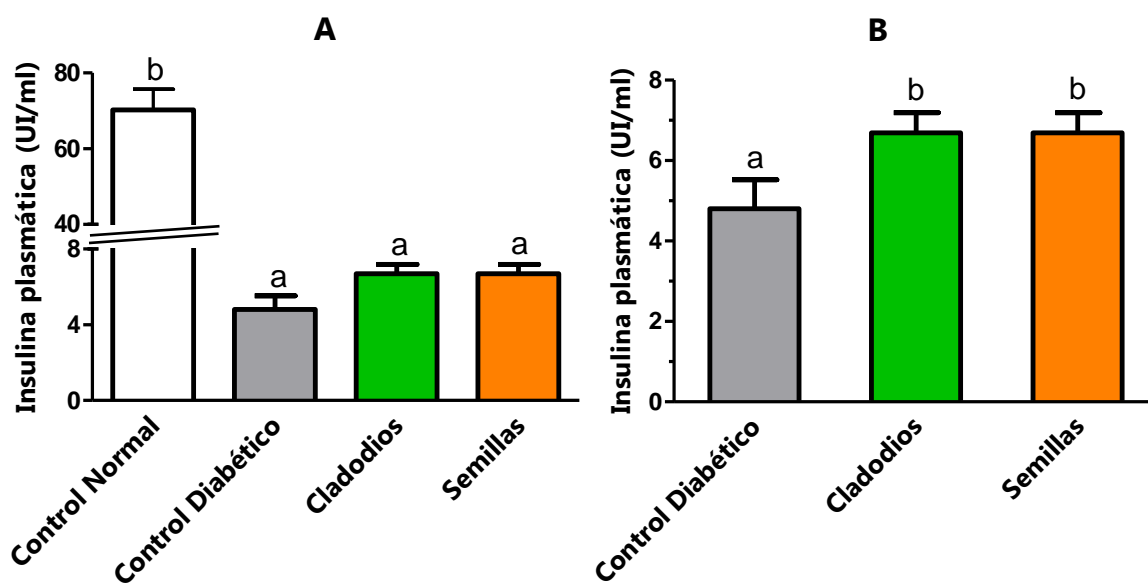


Figura 41. Efecto de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de insulina plasmática en ratas diabéticas tratadas con las harinas de cladodios y de semillas al finalizar el período experimental. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Complementariamente, se realizaron estudios histopatológicos del páncreas. Se hicieron cortes seriados del órgano completo debido a la disposición heterogénea de los islotes de Langerhans y a que la característica

reticular del páncreas murino no permite, luego de la extracción quirúrgica, distinguir fácilmente entre cabeza, istmo o cuello, cuerpo y cola.

En el caso de las ratas control normal, se visualizaron abundantes ácinos formados por células de tipo seroso de contornos circulares e irregulares y numerosos islotes de Langerhans (*Figura 42*). En el centro de la fotomicrografía se distingue un islote oval rodeado por una fina membrana, con límites poco precisos entre sus células y con núcleos basófilos redondos u ovals. En los animales diabéticos control se observó una desorganización estructural del tejido pancreático, inflamación y balonización de las células acinares y destrucción por necrosis confluyente de la mayoría de los islotes β . Luego de los tratamientos con las harinas de cladodios y de semillas se observó una leve mejora en la estructura pancreática.

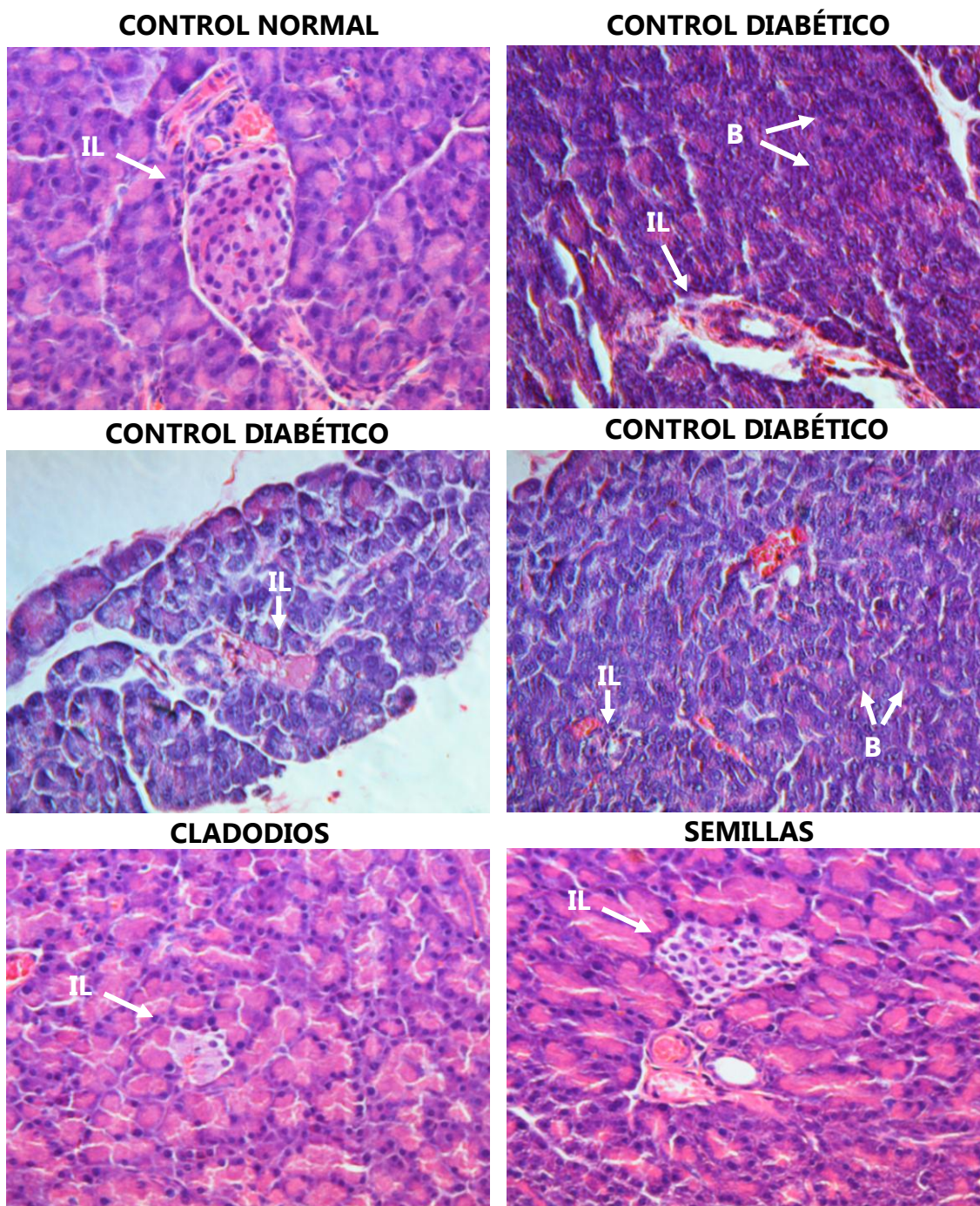


Figura 42. Fotomicrografías (400X) de secciones de páncreas de ratas normales y de ratas diabéticas controles y tratadas con las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* al finalizar el período experimental. Los órganos se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. B: Balonización; IL: Islote de Langerhans.

II. 3. 3. Efectos sobre los lípidos y las lipoproteínas plasmáticas

En las ratas con diabetes inducida con STZ, las concentraciones plasmáticas de TAG y de CT aumentaron gradualmente en función del tiempo y ya a los 15 días de la inyección de la droga, cuando se comenzaron a administrar las harinas de la planta, se había registrado un incremento significativo con respecto a las ratas normales (datos no mostrados).

Los efectos de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los lípidos y lipoproteínas plasmáticos, luego de 30 días de tratamiento, se presentan en la *Figura 43*. En las ratas diabéticas control, con respecto a las ratas normales, se determinaron aumentos marcados en TAG (81 %), CT (61 %), AGL (98 %), LDL-c (100 %) y VLDL (81 %). Luego de los tratamientos con las harinas de la planta, los TAG experimentaron una drástica disminución (alrededor del 60 %) con el consiguiente impacto en los niveles de las VLDL. Los AGL registraron una disminución del 30 % con la harina de cladodios y del 60 % con la harina de semillas. En lo referente al CT y a las LDL-c, se observó un efecto significativo de la harina de semillas (27 % y 44 %, respectivamente) que determinó un retorno a los valores de las ratas normales mientras que en el caso de la harina de cladodios, las disminuciones observadas fueron menores (20 % y 26 %, respectivamente). No se registraron variaciones estadísticamente significativas a nivel de las HDL-c entre los distintos grupos analizados. Con respecto al riesgo aterogénico calculado por el cociente CT/HDL-c, si bien las variaciones no fueron estadísticamente significativas entre

todos los grupos analizados, el nivel incrementado que se registró en las ratas diabéticas control retornó a los valores de las ratas normales luego de los tratamientos con ambas harinas.

Se estableció una relación entre los lípidos plasmáticos de los animales diabéticos tratados y los lípidos de las harinas de la planta con la finalidad de descartar la potencial incidencia de estos últimos sobre los resultados. Así, se determinó que en las dosis diarias suministradas, los lípidos de las harinas de cladodios y de semillas representan solamente el 0,41 % y el 1,52 %, respectivamente, de los lípidos plasmáticos de una rata.

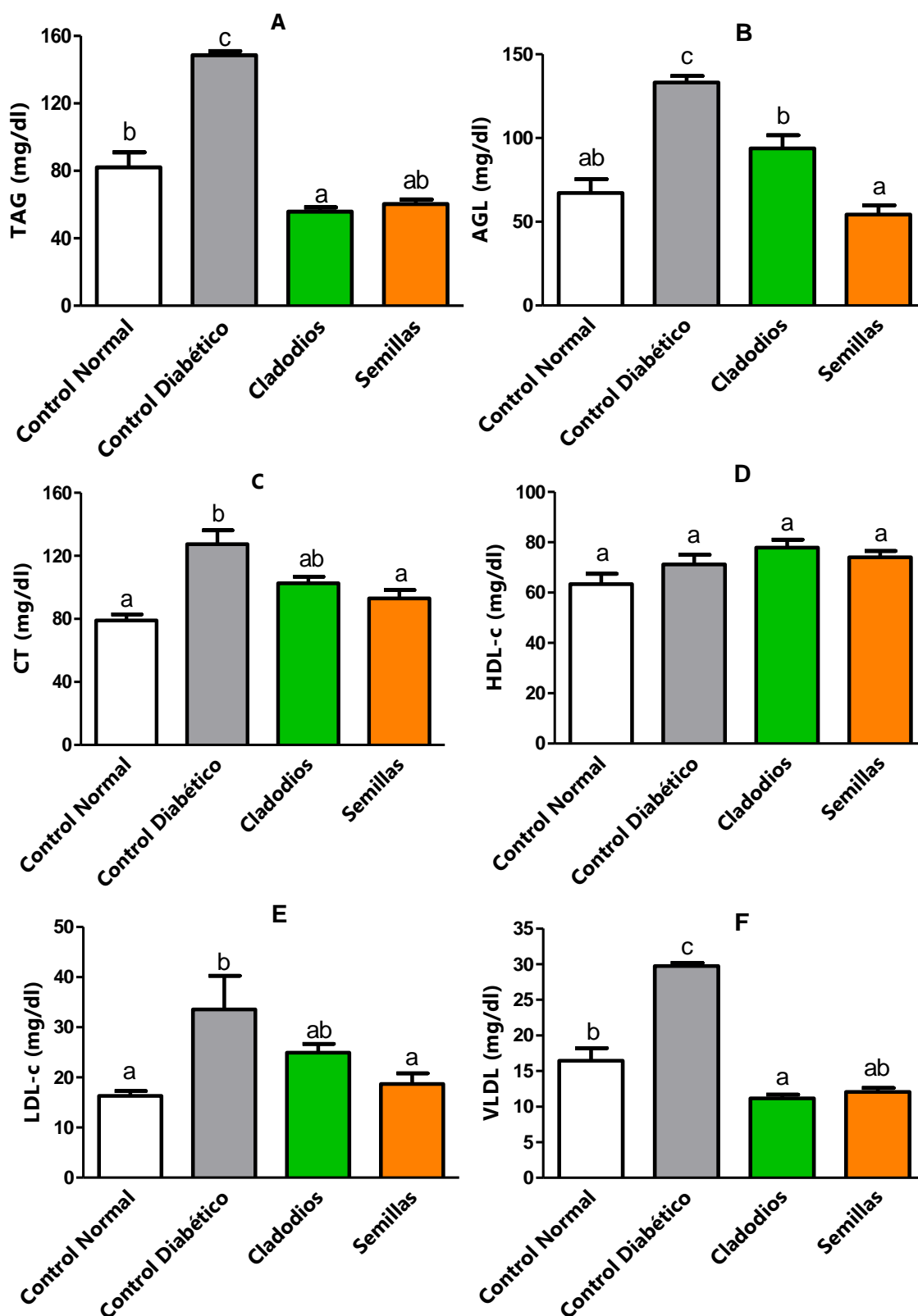


Figura 43. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de los lípidos y de las lipoproteínas plasmáticos. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). TAG: triacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; CT: colesterol total.

II. 3. 4. Efectos sobre la actividad de las enzimas hepáticas 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa y ácido graso sintasa

Se analizó la actividad de dos enzimas claves de la lipogénesis: la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que cataliza la reacción limitante de la biosíntesis de colesterol y la ácido graso sintasa (FAS), fundamental en la síntesis de ácidos grasos. En la *Figura 44* se muestra la actividad de ambas enzimas en los animales normales, en los diabéticos control y en los diabéticos tratados con las harinas de la planta. Con respecto a la enzima HMG-CoA reductasa, en todos los casos la actividad aumentó en función del tiempo de incubación (*Figura 43 A*). En comparación a los animales normales, los diabéticos control registraron valores más bajos de actividad enzimática que aumentaron luego del suministro de la harina de cladodios tal como se puede inferir de la *Figura 44 B* en la que se muestran los valores de actividad enzimática por minuto. En relación a la FAS, también se registraron aumentos en todos los grupos en función del tiempo de incubación (*Figura 44 C*) y cuando se comparó la actividad enzimática por minuto se pudo observar que la inducción de la diabetes generó una leve disminución que se acentuó luego del tratamiento con la harina de cladodios (*Figura 44 D*).

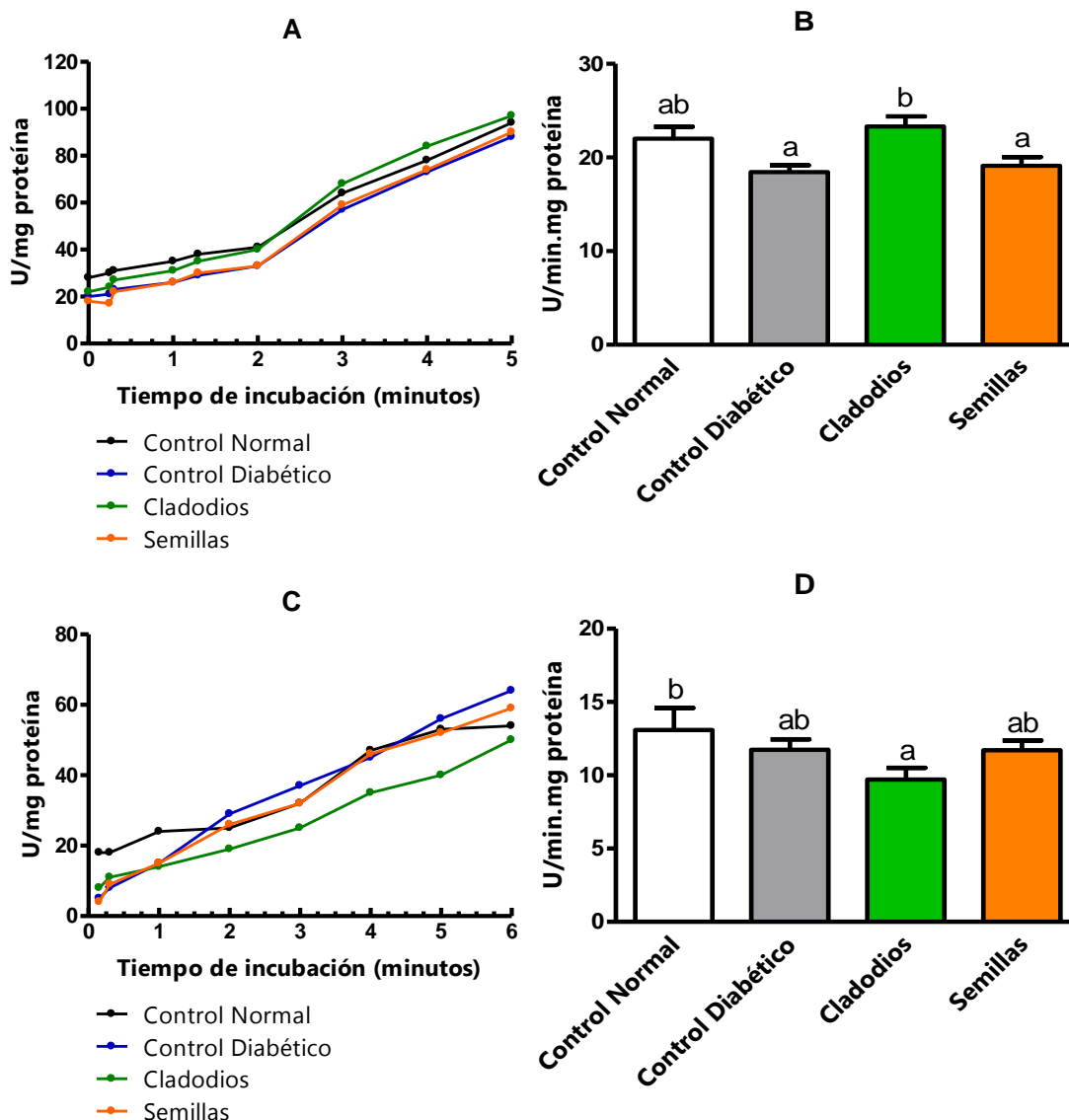


Figura 44. Efectos de la administración oral de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre la actividad de las enzimas hepáticas 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) (A y B) y ácido graso sintasa (FAS) (C y D). Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. En el gráfico D se muestran las diferencias estadísticas según la prueba *post hoc* de DMS Fisher. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos.

II. 3. 5. Efectos sobre parámetros de la función del hígado y sobre la histología y el contenido y la composición lipídica del órgano

En las distintas situaciones experimentales, no se observaron alteraciones macroscópicas y el peso relativo y el contenido proteico del órgano se mantuvieron constantes (Figura 45).

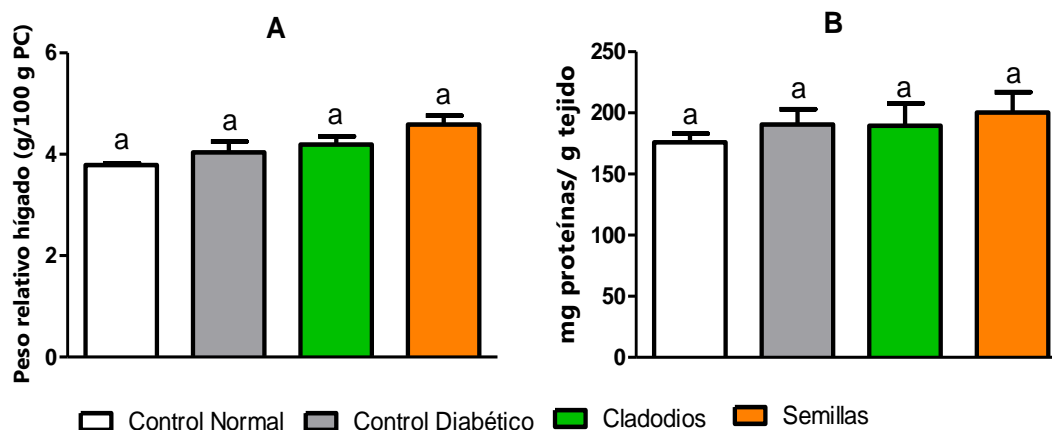


Figura 45. Efectos de la administración oral de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre el peso (A) y el contenido proteico (B) del hígado de ratas diabéticas al finalizar el período experimental. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la *Tabla 9* se muestran los efectos de la administración oral de las harinas de la planta sobre la actividad de distintas enzimas marcadoras que permiten conocer el estado general del hígado y del sistema biliar. En todos los casos, se observaron aumentos en los niveles enzimáticos de las ratas diabéticas control en comparación con los animales normales, especialmente en la gamma-glutamil transferasa (GGT) y en la alanina aminotransferasa (ALT). La harina de cladodios determinó una disminución significativa en los valores de todas las enzimas retornando ALT y la aspartato aminotransferasa (AST) a los valores registrados en las ratas control normal. Con respecto a la harina de

semillas, los descensos más significativos se observaron en la fosfatasa alcalina (ALP) y en GGT.

Tabla 9. Efectos de la administración oral de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles plasmáticos de enzimas marcadoras de la función hepática de ratas diabéticas

Parámetros	Control Normal	Control Diabético	Cladodios	Semillas
ALT (UI/l)	50,00 ± 2,83 a	192,33 ± 102,15 b	78,75 ± 22,53 a	119,00 ± 33,08 ab
AST (UI/l)	184,50 ± 14,29 a	333,00 ± 109,41 b	141,75 ± 32,45 a	273,75 ± 68,08 ab
ALP (U/l)	250,18 ± 12,99 a	674,89 ± 31,97 b	393,82 ± 33,14 a	313,54 ± 112,87 a
GGT (UI/l)	1,00 ± 0,001 a	6,33 ± 2,08 b	4,00 ± 1,83 ab	2,00 ± 0,82 a

Los valores representan la media ± SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALP: fosfatasa alcalina; GGT: gamma-glutamil transferasa.

La histología del hígado de las ratas control normal y de las ratas diabéticas controles y tratadas con las harinas de la planta se presentan en la *Figura 46*. En las ratas normales se pueden observar abundantes hepatocitos distribuidos de manera uniforme en todo el campo y también sinusoides que aparecen como zonas claras entre los cordones celulares. En el centro del preparado se distingue la tríada portal constituida por la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. En los preparados correspondientes a las ratas diabéticas control no se observó la disposición concéntrica típica de los hepatocitos y aparecieron áreas con vacuolización citoplasmática indicativas del inicio de la degeneración grasa y células hepáticas en estado de tumefacción con el citoplasma granular. Algunos hepatocitos mostraron núcleos excéntricos con vacuolas bien definidas característicos de un estado diabético avanzado. El efecto tóxico de la STZ se podría descartar si se tiene en cuenta que no se registraron alteraciones a nivel de la integridad nuclear. La administración de las

harinas de cladodios y de semillas tuvo un efecto positivo tal que los hígados de las ratas tratadas recuperaron la estructura observada en las ratas control normal. Los resultados en conjunto muestran una correlación entre el análisis de las enzimas marcadoras y los estudios histopatológicos.

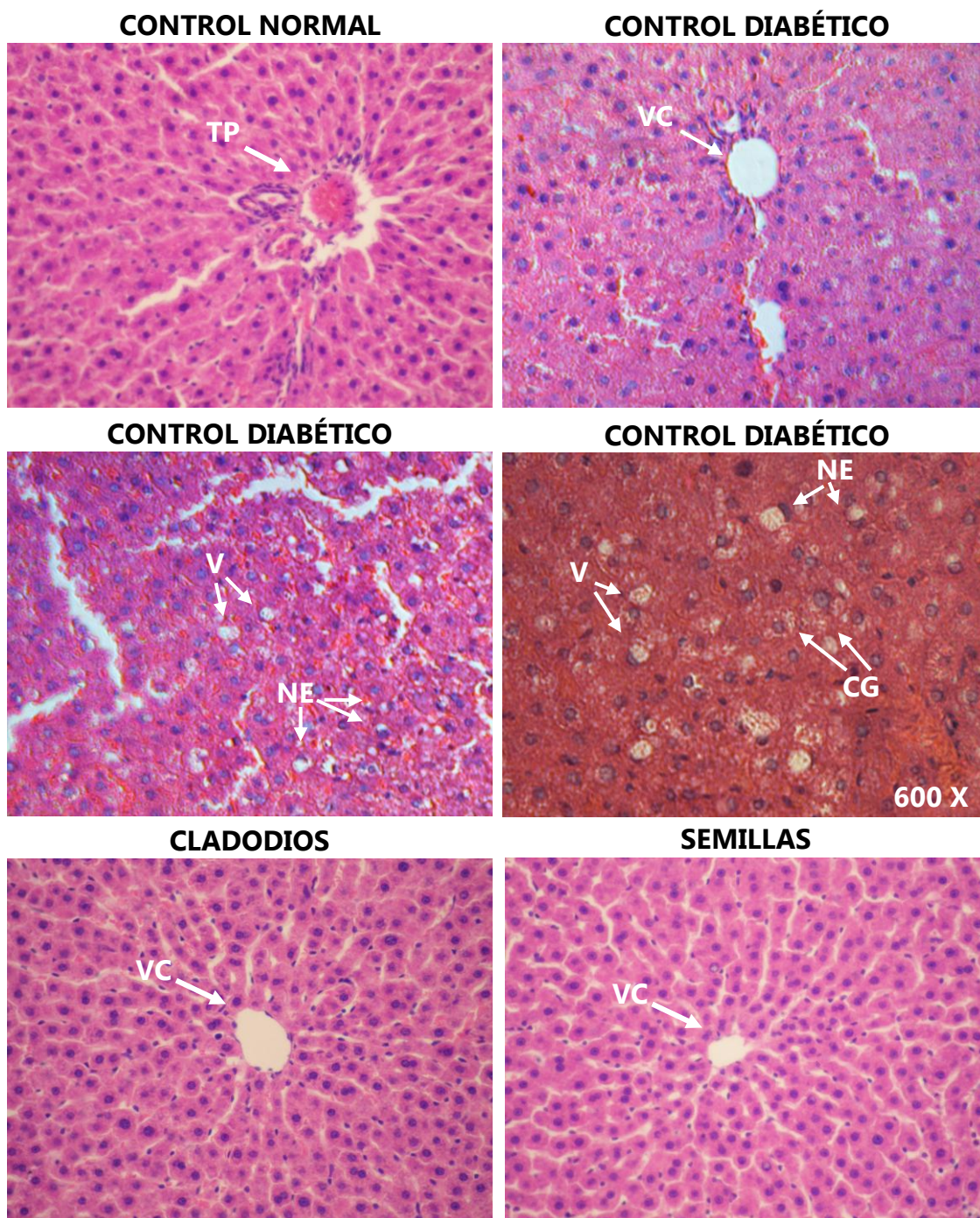


Figura 46. Fotomicrografías (400X) de secciones de hígados de ratas normales y de ratas diabéticas control y tratadas con las harinas de *Opuntia megapotamica*. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se cortaron en secciones de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. CG: citoplasma granular; NE: núcleo excéntrico; TP: tríada portal; V: vacuola; VC: vena central.

Los lípidos hepáticos se extrajeron como se describió en Materiales y Métodos y las distintas clases lipídicas se aislaron cromatográficamente. Las Figuras 47 y 48 ejemplifican la resolución de los fosfolípidos y de los lípidos neutros, respectivamente.

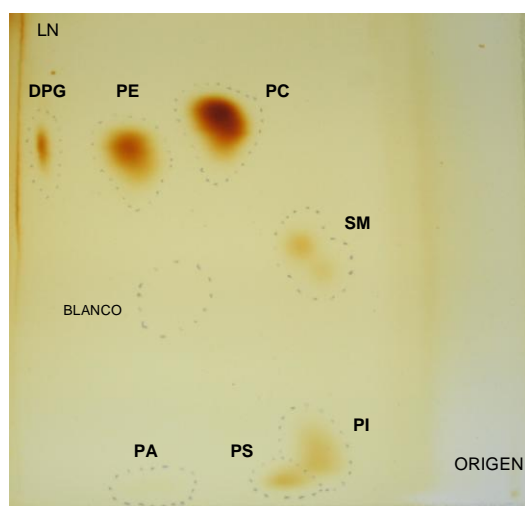


Figura 47. Separación cromatográfica en capa fina bidimensional de los fosfolípidos de hígado de rata. PA: ácido fosfatídico; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; DPG: difosfatidilglicerol; LN: lípidos neutros.

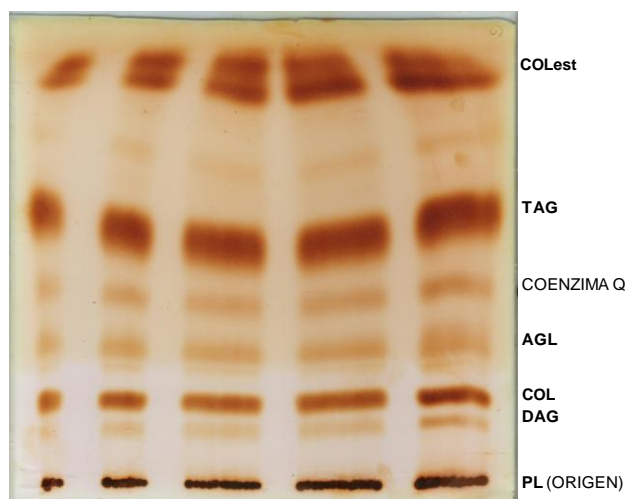


Figura 48. Separación cromatográfica en capa fina monodimensional de los lípidos neutros de hígado de rata. PL: fosfolípidos totales; DAG: diacilglicéridos; COL: colesterol; AGL: ácidos grasos libres; TAG: triacilglicéridos; COL est: ésteres de colesterol.

En la *Figura 49* se muestra el contenido de los fosfolípidos totales e individuales en las ratas normales, en las diabéticas control y en las tratadas con la planta. En todos los casos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina fueron los componentes principales seguidos por difosfatidilglicerol o cardiolipina, fosfatidilinositol y esfingomiélin. Fosfatidilserina y ácido fosfátidico fueron componentes minoritarios. Los niveles de fosfolípidos totales no variaron entre las diferentes situaciones experimentales analizadas. En los animales diabéticos control no se registraron cambios en los fosfolípidos individuales con respecto a los animales normales. Los tratamientos con las harinas de cladodios y de semillas no tuvieron efecto sobre los niveles de los distintos fosfolípidos.

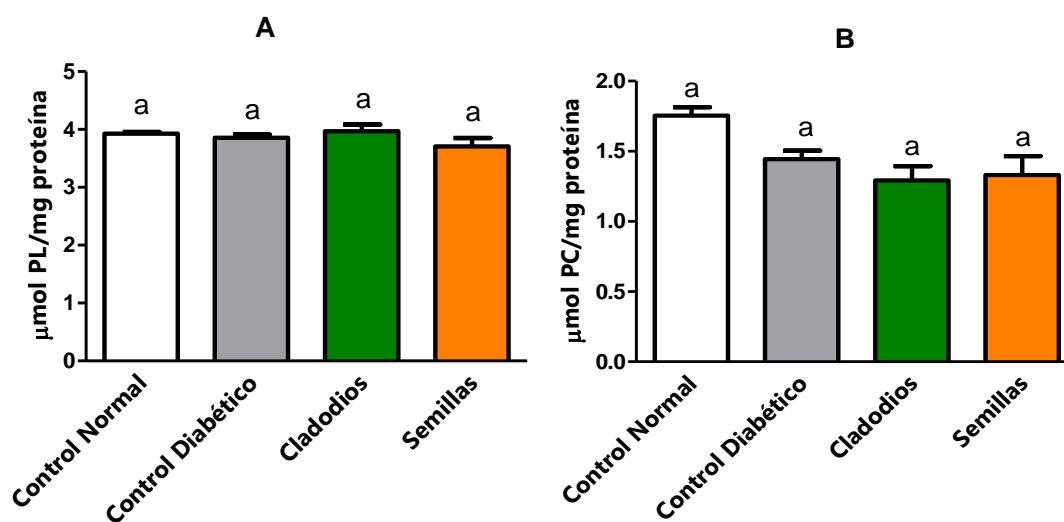


Figura 49. (Continúa en la página siguiente)

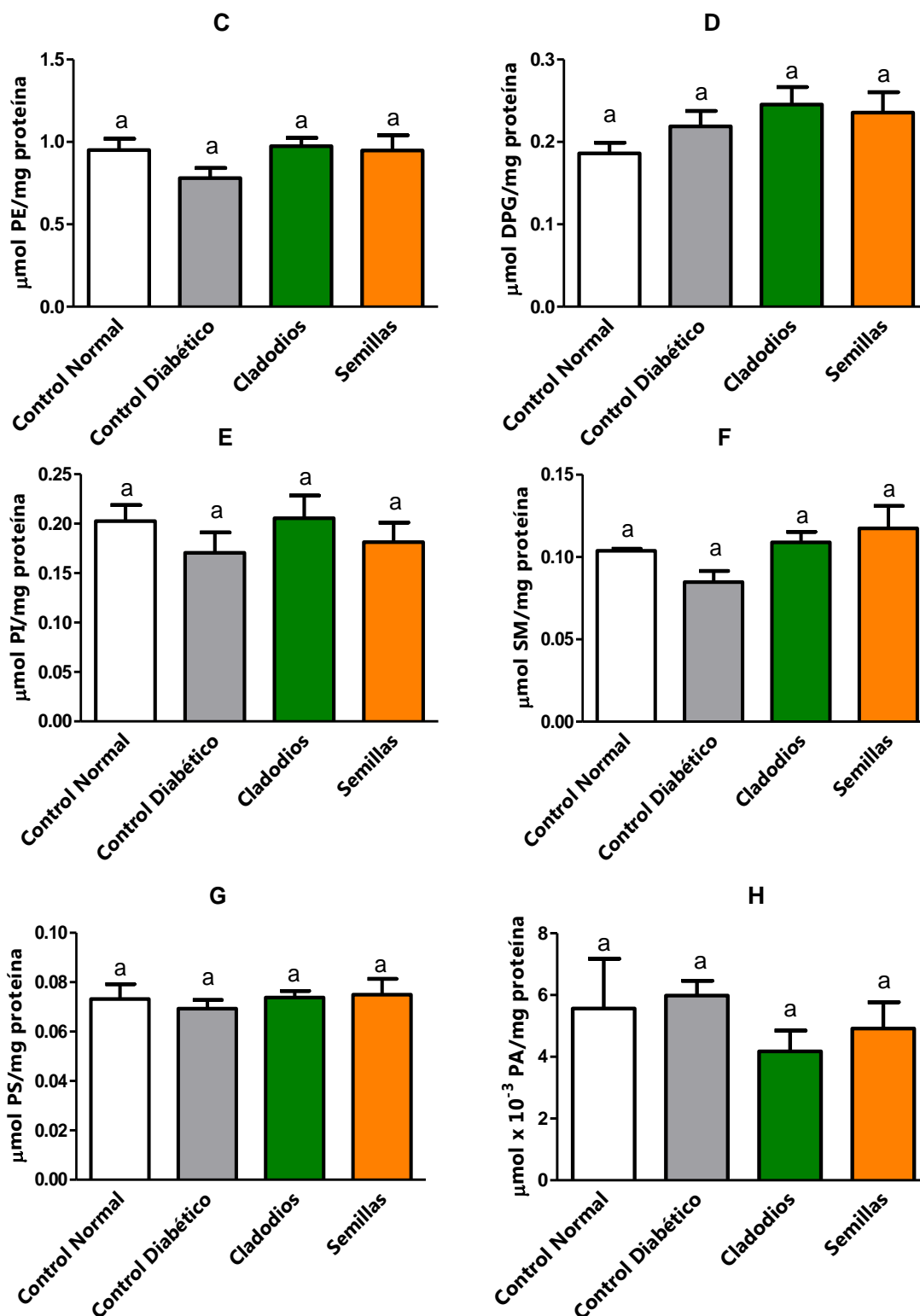


Figura 49. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre el nivel de los fosfolípidos hepáticos de ratas diabéticas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). PL: fosfolípidos totales; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; DPG: difosfatidilglicerol o cardiolipina; PI: fosfatidilinositol; SM: esfingomielinina; PS: fosfatidilserina; PA: ácido fosfatídico

En lo referente a los lípidos neutros, en los animales diabéticos control se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de TAG y de AGL con respecto a los animales normales (*Figura 50*). Luego de los tratamientos con las harinas de cladodios y de semillas, los contenidos de TAG se redujeron significativamente hasta alcanzar valores inferiores a los registrados en los animales normales. En el caso de los DAG se observó un perfil similar aunque más atenuado. La administración de la planta no tuvo efecto sobre los niveles de AGL ni de colesterol total (dosado con un kit enzimático).

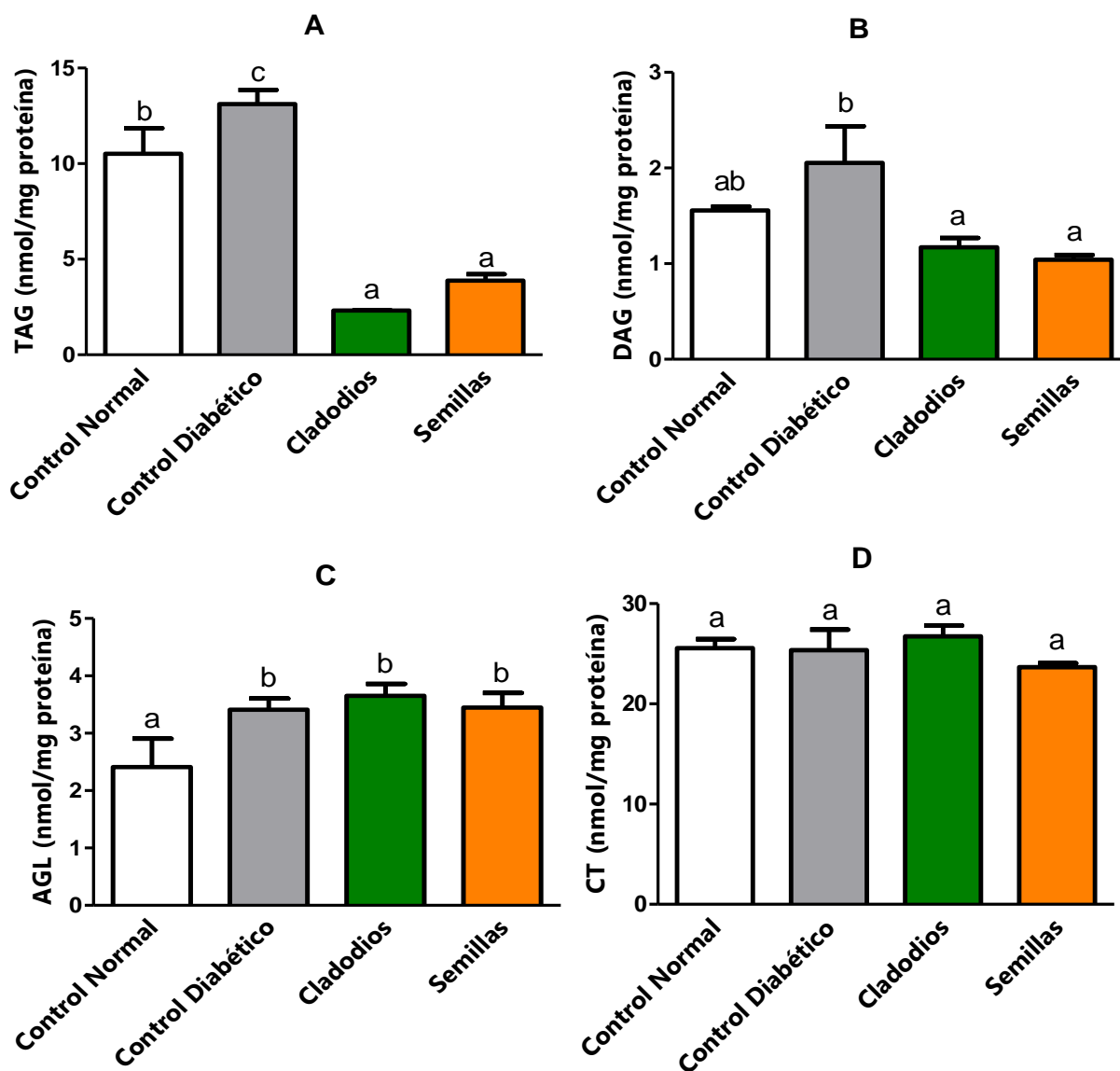


Figura 50. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de los lípidos neutros hepáticos de ratas diabéticas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). TAG: triacilglicéridos; DAG: diacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; CT: colesterol total.

El análisis composicional de los TAG mostró que en los animales normales y en los diabéticos control los ácidos palmítico, oleico y linoleico fueron los mayoritarios seguidos por los ácidos esteárico, araquidónico (20:4n6) y palmitoleico (16:1) (Tabla 10). En las ratas diabéticas control los porcentajes de 18:2 y de 20:4n6 fueron menores que los determinados en los animales

normales. Ambas harinas produjeron disminuciones significativas en los niveles de 18:1 y de 18:2 y un aumento en el nivel de 18:0. La harina de semillas determinó un aumento en 16:0 que llegó a representar casi el 50 % del total de acilos. El índice de insaturación fue menor en los animales diabéticos control que en los animales normales y disminuyó luego de la administración de la harina de semillas.

En la fracción de DAG, en los animales normales y en los diabéticos control los ácidos grasos mayoritarios fueron 16:0, 18:0, 18:1 y 20:4n6 que reunieron el 60 % del total de acilos (*Tabla 11*). Tanto la harina de cladodios como la de semillas aumentaron significativamente los niveles de 16:0 y de 18:0 y disminuyeron la cantidad de 20:4n6. Cuando se compararon los animales normales y los diabéticos control se observó que los niveles de SFA, MUFA y PUFA fueron semejantes lo que se reflejó en valores similares de UI. Los DAG de los animales tratados con ambas harinas mostraron menores índices de insaturación como consecuencia especialmente del descenso en los valores de MUFA y de PUFA.

En lo referente a los AGL, tanto en los animales normales como en los diabéticos control, los ácidos grasos mayoritarios fueron 16:0, 18:0 y 18:1 que representaron el 85 % del total de acilos (*Tabla 12*). Luego de los tratamientos con las harinas de cladodios y de semillas se registraron marcados aumentos en los porcentajes de 16:0 y de 18:0, una disminución significativa en 18:1 y un descenso en el UI.

Tabla 10. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos de los triacilglicéridos hepáticos de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Triacilglicéridos							
	Control Normal	Control Diabético	Cladodios	Semillas				
14:0	0,37 ± 0,01	a	0,06 ± 0,01	a	2,72 ± 0,23	c	1,32 ± 0,08	b
14:1	0,10 ± 0,01	a	0,25 ± 0,01	b	0,64 ± 0,05	c	0,07 ± 0,02	a
15:0	0,46 ± 0,01	ab	0,72 ± 0,23	ab	0,17 ± 0,01	a	1,04 ± 0,29	b
15:1	0,10 ± 0,01	a	0,09 ± 0,01	a	0,41 ± 0,01	b	0,09 ± 0,03	a
16:0	26,56 ± 0,23	a	32,02 ± 0,55	a	30,43 ± 0,06	a	48,84 ± 1,39	b
16:1	2,65 ± 0,02	b	4,09 ± 0,74	c	0,76 ± 0,06	a	2,62 ± 0,24	b
17:0	0,40 ± 0,01	a	1,16 ± 0,27	ab	2,96 ± 0,03	c	1,82 ± 0,56	bc
17:1	0,37 ± 0,01	a	0,78 ± 0,14	b	0,71 ± 0,01	b	0,32 ± 0,03	a
18:0	4,22 ± 0,04	a	3,23 ± 0,29	a	11,91 ± 1,64	b	13,35 ± 5,26	b
18:1	27,68 ± 0,24	bc	30,33 ± 2,72	c	23,50 ± 0,23	b	16,28 ± 1,74	a
18:2	25,56 ± 0,22	d	20,23 ± 0,72	c	11,31 ± 0,11	b	6,50 ± 0,63	a
18:3n6	0,54 ± 0,07	b	0,62 ± 0,01	b	0,21 ± 0,01	a	0,29 ± 0,09	a
18:3n3	1,59 ± 0,01	b	1,09 ± 0,26	ab	0,55 ± 0,12	a	0,95 ± 0,24	ab
20:3n6	0,25 ± 0,01	b	0,27 ± 0,03	b	2,37 ± 0,02	c	0,05 ± 0,01	a
20:4n6	3,69 ± 0,03	c	2,51 ± 0,04	b	3,51 ± 0,03	c	1,92 ± 0,06	a
20:4n3	0,54 ± 0,05	a	0,37 ± 0,01	a	0,45 ± 0,01	a	1,91 ± 0,17	b
20:5n3	1,39 ± 0,01	b	0,56 ± 0,01	a	2,92 ± 0,03	c	nd	
22:4n6	0,31 ± 0,01	a	0,17 ± 0,01	a	1,11 ± 0,01	a	1,01 ± 0,48	a
22:5n3	1,15 ± 0,07	a	1,69 ± 0,10	a	1,99 ± 0,69	a	1,18 ± 0,46	a
22:6n3	2,07 ± 0,93	b	0,76 ± 0,04	ab	1,38 ± 0,01	ab	0,46 ± 0,04	a
SFA (nmol/mg prot.)	10,11 ± 1,90	bc	14,66 ± 1,50	c	3,36 ± 0,03	a	7,71 ± 1,29	ab
MUFA (nmol/mg prot.)	9,76 ± 1,83	b	13,96 ± 0,38	c	5,74 ± 0,07	a	2,27 ± 0,52	a
PUFA (nmol/mg prot.)	11,68 ± 1,92	b	10,75 ± 1,23	b	1,80 ± 0,10	a	1,66 ± 0,30	a
UI	139,27 ± 4,91	c	109,97 ± 0,33	b	112,83 ± 3,35	b	70,01 ± 3,15	a

Los resultados se expresan en mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. nd: no detectado; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

Tabla 11. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos de los diacilglicéridos de hígado de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Diacilglicéridos							
	Control Normal		Control Diabético		Cladodios		Semillas	
14:0	0,36 ± 0,06	a	2,50 ± 0,18	b	2,21 ± 0,31	b	2,42 ± 0,33	b
14:1	0,31 ± 0,10	a	0,55 ± 0,06	a	0,61 ± 0,11	a	1,22 ± 0,29	b
15:0	2,40 ± 0,42	ab	2,84 ± 0,21	c	1,41 ± 0,04	a	1,97 ± 0,13	ab
15:1	0,05 ± 0,02	a	0,03 ± 0,01	a	0,32 ± 0,09	b	0,06 ± 0,01	a
16:0	22,85 ± 3,17	a	23,26 ± 1,72	a	36,41 ± 2,13	b	32,19 ± 1,81	b
16:1	4,63 ± 1,08	c	2,49 ± 0,18	b	0,22 ± 0,01	a	7,55 ± 0,43	d
17:0	0,40 ± 0,02	a	0,49 ± 0,07	ab	1,17 ± 0,13	c	0,86 ± 0,17	bc
17:1	5,09 ± 0,68	c	3,38 ± 0,25	b	0,48 ± 0,10	a	0,84 ± 0,56	a
18:0	14,38 ± 2,27	a	13,67 ± 0,24	a	29,44 ± 1,76	c	21,97 ± 2,71	b
18:1	13,43 ± 2,58	a	15,90 ± 1,18	a	13,40 ± 5,17	a	11,41 ± 1,94	a
18:2	5,67 ± 0,88	c	3,92 ± 0,07	b	1,31 ± 0,08	a	1,64 ± 0,46	a
18:3n6	4,32 ± 0,92	a	3,69 ± 0,27	a	2,05 ± 1,29	a	2,63 ± 0,55	a
18:3n3	0,11 ± 0,02	a	0,16 ± 0,02	a	0,67 ± 0,09	c	0,39 ± 0,09	b
20:4n6	11,53 ± 2,77	b	9,15 ± 2,32	b	2,01 ± 0,12	a	2,74 ± 0,62	a
20:4n3	4,53 ± 1,16	ab	6,74 ± 2,59	b	2,40 ± 0,51	a	3,76 ± 0,23	ab
22:4n6	3,61 ± 0,82	b	3,61 ± 0,27	b	1,00 ± 0,11	a	1,65 ± 0,17	a
22:5n3	1,39 ± 0,19	a	1,63 ± 0,37	a	1,08 ± 0,17	a	1,44 ± 0,70	a
22:6n3	4,95 ± 1,55	a	5,99 ± 0,44	a	3,83 ± 0,34	a	5,28 ± 0,64	a
SFA (nmol/mg prot.)	1,26 ± 0,19	a	1,75 ± 0,38	a	1,66 ± 0,31	a	1,24 ± 0,14	a
MUFA (nmol/mg prot.)	0,73 ± 0,05	b	0,91 ± 0,17	b	0,34 ± 0,08	a	0,44 ± 0,05	a
PUFA (nmol/mg prot.)	1,12 ± 0,05	b	1,45 ± 0,53	b	0,34 ± 0,08	a	0,41 ± 0,03	a
UI	176,05 ± 11,46	c	177,87 ± 11,52	c	84,12 ± 1,87	a	115,90 ± 4,70	b

Los resultados se expresan en mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

Tabla 12. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos libres de hígado de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Ácidos grasos libres							
	Control Normal		Control Diabético		Cladodios		Semillas	
16:0	55,06 ± 0,04	a	55,99 ± 0,13	a	64,32 ± 1,77	b	63,46 ± 2,27	b
16:1	2,75 ± 0,01	b	2,82 ± 0,62	b	0,86 ± 0,21	a	1,16 ± 0,04	a
17:0	1,29 ± 0,05	a	1,87 ± 0,07	ab	2,56 ± 0,37	b	2,50 ± 0,39	b
18:0	19,25 ± 0,29	a	19,17 ± 0,92	a	26,81 ± 1,29	b	27,80 ± 1,71	b
18:1	9,23 ± 0,72	b	9,66 ± 0,57	b	0,82 ± 0,02	a	0,23 ± 0,01	a
18:2	2,41 ± 0,25	b	3,34 ± 0,34	c	0,19 ± 0,03	a	0,15 ± 0,04	a
18:3n6	0,31 ± 0,01	a	0,19 ± 0,01	a	0,23 ± 0,04	a	0,22 ± 0,08	a
18:3n3	0,61 ± 0,01	a	0,65 ± 0,07	a	0,58 ± 0,09	a	0,68 ± 0,05	a
20:4n6	2,52 ± 0,18	b	2,22 ± 0,36	b	0,53 ± 0,17	a	0,48 ± 0,16	a
20:4n3	0,81 ± 0,01	c	0,23 ± 0,01	a	0,60 ± 0,02	b	nd	
22:4n6	1,50 ± 0,01	b	1,11 ± 0,01	ab	0,76 ± 0,12	a	0,82 ± 0,28	a
Otros	4,25 ± 0,02	c	2,76 ± 0,16	b	1,73 ± 0,14	a	2,50 ± 0,31	b
SFA (nmol/mg prot.)	1,82 ± 0,54	a	2,62 ± 0,19	ab	3,42 ± 0,38	b	3,23 ± 0,49	b
MUFA(nmol/mg prot.)	0,29 ± 0,07	b	0,43 ± 0,08	c	0,06 ± 0,01	a	0,05 ± 0,01	a
PUFA (nmol/mg prot.)	0,20 ± 0,07	b	0,26 ± 0,01	b	0,11 ± 0,02	a	0,08 ± 0,01	a
UI	44,49 ± 0,61	b	40,06 ± 0,86	b	13,82 ± 0,91	a	11,04 ± 2,15	a

Los resultados se expresan en mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. nd: no detectado; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

Al igual que en el caso de los lípidos plasmáticos, se estableció una relación entre los niveles de los lípidos de las harinas de la planta y los lípidos hepáticos de las ratas diabéticas tratadas. Se determinó que, en las dosis diarias suministradas, los fosfolípidos de las harinas de cladodios y de semillas representan solamente el 0,014 % y el 0,005 %, respectivamente, de los fosfolípidos totales del hígado de una rata. Los lípidos neutros totales de las harinas de cladodios y de semillas representan el 0,52 % y el 1,94 %, respectivamente, del total de lípidos neutros hepáticos. Además, la composición de ácidos grasos de los lípidos de las harinas de la planta es muy diferente al

perfil de acilos determinado en los lípidos hepáticos. Este análisis permite descartar la incidencia de los lípidos de la planta sobre los resultados.

II. 3. 6. Efectos sobre parámetros de la función del riñón y sobre la histología y el contenido y la composición lipídica del órgano

Teniendo en cuenta que el riñón es uno de los órganos más afectados por la diabetes, se evaluaron distintos aspectos del mismo. En ninguno de los grupos de animales analizados se observaron alteraciones del órgano a nivel macroscópico. El peso relativo fue significativamente más alto en los animales diabéticos control y no se registraron cambios con el suministro de las harinas de la planta (*Figura 51 A*). El contenido proteico se mantuvo constante en las diferentes situaciones experimentales (*Figura 51 B*).

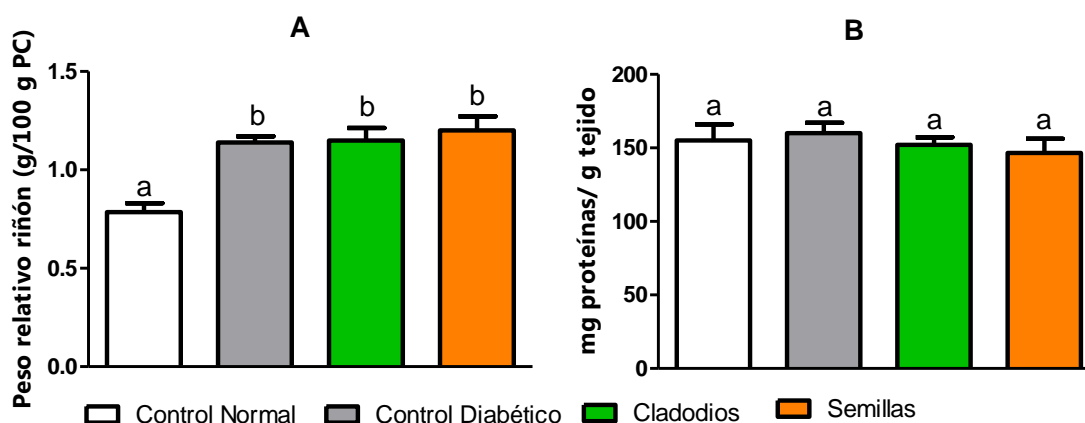


Figura 51. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre el peso relativo (A) y el contenido proteico (B) de los riñones de ratas diabéticas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Cuando se compararon los niveles plasmáticos de creatinina y de urea, en ratas normales y en ratas diabéticas control, se observó un leve aumento en los animales diabéticos que no fue estadísticamente significativo (Figura 52). Los tratamientos con las harinas de cladodios y de semillas tendieron a llevar los valores de ambos compuestos a los registrados en los animales normales.

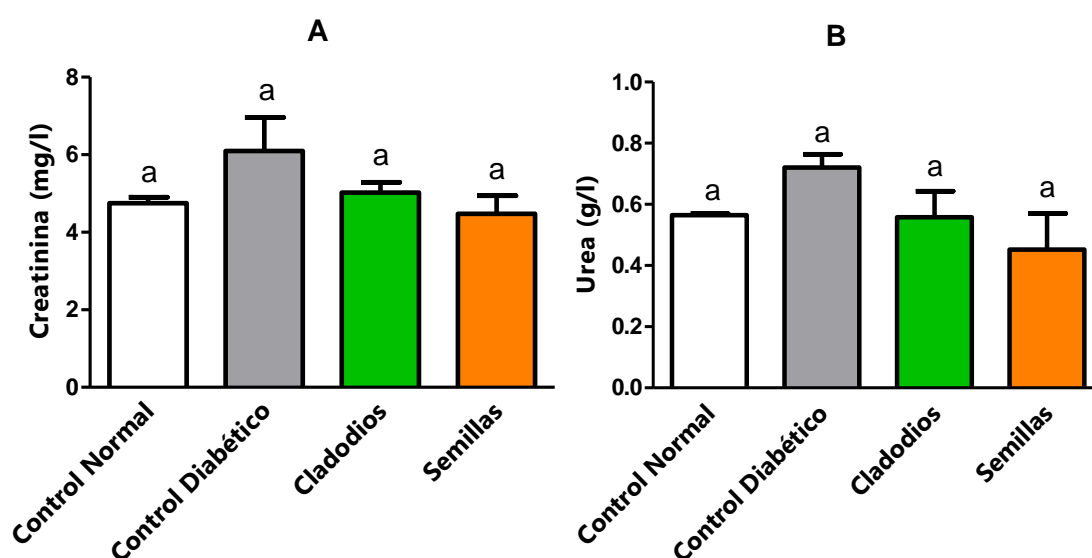


Figura 52. Efectos de la administración oral de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de creatinina (A) y de urea (B) plasmáticos de ratas diabéticas al finalizar el período experimental. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la *Tabla 13* se muestran los efectos de *Opuntia megapotamica* sobre diferentes parámetros analizados en orina. En los animales diabéticos control, cuando se los comparó con el grupo normal, se determinaron aumentos significativos en el volumen de orina eliminado en 24 horas, en la glucosuria, en la albuminuria y en el aclaramiento de creatinina sugiriendo un posible compromiso glomerular derivado del estado diabético. En general, las harinas

de la planta no tuvieron efecto sobre los parámetros medidos salvo en la albuminuria y en el aclaramiento de creatinina cuyos valores registraron una leve disminución. El ionograma urinario se mantuvo constante en todos los grupos de animales aunque la potasiuria aumentó con la inducción de la diabetes volviendo a los valores normales luego del tratamiento con la harina de semillas.

Tabla 13. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre parámetros urinarios de ratas diabéticas

Parámetros	Control Normal	Control Diabético	Cladodios	Semillas
V (ml/24 hs)	12,13 ± 3,19 a	28,70 ± 5,30 b	29,38 ± 5,47 b	26,88 ± 8,02 b
Glucosuria (g/l)	nd	86,75 ± 5,59 a	82,60 ± 8,39 a	91,67 ± 12,32 a
Albuminuria (mg/24 hs)	9,42 ± 4,34 a	114,85 ± 42,01 b	75,29 ± 27,84 b	76,45 ± 27,87 b
Ccr (ml/min/kg PC)	0,57 ± 0,21 a	1,80 ± 0,51 b	1,35 ± 0,22 b	1,23 ± 0,26 ab
Natriuria (mEq/l)	54,50 ± 12,50 a	47,50 ± 12,87 a	47,51 ± 3,32 a	54,51 ± 12,58 a
Potasiuria (mEq/l)	78,50 ± 2,50 a	92,73 ± 13,45 b	74,95 ± 4,29 a	92,02 ± 11,31 b
Cloruria (mEq/l)	51,00 ± 8,03 a	48,25 ± 13,79 a	43,00 ± 9,13 a	54,52 ± 14,36 a

Los valores representan la media ± SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). V: volumen de orina; Ccr: aclaramiento de creatinina.

Complementariamente, se llevaron a cabo estudios histopatológicos cuyos resultados se muestran en la *Figura 53*. En los preparados histológicos de las ratas normales se visualizaron los corpúsculos renales que se presentan como estructuras esferoidales relativamente grandes y que están rodeados por los túbulos contorneados en su mayoría ovalados y circulares. En las ratas diabéticas control se observó un engrosamiento de las paredes capilares de los glomérulos y un aumento estadísticamente significativo del área glomerular que podrían relacionarse con el deterioro inicial producido por la enfermedad y que

están en consonancia con el ya mencionado aumento en los valores del aclaramiento de creatinina. Los tratamientos con las harinas de la planta no tuvieron efecto a nivel de las paredes de los capilares pero disminuyeron los valores del área glomerular. Tanto en las ratas diabéticas control como en las tratadas se observó la presencia de material proteináceo en la luz de algunos túbulos que se puede correlacionar con los altos niveles de albuminuria determinados. El hecho de que los túbulos renales no presenten alteraciones permitiría descartar un efecto tóxico secundario de la STZ.

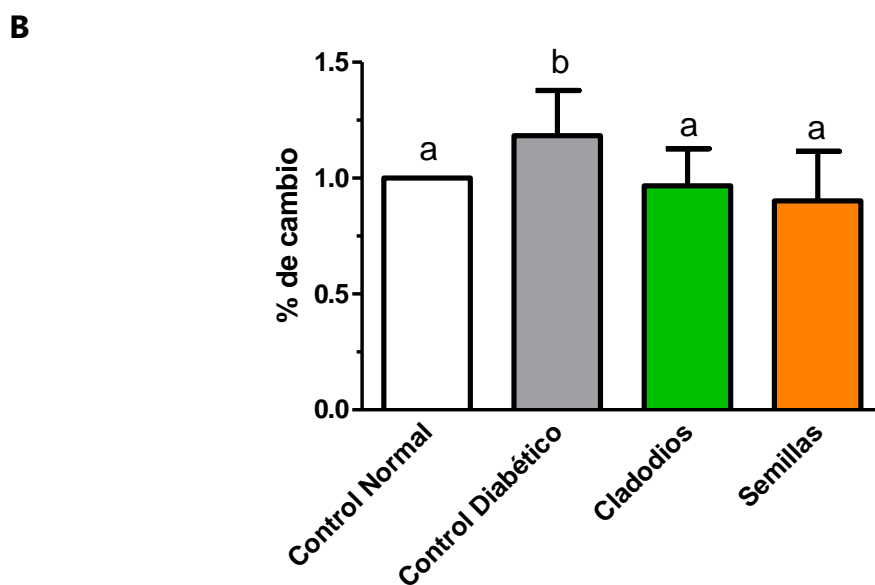
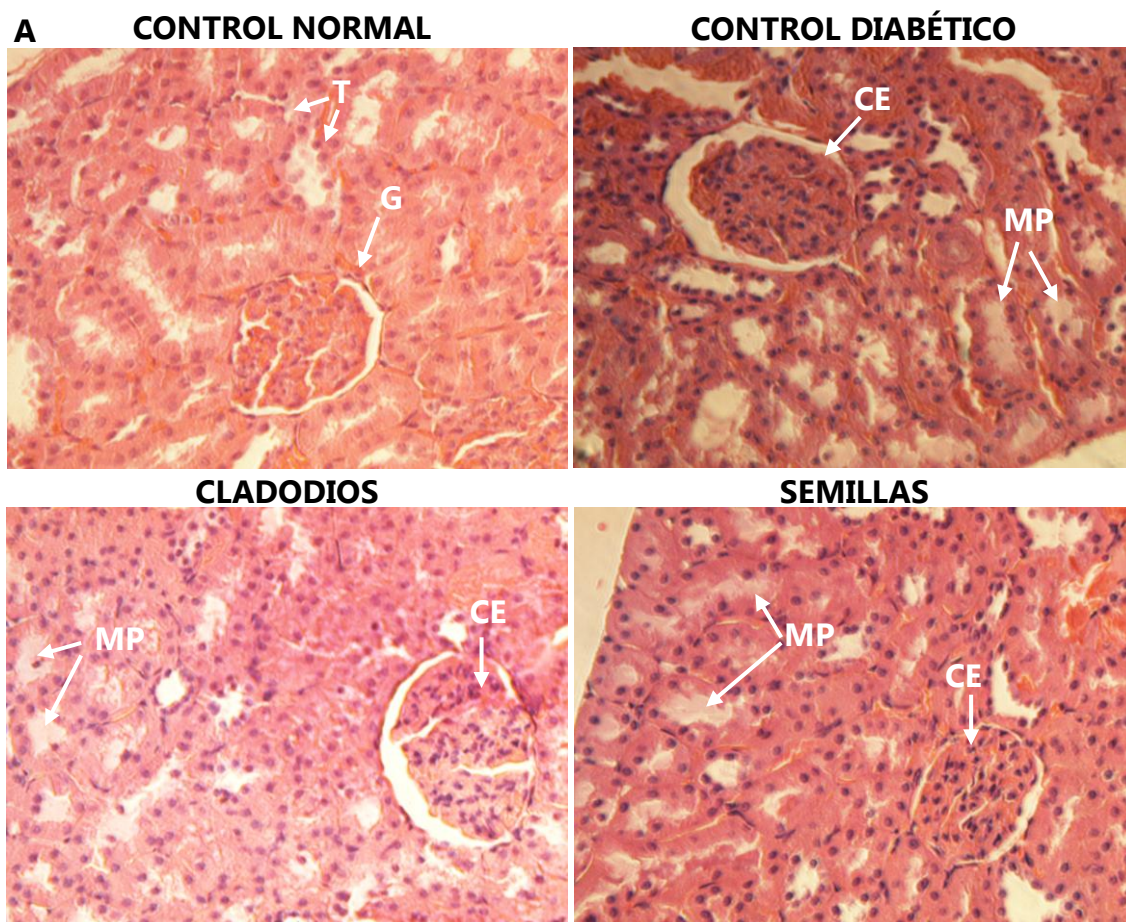


Figura 53. Fotomicrografías (400X) de secciones de riñones de ratas normales y diabéticas control y tratadas con *Opuntia megapotamica* (A). Área glomerular (B). Las muestras se fijaron en formaldehído al 10 %, se lavaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se cortaron en secciones de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. CE: capilares con paredes engrosadas; G: Glomérulo o corpúsculo renal; MP: material proteináceo; T: túbulo renal. Los valores se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El análisis de los lípidos renales mostró que el contenido total de fosfolípidos fue similar en los animales normales, diabéticos control y diabéticos tratados con la planta (*Figura 54*). En todos los casos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina fueron los fosfolípidos mayoritarios seguidos por esfingomielinina, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y ácido fosfatídico. La administración de las harinas de cladodios y de semillas no tuvo efecto sobre el nivel de los fosfolípidos individuales.

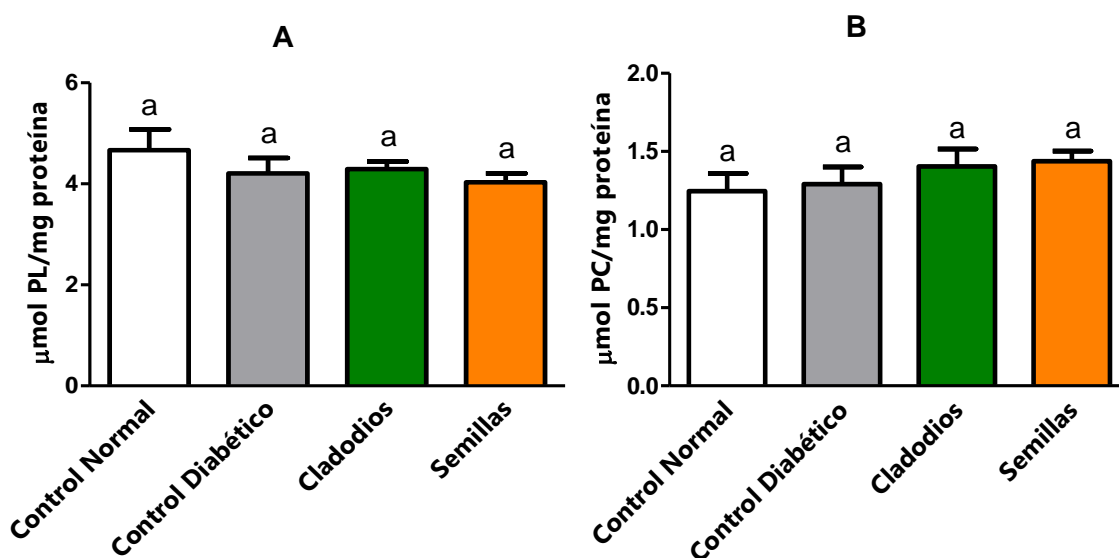


Figura 54. (Continúa en la página siguiente)

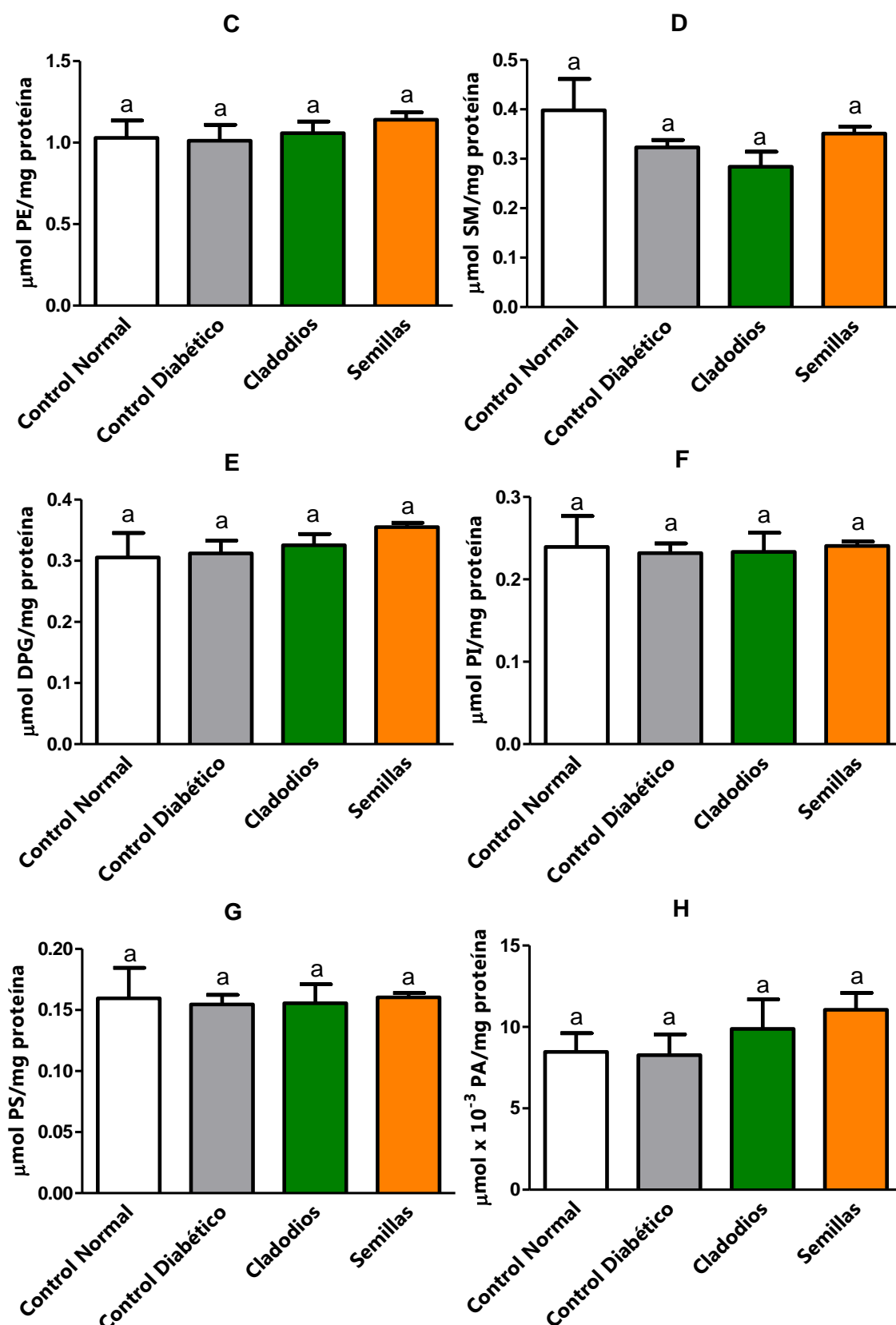


Figura 54. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre el nivel de los fosfolípidos renales de ratas diabéticas. Los valores representan la media \pm S.D. de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). PL: fosfolípidos totales; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; SM: esfingomielina; DPG: difosfatidilglicerol o cardiolipina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PA: ácido fosfatídico.

Con respecto a los lípidos neutros, en los animales diabéticos control se observó un aumento en los niveles de TAG, DAG y AGL cuando se comparó con las ratas normales (*Figura 55*). Luego de la administración de la harina de cladodios, los valores de TAG y DAG tendieron a acercarse a aquellos registrados en los animales normales. La harina de semillas produjo efectos similares más significativos. En los AGL la disminución más marcada se observó con la harina de cladodios. Los niveles de colesterol (dosado con un kit enzimático) fueron similares en todas las condiciones analizadas.

Tanto en los animales normales como en los diabéticos control, los principales ácidos grasos de los TAG fueron 16:0, 18:1, 18:2 y 18:0 que reunieron alrededor del 90 % del total (*Tabla 14*). La administración de ambas harinas significativamente disminuyó los niveles de 16:0, aumentó los niveles de 18:2 y de 20:4n6 e incrementó los índices de insaturación. Además, la harina de cladodios determinó un aumento en 18:3n3.

Con respecto a los DAG, en las ratas normales los principales ácidos grasos fueron 18:2 y 18:1 seguidos por 16:0, 18:0 y 20:4n6 que representaron en conjunto alrededor del 70 % del total de acilos (*Tabla 15*). En las ratas diabéticas control los ácidos grasos mayoritarios fueron los mismos pero se registró un aumento significativo en 18:2 y un marcado descenso en 18:3n3. Se observó además una leve tendencia al aumento en 18:0 y 18:1. La administración de la harina de cladodios determinó una disminución significativa en 18:2 que retornó a los valores normales y una tendencia al

aumento en 18:0. El efecto de la harina de semillas se observó solamente en una tendencia al aumento en los niveles de 18:0 y de 18:1. Los valores de UI fueron similares en las distintas situaciones experimentales.

En lo referente a la fracción de AGL, tanto en las ratas normales como en las ratas diabéticas control los ácidos grasos mayoritarios fueron 16:0 y 18:0, que reunieron cerca del 80 % del total de acilos, seguidos por 18:1 y 18:2 (*Tabla 16*). La inducción de la diabetes generó descensos marcados en 16:0, 18:3n3 y 20:4n6 y un aumento significativo en 18:0. Luego de los tratamientos con ambas harinas se registraron disminuciones significativas en los niveles de 16:0 y 18:0 y aumentos marcados en 18:1, 18:2, 18:3n3, 20:4n6 que se reflejaron en incrementos en el índice de insaturación.

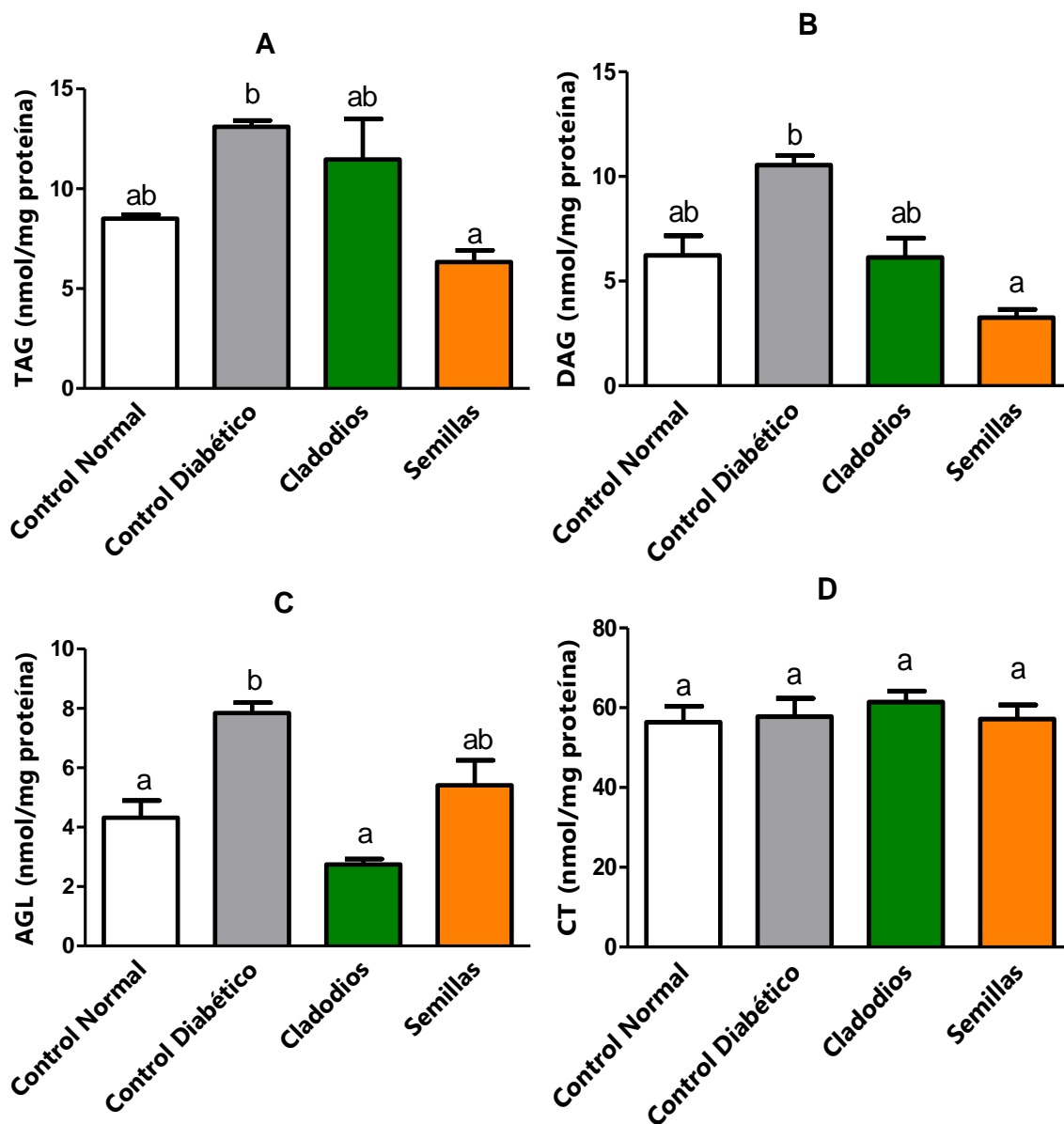


Figura 55. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los niveles de los lípidos neutros renales de ratas diabéticas. Los valores representan la media \pm SD de seis muestras independientes y se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). TAG: triacilglicéridos; DAG: diacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; CT: colesterol total.

Tabla 14. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos de los triacilglicéridos renales de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Triacilglicéridos							
	Control Normal		Control Diabético		Cladodios		Semillas	
14:0	1,33 ± 0,15	c	0,40 ± 0,13	b	0,01 ± 0,001	a	0,48 ± 0,06	b
14:1	0,07 ± 0,02	a	nd		5,72 ± 2,23	b	nd	
15:0	0,68 ± 0,28	b	0,54 ± 0,10	ab	0,29 ± 0,15	ab	0,16 ± 0,02	a
15:1	0,14 ± 0,01	b	nd		nd		0,05 ± 0,01	a
16:0	36,47 ± 8,79	b	35,13 ± 1,08	b	9,00 ± 1,16	a	15,30 ± 1,95	a
16:1	3,42 ± 1,28	ab	4,99 ± 1,74	b	0,48 ± 0,06	a	0,71 ± 0,21	a
17:0	0,92 ± 0,21	a	1,16 ± 0,24	a	1,00 ± 0,35	a	0,46 ± 0,33	a
17:1	0,06 ± 0,01	b	0,47 ± 0,01	d	0,003 ± 0,001	a	0,10 ± 0,01	c
18:0	11,90 ± 2,87	a	10,49 ± 0,83	a	8,88 ± 1,15	a	10,75 ± 1,63	a
18:1	26,12 ± 5,46	a	23,72 ± 0,73	a	21,36 ± 0,60	a	25,70 ± 2,04	a
18:2	16,42 ± 6,41	a	20,12 ± 0,62	a	28,50 ± 4,82	ab	36,12 ± 6,04	b
18:3n6	0,38 ± 0,06	a	0,75 ± 0,20	ab	0,95 ± 0,21	b	0,93 ± 0,12	b
18:3n3	1,29 ± 0,31	a	0,49 ± 0,02	a	8,57 ± 3,04	b	0,71 ± 0,09	a
20:3n6	0,16 ± 0,02	a	0,42 ± 0,18	ab	1,73 ± 0,99	b	1,12 ± 0,37	ab
20:4n6	0,30 ± 0,07	a	0,64 ± 0,02	a	5,27 ± 1,35	b	3,97 ± 0,31	b
20:4n3	0,12 ± 0,03	a	0,55 ± 0,03	c	0,43 ± 0,06	b	0,36 ± 0,03	b
20:5n3	0,05 ± 0,01	a	0,13 ± 0,002	a	2,16 ± 0,98	b	1,83 ± 0,41	b
22:4n6	0,09 ± 0,01	a	nd		0,18 ± 0,07	a	0,37 ± 0,10	b
22:5n3	0,03 ± 0,01	a	nd		1,14 ± 0,57	b	0,20 ± 0,01	a
22:6n3	0,05 ± 0,01	a	nd		4,31 ± 0,55	b	0,67 ± 0,01	a
SFA (nmol/mgr proteína)	13,13 ± 3,25	b	18,75 ± 0,97	b	6,69 ± 2,46	a	5,09 ± 0,27	a
MUFA (nmol/mgr proteína)	7,59 ± 1,42	ab	11,45 ± 0,44	b	9,40 ± 2,41	b	5,01 ± 0,42	a
PUFA (nmol/mgr proteína)	4,83 ± 1,55	a	9,07 ± 0,54	ab	18,33 ± 5,82	b	8,90 ± 2,53	a
UI	73,38 ± 17,30	a	82,55 ± 0,34	a	194,42 ± 17,62	c	144,07 ± 9,37	b

Los resultados se expresan en mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. nd: no detectado; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

Tabla 15. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos de los diacilglicéridos renales de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Diacilglicéridos							
	Control Normal		Control Diabético		Cladodios		Semillas	
14:0	0,16 ± 0,02	c	0,01 ± 0,001	a	0,06 ± 0,01	b	0,01 ± 0,001	a
14:1	0,24 ± 0,03	a	0,01 ± 0,001	a	0,31 ± 0,03	a	0,30 ± 0,17	a
15:0	0,17 ± 0,03	a	0,19 ± 0,09	a	0,12 ± 0,01	a	0,10 ± 0,01	a
15:1	2,65 ± 1,34	a	0,08 ± 0,01	a	0,80 ± 0,06	a	0,29 ± 0,03	a
16:0	9,53 ± 1,23	a	10,42 ± 1,74	a	10,32 ± 2,05	a	8,44 ± 2,07	a
16:1	4,07 ± 1,31	a	2,20 ± 0,37	a	1,39 ± 0,13	a	1,32 ± 0,78	a
17:0	0,42 ± 0,06	a	0,38 ± 0,16	a	0,49 ± 0,05	a	0,37 ± 0,13	a
17:1	3,08 ± 1,51	a	0,13 ± 0,02	a	0,81 ± 0,08	a	0,39 ± 0,04	a
18:0	6,75 ± 0,23	a	8,84 ± 1,39	ab	11,31 ± 1,33	b	10,42 ± 1,16	b
18:1	13,30 ± 0,64	a	15,46 ± 2,99	ab	13,73 ± 1,32	ab	17,87 ± 2,80	b
18:2	36,73 ± 3,26	a	50,78 ± 7,70	b	36,64 ± 3,51	a	47,44 ± 6,70	b
18:3n6	3,74 ± 0,88	b	0,87 ± 0,15	a	1,83 ± 0,18	a	0,38 ± 0,15	a
18:3n3	2,82 ± 0,48	b	0,73 ± 0,12	a	0,83 ± 0,08	a	0,76 ± 0,42	a
20:3n6	1,13 ± 0,21	a	1,32 ± 0,21	a	1,16 ± 0,11	a	1,44 ± 0,14	a
20:4n6	4,53 ± 0,33	a	5,07 ± 0,53	a	6,23 ± 1,47	a	5,85 ± 0,98	a
20:4n3	2,07 ± 0,27	b	0,44 ± 0,07	a	5,29 ± 1,05	c	nd	
20:5n3	1,61 ± 0,20	b	0,01 ± 0,005	a	0,39 ± 0,04	a	0,40 ± 0,10	a
22:4n6	1,52 ± 0,33	a	0,49 ± 0,05	a	0,78 ± 0,07	a	0,81 ± 0,39	a
22:5n3	0,54 ± 0,06	a	1,87 ± 0,23	a	1,52 ± 0,21	a	2,07 ± 0,36	a
22:6n3	3,95 ± 0,45	b	0,71 ± 0,04	a	6,00 ± 0,58	c	1,33 ± 0,52	a
SFA (nmol/mgr proteína)	2,10 ± 0,47	ab	4,01 ± 0,69	b	2,78 ± 0,99	ab	1,24 ± 0,23	a
MUFA (nmol/mgr proteína)	2,88 ± 0,77	ab	3,61 ± 0,70	b	2,07 ± 0,27	ab	1,32 ± 0,34	a
PUFA (nmol/mgr proteína)	7,47 ± 2,16	ab	12,59 ± 1,33	b	7,41 ± 1,37	ab	3,94 ± 0,96	a
UI	194,99 ± 11,23	a	169,37 ± 14,90	a	198,38 ± 13,31	a	173,08 ± 11,31	a

Los resultados se expresan como mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. nd: no detectado; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

Tabla 16. Efectos de la administración oral de *Opuntia megapotamica* sobre los ácidos grasos libres de riñón de ratas diabéticas.

Ác. Grasos	Ácidos grasos libres							
	Control Normal		Control Diabético		Cladodios		Semillas	
16:0	43,60 ± 3,40	c	34,02 ± 1,62	b	13,40 ± 0,32	a	18,30 ± 0,27	a
16:1	2,39 ± 0,31	c	1,14 ± 0,06	b	0,51 ± 0,09	a	5,64 ± 1,08	c
17:0	1,65 ± 0,20	c	1,51 ± 0,11	c	1,19 ± 0,11	b	0,77 ± 0,01	a
18:0	33,67 ± 2,88	b	43,64 ± 2,53	c	30,97 ± 3,89	b	15,44 ± 0,23	a
18:1	5,21 ± 0,04	a	6,71 ± 0,32	a	15,81 ± 0,57	b	17,76 ± 0,26	c
18:2	3,41 ± 0,14	a	4,70 ± 0,56	a	12,94 ± 0,67	b	12,54 ± 0,53	b
18:3n6	0,58 ± 0,12	a	1,38 ± 0,07	b	1,15 ± 0,24	b	6,23 ± 0,09	c
18:3n3	0,48 ± 0,01	a	nd		0,72 ± 0,02	b	5,00 ± 0,07	c
20:3n6	0,83 ± 0,01	a	1,00 ± 0,05	a	1,62 ± 0,42	a	1,40 ± 0,35	a
20:4n6	0,38 ± 0,03	a	nd		9,97 ± 0,51	c	3,99 ± 0,22	b
20:4n3	1,46 ± 0,02	a	1,87 ± 0,09	a	2,41 ± 0,56	ab	3,24 ± 0,05	b
20:5n3	2,37 ± 0,50	ab	1,44 ± 0,05	a	4,53 ± 0,12	c	4,28 ± 1,04	bc
22:4n6	nd		0,30 ± 0,01	a	1,34 ± 0,35	b	2,19 ± 0,21	c
Otros	3,97 ± 0,55	a	2,30 ± 0,87	a	3,45 ± 0,91	a	3,22 ± 0,62	a
SFA (nmol/mgr proteína)	3,48 ± 0,68	b	5,93 ± 0,14	a	1,25 ± 0,16	a	2,10 ± 0,40	a
MUFA (nmol/mgr proteína)	0,38 ± 0,07	a	0,68 ± 0,02	a	0,48 ± 0,05	a	1,39 ± 0,26	b
PUFA (nmol/mgr proteína)	0,46 ± 0,07	a	0,85 ± 0,03	a	0,97 ± 0,12	a	2,45 ± 0,51	b
UI	49,80 ± 2,40	a	48,40 ± 1,92	a	145,61 ± 0,71	b	153,26 ± 3,36	c

Los resultados se expresan como mol% y como valores medios ± SD de seis muestras independientes. Los mismos se compararon con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los grupos. nd: no detectado; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; UI: índice de insaturación.

También para los lípidos renales de las ratas diabéticas tratadas se estableció una relación con los lípidos de las harinas de la planta. En las dosis diarias suministradas, se determinó que los fosfolípidos de las harinas de cladodios y de semillas representan solamente el 0,06 % y el 0,02 %, respectivamente, de los fosfolípidos totales renales de una rata. Los lípidos neutros totales de las harinas de cladodios y de semillas representan el 1,73 % y el 6,42 %, respectivamente, del total de lípidos neutros renales. La composición de ácidos grasos de los lípidos de las harinas de la planta es muy diferente al perfil de ácidos determinado en los lípidos del riñón. También en este caso, se puede descartar la incidencia de los lípidos de la planta sobre los resultados.

Los datos presentados en este capítulo indican que las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas de *Opuntia megapotamica* tienen un marcado efecto anti-hiperglucemiante en ratas con hiperglucemia transitoria.

En las ratas diabéticas, las harinas de cladodios y de semillas no afectan los niveles basales de glucosa aunque se determinó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de insulina cuando se compararon los grupos diabéticos tratados con el grupo diabético control y un mejoramiento en la estructura del páncreas. Las harinas de la planta disminuyen los niveles plasmáticos de triacilglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol total, LDL-c y VLDL. También reducen las cantidades de triacilglicéridos y diacilglicéridos hepáticos y renales y de los ácidos grasos libres de riñón. A través de parámetros bioquímicos y de estudios histopatológicos se determinó que ambas harinas mejoran notoriamente el funcionamiento hepático y en menor grado el funcionamiento renal.

DISCUSIÓN



La diabetes es una enfermedad metabólica que afecta a un alto porcentaje de la población en diversos países del mundo constituyendo un problema de salud de gran impacto social y económico, especialmente en los países en vías de desarrollo. A pesar de los importantes avances en las terapias que permiten un mejor control de la glucemia y reducen la tasa de mortalidad de la enfermedad, existen complicaciones a largo plazo que incrementan la morbi-mortalidad de los pacientes diabéticos y empeoran su calidad de vida.

Generalmente, esta patología es tratada con insulina y con diferentes tipos de agentes sintéticos hipoglucemiantes y/o hipolipemiantes orales. Por otro lado, actualmente se emplean en forma complementaria distintas drogas vegetales y fórmulas poliherbales cuya eficacia se basa en la acción sinérgica de sus compuestos bioactivos (Elosta y col., 2012; El-Abhar y Schaalán, 2014; Ezuruike y Prieto, 2014; Ghorbani, 2014; Jain y Jangir, 2014; Parasuraman y col., 2014).

Los cactus del género *Opuntia* (principalmente la especie *Opuntia ficus-indica*) se ubican entre los productos naturales tradicionales más empleados, sobre todo en México, para el tratamiento popular no convencional de la diabetes (Shapiro y Gong, 2002; Cefalu y col., 2011; Xie y Du, 2011; Rubio-Ruiz y col., 2013; Heinrich y col., 2014; López-Romero y col., 2014b). En lo referente a la especie nativa *Opuntia megapotamica*, aún no se han realizado estudios pre-clínicos que permitan evaluar su potencial efecto benéfico en el tratamiento de la diabetes. Con esta finalidad, en este trabajo de Tesis se evaluó la toxicidad de

las harinas de de cladodios, de pulpa de frutos y de semillas de *Opuntia megapotamica* en ratas normales y se analizaron sus efectos sobre la glucemia y los lípidos en ratas normales con hiperglucemia transitoria y en ratas diabéticas.

En el Capítulo I se muestran los resultados de los estudios de toxicidad aguda y sub-aguda en los cuales se administraron a los animales dosis máximas de las diferentes harinas. En ambos estudios, no se registraron signos de agonía ni casos de mortalidad, el comportamiento de los animales fue normal y no se observaron alteraciones en el aspecto externo, en las actividades fisiológicas ni en el peso corporal (*Figuras 4 y 14*). En coincidencia, en un estudio de toxicidad aguda realizado en ratones a los que se les administró dosis crecientes de aceite de semillas de *O. ficus-indica*, por vía oral e intraperitoneal, no se encontraron alteraciones ni en el comportamiento ni en la actividad autonómica y no se registraron casos de mortalidad (Berraaouan y col., 2014).

En general, los parámetros hematológicos y bioquímicos se mantuvieron constantes sugiriendo una buena tolerancia a las harinas de *Opuntia megapotamica* (*Tablas 1, 3 y 4*). En forma similar, el tratamiento durante un período de 4 semanas con harinas de cladodios y de frutos de *O. ficus-indica* y con polisacáridos aislados de sus cladodios, tampoco tiene efectos negativos sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos (Grube y col., 2013).

En lo referente a los lípidos y lipoproteínas plasmáticos, el estudio de toxicidad aguda con la harina de semillas evidenció una disminución en los niveles de CT, LDL-c y riesgo aterogénico con respecto a la harina de pulpa

pero, en ninguno de los dos casos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control (*Figura 5*). En los machos sometidos al estudio de toxicidad sub-aguda solo se registraron variaciones a nivel de LDL-c en el grupo tratado con la harina de semillas (*Figura 15*). En las hembras, la harina de pulpa produjo una disminución en los valores de CT, HDL-c y LDL-c mientras que el riesgo aterogénico se mantuvo constante (*Figura 16*). Sin embargo, la harina de cladodios provocó una disminución solo a nivel de HDL-c. De igual manera, Saleem y col. (2005) demostraron que la administración del extracto metanólico de cladodios de *O. dillenii* y de un componente aislado, opuntiósido-1, a ratas Sprague–Dawley de ambos sexos, no produce variaciones significativas en los niveles de CT.

Como ya se mencionó, no existen en la bibliografía estudios toxicológicos integrales del género *Opuntia*. Sin embargo, en algunas especies se determinó que dosis menores a las que se emplean en los estudios toxicológicos tienen diversos efectos benéficos. En este trabajo de Tesis, en ambos estudios de toxicidad no se registraron alteraciones en el peso ni en el tamaño de todos los órganos examinados (*Tablas 2, 5 y 6*). Complementariamente, las observaciones macroscópicas y los estudios histopatológicos mostraron una arquitectura normal de bazo, páncreas, estómago, duodeno, íleon y colon (*Figuras de 8 a 13 y de 22 a 33*). En el mismo sentido, la administración oral de dosis elevadas de un extracto metanólico de cladodios de *O. dillenii* y del opuntiósido-1, a ratas y ratones, no produce cambios en la morfología del bazo aunque el opuntiósido-

1 determina aumentos en el tamaño y alteraciones histológicas severas de este órgano (Saleem y col., 2005). Estudios histopatológicos del bazo de ratas tratadas con frutos de *O. vulgaris* indican que la planta reduce las lesiones producidas por el suministro de metanol y sugieren que este efecto podría deberse a la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes y a la inhibición de la peroxidación lipídica (Saoudi y col., 2011). Polisacáridos aislados de *O. dillenii* en ratones inmunosuprimidos aumentan la proliferación de linfocitos en el bazo mejorando la función inmune (Zhao y col., 2012).

Con respecto al estómago, pre-tratamientos con cladodios (liofilizados o en extracto etanólico, compuestos principalmente por mucílagos y pectinas), con frutos (jugo o extracto etanólico, ricos en betalaínas) o con flores (extracto metanólico, ricas en polisacáridos y compuestos fenólicos) de *O. ficus-indica* tienen un efecto protector sobre la mucosa gástrica en casos de úlceras inducidas por estrés o por exposición al etanol y también revierten las alteraciones de la gastritis crónica debido, en parte, al elevado contenido de mucílagos de la planta que evitaría la penetración del agente necrotizante en la mucosa gástrica (Park y col., 1998; Galati y col., 2007; Alimi y col., 2011; Kim y col., 2012). Además, las interacciones moleculares entre los monosacáridos del mucílago y los fosfolípidos mayoritarios de la membrana plasmática, producirían cambios en la actividad de las proteínas asociadas a membrana durante el proceso de curación del daño crónico de la mucosa gástrica (Vázquez-Ramírez y col., 2006). Por otro lado, las betalaínas y pectinas de la

planta intervendrían en la regeneración de la mucosa gastrointestinal por la estimulación de la producción de mucus (Kaur y col., 2012). La actividad antiulcerogénica del extracto de flores se debería posiblemente a dos efectos sinérgicos: antioxidante y antihistamínico (Alimi y col., 2011).

En lo referente al colon, estudios *in vitro* demostraron que la harina de cladodios de distintas especies silvestres y cultivadas de *Opuntia* (*O. ficus-indica*, *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* y *O. albicarpa*) tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo debido a las propiedades antioxidantes del ácido fenólico y de los flavonoides (Keller y col., 2015). Las indicaxantinas, betalaínas amarillentas presentes en grandes cantidades en el fruto de *O. ficus-indica*, modulan el proceso inflamatorio en la línea celular humana de cáncer de colon Caco-2 (Tesoriere y col., 2014) y tienen un efecto espasmolítico benéfico a nivel del íleon (Baldassano y col., 2011).

Con referencia a los efectos de *Opuntia megapotamica* sobre hígado y riñón, en el estudio de toxicidad aguda la exposición a la harina de pulpa no produjo efectos tóxicos (*Figuras 6 y 7*). La harina de cladodios afectó solo la arquitectura del riñón mientras que la harina de semillas generó algunas alteraciones histológicas leves en ambos órganos. Sin embargo, no se observaron variaciones en los parámetros bioquímicos relacionados con la función hepática (fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y gamma-glutamil transferasa) ni en los vinculados con la

función renal (creatinina y urea plasmáticas) (*Tabla 1*). En el estudio de toxicidad sub-aguda ninguna de las tres harinas tuvo efectos adversos sobre los órganos (*Figuras 17, 18, 20 y 21*) ni sobre los parámetros bioquímicos (*Tablas 3 y 4*) mencionados. Solo en una rata macho, a la que se le administró harina de semillas, se observaron daños focales reflejados en una vacuolización a nivel centro-lobulillar y unos pocos hepatocitos balonizados (*Figura 19*). Se describió que dosis elevadas de un extracto metanólico de cladodios de *O. dillenii* desorganizan drásticamente la estructura del hígado solo cuando se las administra por vía intraperitoneal (Saleem y col., 2005). Un estudio de toxicidad aguda con *O. ficus-indica*, en el que se determinó la dosis letal 50 % (LD₅₀), demostró que el aceite de semillas tiene baja toxicidad (Boukeloua y col., 2012). El mismo tipo de estudio realizado con un extracto metanólico de semillas de *O. joconostle* no evidenció efectos tóxicos (Osorio-Esquivel y col., 2012).

Por otro lado, numerosos trabajos llevados a cabo en distintas especies de *Opuntia*, empleando dosis menores, describieron efectos hepatoprotectores y reversión de los daños inducidos por distintos agentes. Así, la medición de enzimas marcadoras de la función hepática mostró que dosis altas de extractos acuosos de cladodios de *O. ficus-indica* no solo no producen efectos hepatotóxicos en ratas sino que revierten los daños generados por un insecticida organofosforado (Ncibi y col., 2008) o por la administración de níquel (Hfaiedh y col., 2008). El jugo de frutos de la misma especie de *Opuntia* atenúa los efectos generados por la administración de etanol pues disminuye la

oxidación lipídica y proteica, inhibe las alteraciones en las enzimas antioxidantes y la liberación de las enzimas marcadoras hepáticas y reduce las lesiones histológicas (Alimi y col. 2012; Alimi y col., 2013). También, extractos acuosos de frutos de *O. vulgaris* evitan las alteraciones histológicas hepáticas y el daño oxidativo que genera la administración de metanol, posiblemente por su contenido elevado de polifenoles y carotenoides, (Saoudi y col., 2012).

Con respecto al riñón, el suministro intraperitoneal del extracto metanólico de *O. dillenii* en dosis elevadas no produce daños (Saleem y col., 2005). En el caso de *O. megacantha*, la administración oral de un extracto etanólico de cladodios aumenta los niveles plasmáticos de urea y creatinina si bien es necesario tener en cuenta que en este estudio no se realizaron evaluaciones histopatológicas (Bwititi y col., 2000). Estudios posteriores de los mismos autores describen que el extracto etanólico de cladodios de la misma especie de *Opuntia* tiene efectos benéficos relacionados con la excreción renal de sodio y el aclaramiento de creatinina en ratas diabéticas (Bwititi y col., 2001). Por otro lado, extractos acuosos de frutos de *O. vulgaris* previenen los efectos renales nocivos generados por la ingesta de metanol (Saoudi y col., 2012).

En conjunto, los resultados derivados de la evaluación de la toxicidad aguda y sub-aguda de *Opuntia megapotamica* indican que en general la administración oral de la harina de pulpa de frutos no produce efectos tóxicos en el modelo experimental utilizado. Sin embargo, la harina de cladodios en altas dosis, genera alteraciones histológicas a nivel del riñón. La harina de

semillas produce alteraciones similares en los riñones, aunque más atenuadas, y en ambos estudios de toxicidad genera modificaciones leves a nivel hepático. Ninguna de las alteraciones histológicas mencionadas en ambos órganos causó signos clínicos y probablemente representen hechos fortuitos. Es necesario puntualizar que las dosis empleadas en estos estudios de toxicidad son muy superiores a las que se utilizan en otras especies de *Opuntia* con fines nutricionales y/o terapéuticos. Estos estudios constituyen el primer análisis toxicológico completo realizado en el género *Opuntia*.

En el Capítulo II de este trabajo de Tesis se evaluó, en primer término, el contenido y la composición de los lípidos de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* que, como ya se mencionó, prácticamente no modifican el perfil de los lípidos plasmáticos, hepáticos y renales lo que permitió descartar su incidencia sobre los resultados. Por otro lado, este estudio posibilitó concretar, por primera vez, una caracterización lipídica de esta especie de *Opuntia*.

Se determinó que la harina de cladodios posee el doble de fosfolípidos que la harina de semillas (*Figura 34*) mientras que en esta última el contenido de ácidos grasos de los lípidos totales es muy superior, sugiriendo una mayor contribución de los lípidos neutros al contenido lipídico total (*Figura 36*). En concordancia, las semillas liofilizadas de *O. ficus-indica* L. contienen grandes cantidades de lípidos neutros (87 % del total) mientras que la pulpa posee un mayor contenido de lípidos polares (53 %) (Ramadan y Mörsel, 2003; Feugang y

col., 2006). En ambas harinas de *Opuntia megapotamica* los PUFA son los más abundantes y la harina de semillas posee el mayor UI (Figura 37). En distintas variedades de *O. ficus-indica* el aceite de semillas posee también un grado elevado de insaturación debido principalmente al aporte de los PUFA (60 % del total) (Salvo y col., 2002; El Finti y col., 2013) y los lípidos neutros son más insaturados que los lípidos polares (Ramadan y Mörsel, 2003).

El estudio de la composición de acilos de los lípidos totales de *Opuntia megapotamica* mostró que en la harina de cladodios el ácido graso mayoritario es el linoleico seguido por los ácidos palmítico, oleico, linolénico y esteárico (Tabla 7). En *Opuntia* Milpa Alta, los extractos de cladodios están enriquecidos también en los ácidos linoleico, linolénico y palmítico (Luo y col., 2010). Por otro lado, los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de cladodios de *O. ficus-indica* son compuestos derivados principalmente de los ácidos grasos linoleico y palmítico (Wright y Setzer, 2014).

Cuando se evaluó la composición de la harina de semillas de *Opuntia megapotamica* se observó que también aquí el ácido linoleico es el más abundante y que representa más de la mitad del total de acilos seguido por los ácidos oleico, palmítico y esteárico (Tabla 7). Este perfil de ácidos grasos concuerda con el descrito en las semillas liofilizadas de *O. ficus-indica* (Ramadan y Mörsel, 2003) y en el aceite de semillas de *O. stricta* (Ennouri y col., 2005), de *O. dillenii* (Ghazi y col., 2013) y de *O. ficus-indica* (Coşkuner y Tekin, 2003; Ennouri y col., 2006a; El Mannoubi y col., 2009; Özcan y Al Juhaimi, 2011;

Tlili y col., 2011; Yeddes y col., 2012; El Finti y col., 2013).

Los ácidos linoleico (omega-6) y α -linolénico (omega-3) son ácidos grasos esenciales para el ser humano y por ello su presencia en la dieta es fundamental (Sinclair, 1990; Horrocks y Yeo, 1999; Calder y col., 2010). En el caso del ácido linoleico, su importancia radica en su conversión en los ácidos grasos eicosatrienoico, araquidónico y docosapentaenoico y en sustancias derivadas tales como eicosanoides, hepoxilinas, lipoxinas, anandamida, leucotrienos y prostaglandinas. Por su parte, el ácido α -linolénico genera los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosaheptaenoico (Brenner, 2003).

Se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados poseen efectos benéficos para la salud que incluyen el mejoramiento de patologías como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, hipertensión, aterosclerosis, cáncer y enfermedades inflamatorias y del sistema inmune como artritis reumatoide, psoriasis y dermatitis atópica, entre otras (Letawe y col., 1998; Das, 2006; Calder y col., 2010; Simopoulos, 2013; Al-Khudairy y col., 2015; Das, 2015; Kagohashi y Otani, 2015).

Las dietas occidentales, en general, poseen un alto porcentaje de ácido linoleico mientras que el ácido linolénico, provisto generalmente por las partes verdes de los vegetales o por algunos aceites de semillas como el de colza, se encuentra en pequeñas proporciones (Zhou y Nilsson, 2001). Cantidades excesivas de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 y relaciones muy altas de omega-6/omega-3 (15/1-20/1) promueven la génesis de alteraciones

cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias y autoinmunes mientras que niveles aumentados de omega-3 (una baja relación de omega-6/omega-3 de 2/1 a 5/1) ejercen efectos supresores dependiendo de la patología (Simopoulos, 2016).

En este trabajo de Tesis, se determinó que la harina de cladodios de *Opuntia megapotamica* tiene una relación 7/1 entre el ácido linoleico y el ácido linolénico que resulta interesante para su potencial empleo como fuente natural con fines alimenticios. En lo referente a la harina de semillas, se registró un elevado contenido de ácido linoleico y su relación con el ácido linolénico se aparta de la recomendada tal como ocurre en aceites de consumo habitual como los de maíz y de soja con los que comparte una composición de acilos similar (Tan y Che Man, 2000).

En la etapa siguiente del Capítulo II, utilizando como modelos experimentales ratas normales con hiperglucemia transitoria y ratas con diabetes inducida con STZ, se analizaron los posibles efectos anti-hiperglucemiantes e hipoglucemiantes de las harinas de *Opuntia megapotamica*.

Los resultados de las pruebas orales de tolerancia a la glucosa (POTG) mostraron que las tres harinas de *Opuntia megapotamica* tienen un marcado efecto anti-hiperglucemiante (alrededor del 30 %) y producen un retorno más rápido de la glucemia a los valores registrados en condiciones de ayuno, de manera similar a la droga hipoglucemiante de referencia, glimepirida (Figura 38). En el mismo sentido, una combinación de extractos de cladodios y de piel

de frutos de *O. ficus-indica* (OpunDia™) disminuye en un 13 % la glucemia de hombres y mujeres prediabéticos y obesos a los 60 minutos de la sobrecarga de glucosa (Godard y col., 2010). El aceite de semillas de la misma especie de *Opuntia* tiene un efecto anti-hiperglucemiante postprandial del 40 % en ratas normales (Berraaouan y col., 2014). En coincidencia con *Opuntia megapotamica*, en POTG, la administración de jugo de frutos frescos de *O. dillenii* a conejos sanos tiene un efecto anti-hiperglucemiante del 50 % mientras que la glucemia no disminuye cuando la sobrecarga de glucosa se administra por vía intravenosa. Por este motivo, los autores proponen que el efecto anti-hiperglucemiante podría deberse principalmente a una disminución de la absorción intestinal de glucosa (Perfumi y Tacconi, 1996). Las *Opuntia* se caracterizan por un importante contenido de fibras solubles como pectinas y mucílagos (Stintzing y Carle, 2005; López-Palacios y col., 2016) que, entre otros efectos, aumentan la viscosidad de los alimentos en el intestino y alteran la absorción intestinal de carbohidratos (Marles y Farnsworth, 1995; Rosado y Diaz, 1995; Shapiro y Gong, 2002; Shane-McWhorter, 2005; Berraaouan y col., 2014). El efecto anti-hiperglucemiante de las harinas de *Opuntia megapotamica* podría atribuirse a un mecanismo de este tipo. De todas maneras, no se puede descartar la participación de otros compuestos activos ya que el efecto mencionado se observa también en extractos filtrados de *O. streptacantha* que carecen de las fibras de la planta (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2011). Por otra parte, en la misma especie de *Opuntia* se registra una acción anti-

hiperglucemiante en ratas con hiperglucemia transitoria inducida por vía subcutánea que podría sugerir la existencia de un mecanismo de acción adicional (Roman-Ramos y col., 1995).

Cuando a las ratas diabéticas se les administró, como suplemento dietario y durante un período de 30 días, las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* no se registraron cambios en los valores basales de glucemia (Figura 40). De modo semejante, el suministro de cladodios deshidratados de *O. ficus-indica* a individuos diabéticos; de aceite de semillas de la misma especie de *Opuntia* a ratas con diabetes inducida con STZ y de una preparación tradicional de cladodios frescos de *O. streptacantha* en forma de licuado a ratas diabéticas, no modifica la glucemia en ayunas mientras que tiene efecto anti-hiperglucemiante sobre la glucemia postprandial y en POTG (Fрати-Munari y col., 1989; Frати-Munari y col., 1992; Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2011; Berraaouan y col., 2014). Los autores explican estos efectos fundamentalmente por la inhibición de la absorción intestinal de glucosa debida al elevado contenido de la planta en fibras solubles. Por el contrario, la administración de cladodios molidos de *O. humifusa* a ratas diabéticas por vía oral ejerce un efecto hipoglucemiante luego de un tratamiento de siete semanas (Hahm y col., 2011; Hahm y col., 2016). Se demostró también que el jugo de frutos y polisacáridos purificados de cladodios de *O. dillenii*, administrados oralmente a roedores con diabetes inducida con STZ durante cuatro semanas, actúan como hipoglucemiantes posiblemente porque

secuestran los radicales libres generados por el estado diabético, permiten la recuperación de la función antioxidante del hígado y mejoran la sensibilidad de las células blanco a la insulina (Abdallah, 2008; Zhao y col., 2011; Gao y col., 2015).

Con respecto al páncreas, la administración de las harinas de *Opuntia megapotamica* produjo una leve mejora en su estructura (Figura 42) en coincidencia con lo que ocurre luego de la administración oral de cladodios deshidratados de *O. humifusa* (Hahm y col., 2011) y del jugo de frutos y de los polisacáridos aislados de *O. dillenii* a ratas diabéticas (Abdallah, 2008; Gao y col., 2015).

Adicionalmente, se evidenció que las harinas de *Opuntia megapotamica* generaron un leve aumento en los niveles basales de insulina plasmática de las ratas diabéticas tratadas en comparación con las ratas diabéticas control (Figura 41 B). En coincidencia, el suministro durante siete semanas de distintas dosis de cladodios deshidratados de *O. humifusa*, incrementa ligeramente la insulinemia en ratas diabéticas (Hahm y col., 2011).

En contraste, el extracto etanólico de cladodios de *O. megacantha* tiene efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas sin afectar los niveles basales de insulina plasmática sugiriendo que esta acción sería a través de mecanismos que no involucran a la hormona y que estarían relacionados con un estímulo de la entrada de la glucosa en las células a través del co-transportador sodio-glucosa (Bwititi y col., 2000). Además, en humanos sanos y en pacientes

diabéticos tipo 2, los cladodios hervidos de *O. streptacantha* disminuyen significativamente los niveles de glucosa plasmática sin modificar el péptido-C indicativo de la producción de insulina (Fрати-Munari y col., 1991).

Se conoce que los oligosacáridos derivados de las fibras de la dieta tienen efectos positivos sobre la masa de células β pancreáticas y sobre la secreción de insulina a través de la regulación de las incretinas, como por ejemplo GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1) (Ranganath, 2008). En ratas con diabetes inducida con STZ, se demostró que los fructo-oligosacáridos aumentan la masa de células β y la producción de insulina pancreática a través de la regulación de esta incretina en el intestino (Cani y col., 2005).

Como ya se mencionó, las *Opuntia* poseen un contenido importante de pectinas y de mucílagos y, por ejemplo, en *O. ficus-indica* se demostró que de estos compuestos derivan la mayoría de los oligosacáridos de la planta que presentan importantes propiedades pre-bióticas que se reflejan en los niveles elevados de producción de ácidos grasos de cadena corta, en especial de propionato y butirato (Guevara-Arauz y col., 2012; Benítez-Cortés y col., 2015) que estimulan la secreción de insulina (Brockman, 1982). Se describió también que estos dos ácidos grasos se generan como consecuencia de la suplementación de diferentes oligosacáridos a sistemas *in vitro* (Torres y col., 2010) y de fructo-oligosacáridos a ratas (Uehara y col., 2001; Habib y col., 2011).

Los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el leve aumento de la insulina plasmática podrían por lo tanto deberse, en parte, a la

participación de los oligosacáridos derivados de los mucílagos y de las pectinas de la planta.

El metabolismo glucídico y el metabolismo lipídico están estrechamente vinculados (Bechmann y col., 2012; Parhofer, 2015; Jones, 2016). En la diabetes, la manifestación clínica más evidente de esta interacción es la dislipidemia que se asocia estrechamente con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica y que presenta anomalías cualitativas y cinéticas en todas las lipoproteínas (Taskinen, 2003; Vergès, 2009; Taskinen y Boren, 2015; Vergès, 2015) y también cuantitativas que se reflejan principalmente en aumentos en los AGL, TAG, CT y LDL-c plasmáticos y en disminuciones en las HDL-c (Mooradian, 2009; Goldberg y col., 2011; Kielgast y col., 2011; Miller y col., 2011; Janzen y col., 2016; Schofield y col., 2016).

Actualmente se sabe que la dislipidemia diabética no sólo puede ser la consecuencia sino también la causa de un metabolismo alterado de la glucosa (Parhofer, 2015) y, desde hace unos años, ha surgido el concepto de glucolipototoxicidad que se describe como la toxicidad sinérgica causada por la glucosa y los lípidos (Chang-Chen y col., 2008; Poitout y col., 2010; Bensellam y col., 2012; Kuwabara y col., 2014; Brun y Maechler, 2016). De manera que el tratamiento ideal de la diabetes debería considerar no solo el control de la glucemia sino también una acción favorable sobre el perfil lipídico.

En este contexto, se evaluó la eficacia hipolipemiente de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* suministradas como

suplemento dietario a ratas diabéticas. Se estudió el efecto de la planta sobre los niveles de las lipoproteínas y de los lípidos plasmáticos, sobre la actividad de dos enzimas hepáticas claves del metabolismo lipídico, sobre el contenido y composición de los lípidos de hígado y de riñón y también sobre parámetros de funcionamiento de ambos órganos.

Con respecto a los lípidos y lipoproteínas plasmáticos, en comparación con los animales normales, las ratas diabéticas control presentaron valores significativamente más altos de TAG (por ende de VLDL) y de AGL (*Figura 43*). El aumento observado en los AGL, junto con la marcada disminución del peso corporal (*Figura 39*), del tejido adiposo y de los niveles plasmáticos de insulina (*Figura 41*), estarían reflejando el incremento en la movilización de lípidos desde este tejido hacia el plasma ocasionado por el aumento en la actividad de la enzima LSH como consecuencia de la deficiencia de insulina (Schofield y col., 2016). Específicamente, en tejido adiposo de ratas con diabetes inducida con STZ se demostró que la deficiencia de insulina genera un aumento en la expresión de la LSH y que el tratamiento con la hormona normaliza la actividad de la enzima (Sztalryd y Kraemer, 1995). Por otro lado, la insulina ejerce un efecto inhibitor sobre la producción hepática de apolipoproteína B (apoB) y sobre la secreción de los TAG en las VLDL, y por lo tanto su deficiencia contribuye a la hipertrigliceridemia (Warraich y col., 2015). La deficiencia de la hormona regula negativamente a la LPL endotelial y como consecuencia disminuye el catabolismo de las VLDL aumentando aún más los niveles de los

TAG plasmáticos (Taskinen, 2003; Lewis y col., 2015). Así, en roedores con diabetes inducida con STZ se determinó una disminución en la expresión y actividad de la enzima LPL en los tejidos periféricos (Willecke y col., 2015).

En lo referente al colesterol total, las ratas diabéticas control registraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de este lípido (*Figura 43*) que podría deberse en parte a una mayor absorción intestinal, resultante de la hipertrofia de los enterocitos, y a una disminución en la excreción biliar y fecal tal como se sugirió en un sistema experimental semejante (Young y col., 1988; Kojima y col., 1992) y en pacientes con diabetes tipo 1 (Briones y col., 1986; Kojima y col., 1999; Gylling y col., 2004; Miettinen y col., 2004). Con respecto a las HDL-c, los animales diabéticos control mostraron un ligero aumento que no fue estadísticamente significativo en comparación con los animales normales (*Figura 43*). Resultados similares se observaron en ratas diabéticas a las cuales se suministró, también por vía intraperitoneal, la misma dosis de STZ (Yoon y Son, 2009; Habib y col., 2011; Hahm y col., 2011) o una dosis más alta (Wang y col., 2012). En cuanto a las LDL-c, en las ratas diabéticas control se determinó un aumento marcado que se relacionaría, en parte, con los altos niveles de VLDL (*Figura 43*). Niesen y col. (2008), también en ratas con diabetes inducida con STZ, evidenciaron una disminución en la funcionalidad del receptor hepático de LDL-c, responsable principal de los niveles plasmáticos de esta lipoproteína. Por otro lado, tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2, la transferencia de ésteres de colesterol desde las LDL hacia las VLDL y la transferencia de TAG

en la dirección opuesta están aumentadas de tal manera que las LDL depletadas de ésteres de colesterol se enriquecen en TAG. La subsecuente remoción de los TAG por la lipasa hepática genera partículas de LDL más pequeñas y densas (sdLDL) que poseen mayor actividad aterogénica (Bagdade y col., 1991; Bhatnagar y col., 1996; Vergès, 2009; Schofield y col., 2016).

Los tratamientos con las harinas de *Opuntia megapotamica* tuvieron en general un marcado efecto hipolipemiante en las ratas diabéticas (Figura 43). Ambas harinas redujeron drásticamente los niveles de los TAG y de las VLDL y no tuvieron efecto sobre las HDL-c. La harina de semillas generó una disminución más marcada sobre los niveles de AGL, CT y LDL-c en comparación con la harina de cladodios. En concordancia con estos resultados, el suministro oral de cladodios y de frutos liofilizados de *O. ficus-indica* a ratas diabéticas disminuye los niveles séricos de TAG, AGL, CT, VLDL y LDL-c mientras que no modifica significativamente el contenido de HDL-c, debido probablemente al incremento en la excreción biliar de colesterol y en la expresión del receptor hepático de LDL-c (Yoon y Son, 2009; Yoon, 2013). En el mismo sentido, el suministro de cladodios liofilizados de *O. humifusa* y de polisacáridos aislados de cladodios de *O. dillenii* y de *O. monacantha* a roedores diabéticos produce un marcado efecto hipolipemiante (Yang y col., 2008; Hahm y col., 2011; Zhao y col., 2011).

En modelos de roedores con hiperlipidemia, el efecto hipolipemiante de distintas partes de *Opuntia* spp. se atribuye a la composición fenólica de la

planta (Galati y col., 2003; Osorio-Esquivel y col., 2012) que inhibiría la acción de la lipasa pancreática con la consecuente disminución en la absorción intestinal de lípidos (Padilla-Camberos y col., 2015). Por otro lado, se determinó que el suministro de pectinas aisladas de *Opuntia* sp. a cobayos hipercolesterolémicos disminuye los niveles plasmáticos de LDL-c y de CT a través de la unión de estas pectinas a los ácidos biliares con la consecuente disminución de su absorción en el colon, interrumpiendo así el circuito enterohepático (Fernández y col., 1990; Fernández y col., 1992 y 1994). Este efecto hipolipemiante estaría relacionado también con un aumento en la expresión de los receptores hepáticos de LDL-c y el catabolismo de estas lipoproteínas tendría un rol más importante que la modulación de la colesterogénesis *de novo* en el hígado (Fernández y col., 1994). Los contenidos elevados de *Opuntia* spp. en fibras solubles aumentarían la viscosidad de los alimentos en el intestino reduciendo la absorción de los lípidos y contribuyendo a la mejora de los perfiles lipídicos y a la pérdida del peso corporal (Shapiro y Gong, 2002). Este hecho representaría un beneficio extra para la mayoría de las personas con diabetes tipo 2 que comúnmente padecen de sobrepeso.

En lo referente a estudios clínicos, el suministro como suplemento dietario de cladodios deshidratados de *O. ficus-indica* a mujeres post-menopáusicas con síndrome metabólico, no solo disminuye los niveles de TAG y LDL-c plasmáticos sino que incrementa significativamente las HDL-c (Linarès y col., 2007) que en personas con dislipidemia y sobrepeso no sufren variación (Muñoz y col., 2014).

En casos de hipercolesterolemia familiar, el efecto hipolipemiante de *Opuntia* spp. se atribuye en parte al elevado contenido de la planta en pectinas y mucílagos que, por un lado y tal como se mencionó en cobayos hipercolesterolémicos, actuarían a través de un mecanismo similar al de las resinas secuestradoras de ácidos biliares aumentando la excreción fecal de los mismos y disminuyendo así la absorción de lípidos. Además, regularían positivamente el receptor hepático de las LDL-c aumentando la captación hepática de estas lipoproteínas sin modificar los niveles de HDL-c (Wolfram y col., 2002; Palumbo y col., 2003).

Si bien el leve aumento en los niveles de insulina plasmática registrado luego de los tratamientos con las harinas de *Opuntia megapotamica* (Figura 41) no fue suficiente para disminuir la glucemia ni normalizar el peso corporal, podría haber contribuido a la reducción de los lípidos plasmáticos a través de la inhibición de la LSH en el tejido adiposo que daría lugar a una menor liberación de AGL y de glicerol y de la estimulación de la LPL que aumentaría el catabolismo de las VLDL. Al igual que en otras especies de *Opuntia*, la acción hipolipemiante de las harinas de *Opuntia megapotamica* podría estar vinculada con el efecto de las fibras solubles de la planta sobre la absorción de los lípidos de la dieta y la excreción de los mismos en forma de ácidos biliares con la posible contribución de los compuestos antioxidantes. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta generados por la fermentación intestinal de las pectinas y de los mucílagos ingeridos podrían contribuir a la disminución de los lípidos

plasmáticos como se determinó en ratas normales (Suzuki y Kajuu, 1983; Hara y col., 1999).

Los factores SREBP (proteína de unión al elemento regulador de esterol) y ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) son esenciales en la homeostasis lipídica del organismo ya que activan la transcripción de genes involucrados en la lipogénesis como por ejemplo los que codifican la ácido graso sintasa (Shimano, 2009; Sanders y Griffin, 2016). En la diabetes tipo 1, la deficiencia de insulina genera una disminución en las enzimas hepáticas limitantes de la síntesis de colesterol, la HMG-CoA reductasa, y de la síntesis de ácidos grasos (FAS) (Lambert y col., 2013). Por otro lado, determina un aumento en la síntesis intestinal de estos lípidos acompañado de un incremento en su absorción (Gylling y col., 2004; Miettinen y col., 2004; Lambert y col., 2013). Ambos eventos intestinales contribuyen a la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y a la consecuente disminución de la síntesis hepática como parte de un circuito de retroalimentación negativo.

Cuando se evaluó la actividad de las enzimas hepáticas HMG-CoA reductasa y FAS se observó que la inducción de la diabetes con STZ generó una disminución en la actividad de ambas enzimas con respecto a las ratas normales (*Figura 44*). Los mismos resultados se obtuvieron en un sistema experimental similar donde además se determinaron aumentos en la actividad intestinal de estas enzimas (Easom y Zammit, 1985; Feingold y col., 1990; Berg y col., 1995; Shimomura y col., 1999; Fiebig y col., 2001).

Luego del suministro de la harina de cladodios de *Opuntia megapotamica*, la actividad hepática de la enzima HMG-CoA reductasa se acercó a los valores normales (*Figura 44 A y B*). En concordancia, también en ratas con diabetes inducida con STZ, la administración oral de cladodios y de frutos liofilizados de *O. ficus-indica* ejerce un efecto hipolipemiante y aumenta la expresión de la enzima HMG-CoA reductasa y la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (Yoon, 2013). Por otro lado, en ratas hiperlipidémicas, donde la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática está aumentada, el suministro de polisacáridos aislados de cladodios de *O. dillenii* modifica los valores de actividad enzimática disminuyendo así la biosíntesis endógena de colesterol y por lo tanto la hipercolesterolemia (Zhao y col., 2012). En contraste, las pectinas aisladas de *Opuntia* sp. no afectan la actividad de la enzima en cobayos hipercolesterolémicos (Fernández y col., 1990; Fernández y col., 1992 y 1994).

En relación con la ácido graso sintasa, en comparación con las ratas diabéticas control, la administración oral de la harina de cladodios disminuyó los valores de actividad enzimática (*Figura 44 C y D*). Se observó una correlación entre los perfiles de actividad de esta enzima y de peso corporal (*Figura 39*) de los distintos grupos de animales analizados. Si bien hasta el presente no se ha estudiado el efecto de las *Opuntia* sobre la biosíntesis de ácidos grasos en la diabetes, extractos de cladodios y de semillas de *O. ficus-indica*, administrados oralmente a ratones obesos, poseen efecto hipolipemiante debido en parte a que reducen significativamente la expresión

de los ARNm de SREBP 1, de ChREBP y de FAS (Rodríguez-Rodríguez y col., 2015; Kang y col., 2016). Se determinó también que la administración oral a ratas Zucker obesas de cladodios deshidratados de la misma especie de *Opuntia* no modifica la expresión de la FAS ni del factor de transcripción SREBP 1 (Morán-Ramos y col., 2012).

Como ya se mencionó, la administración oral de pectinas y de mucílagos de *Opuntia* spp. tiene un efecto pre-biótico que genera ácidos grasos de cadena corta como el butirato y el propionato, que metabolizado en gran parte en el hígado, puede reducir la biosíntesis de ácidos grasos y de colesterol (Delzenne y col., 2002; Macfarlane y col., 2008). En ratas normales se determinó que estos ácidos grasos de cadena corta disminuyen la lipogénesis hepática (Suzuki y Kajuu, 1983) y la síntesis de colesterol en el hígado y en el intestino (Hara y col., 1999). Tal como se sugirió para otras especies de *Opuntia* (Fernández y col., 1994; Abdallah, 2008), los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el metabolismo lipídico podrían estar vinculados a mecanismos de este tipo.

El hígado, central en la regulación y el mantenimiento de la homeostasis del organismo, tiene una función importante en la lipogénesis, en la oxidación y conversión metabólica de los ácidos grasos libres y en la secreción de las lipoproteínas plasmáticas. Es uno de los órganos más afectados por la diabetes y así la acumulación de gotas de lípidos en los hepatocitos puede conducir a la enfermedad de hígado graso o esteatosis hepática (Canbay y col., 2007; Nguyen

y col., 2008; Sanders y Griffin, 2016). Por estas razones, en las ratas diabéticas tratadas con las harinas de *Opuntia megapotamica* se evaluó su funcionamiento a través del dosaje de enzimas marcadoras, su histología y el contenido y la composición de lípidos.

En los animales diabéticos control se observaron aumentos en los valores de todas las enzimas marcadoras analizadas (*Tabla 9*). Los incrementos registrados en las transaminasas, AST y ALT, enzimas intracelulares que difunden hacia la circulación sanguínea cuando se altera la integridad celular, son indicativos de un proceso de citólisis hepática, especialmente los aumentos en la ALT. Con respecto a las otras dos enzimas, la fosfatasa alcalina se encuentra en la parte canalicular y en la parte luminal del epitelio de los conductos biliares mientras que la GGT es una enzima de origen microsomal hepatobiliar y por esta razón se utiliza como una prueba suplementaria para asegurar que un incremento en la ALP provenga realmente de los canales biliares o del hígado. Los aumentos que se encontraron en estas enzimas en las ratas diabéticas se pueden vincular por lo tanto con obstrucciones del sistema biliar. En coincidencia, otros autores, también en ratas y empleando dosis similares de STZ, hallaron incrementos en los niveles plasmáticos de las enzimas marcadoras de la función hepática (Schmatz y col., 2012; Gengiah y col., 2014; Toma y col., 2015).

Por otra parte, en todos los grupos de animales el aspecto macroscópico del hígado fue normal y se mantuvieron constantes tanto el peso relativo como

el contenido proteico (*Figura 45*). En los animales diabéticos control se registraron alteraciones en la estructura del órgano observándose una disposición desorganizada de los hepatocitos que presentaron una vacuolización citoplasmática compatible con el inicio de una degeneración grasa y alteraciones características de un estado diabético avanzado (*Figura 46*). En concordancia, otros autores, en un sistema experimental similar, encontraron daños hepáticos del mismo tipo (Zafar y col., 2009; Ashraf y Zare, 2015).

La administración oral de las harinas de cladodios y de semillas de *Opuntia megapotamica* mostró efectos benéficos sobre el estado general del hígado y del sistema biliar que se reflejaron en el retorno de los valores de las enzimas marcadoras a los registrados en los animales normales y en el mejoramiento de la estructura histológica (*Tabla 9* y *Figura 46*, respectivamente). En el mismo sentido, dosis similares de la harina de cladodios de *O. humifusa*, administrada oralmente a ratas diabéticas, restablecen los niveles séricos normales de las transaminasas (Hahm y col., 2011). El suministro oral de jugo de frutos de *O. ficus-indica* a ratas con diabetes inducida con aloxano, disminuye los valores de AST, ALT y ALP incrementados por la enfermedad y revierte los daños del tejido hepático debido a su elevado contenido de antioxidantes naturales (compuestos fenólicos, flavonoides, vitaminas C y E y carotenoides) que mejora el balance redox y minimiza el daño oxidativo (Hassan Abd El-Razek y Hassan, 2011). En un estudio realizado en ratas con diabetes inducida con STZ, se determinó también que la administración oral de polisacáridos aislados de

frutos de *O. dillenii* estimula la acción de enzimas hepáticas antioxidantes que contribuyen a la preservación del tejido deteriorado por la diabetes (Gao y col., 2015). Los resultados derivados de los tratamientos de las ratas diabéticas con las harinas de *Opuntia megapotamica* sugieren que la administración de la planta podría detener o revertir la citólisis hepática, la colestasis y la degeneración grasa, originadas por el estado diabético, quizás a través de un mecanismo similar al descrito.

En lo referente a los lípidos hepáticos, el contenido total de fosfolípidos en las ratas diabéticas control no se modificó con respecto al determinado en las ratas normales si bien se registraron variaciones leves en las distintas clases de fosfolípidos individuales especialmente en fosfatidilcolina y esfingomielinina (*Figura 49*). En coincidencia, en un sistema experimental semejante tampoco se encontraron cambios en el nivel total de fosfolípidos aunque se observó una disminución en los fosfolípidos de colina que podría contribuir a la alteración en las propiedades de membrana que subyace en el daño hepático generado por la diabetes (Simões y col., 2013). La administración de las harinas de *Opuntia megapotamica* no tuvo efectos significativos sobre el contenido de los fosfolípidos totales ni de los individuales.

En contraste con el aumento determinado en los niveles del colesterol plasmático en las ratas diabéticas control, su contenido hepático no registró variaciones (*Figura 50*). Esta diferencia podría deberse a que el colesterol plasmático existe casi exclusivamente en un pool rápidamente intercambiable

mientras que el colesterol de los tejidos se distribuye en pools de lento recambio y en otros no intercambiables (Dell y col., 1985; Wang y col., 2012). Luego de los tratamientos con *Opuntia megapotamica*, ninguna de las dos harinas generó cambios estadísticamente significativos sobre los niveles de colesterol hepático. En ratas con hiperlipidemia, se determinó que el suministro de polisacáridos aislados de cladodios de *O. dillenii* disminuye los niveles de colesterol hepático a través de la reducción en su síntesis (Zhao y col., 2012). Por otro lado, en cobayos hipercolesterolémicos, las pectinas aisladas de *Opuntia* sp. disminuyen los niveles de colesterol hepático sin afectar la actividad de la enzima clave de la colesterogénesis (Fernández y col., 1990; Fernández y col., 1992 y 1994).

El análisis cuantitativo de los principales lípidos neutros del hígado de las ratas diabéticas control mostró valores significativamente más altos en los TAG, DAG y AGL con respecto a las ratas normales (*Figura 50*). Como ya se indicó, en las ratas diabéticas control se registraron niveles elevados de AGL plasmáticos que podrían contribuir al aumento en la producción hepática de los TAG, asociada a un incremento en la secreción de la apoB, y al aumento en los AGL hepáticos (Warraich y col., 2015). Resultados similares, en referencia a los TAG y a los AGL, se describieron en ratas Wistar con diabetes inducida con una dosis igual o semejante de STZ (Pari y Venkateswaran, 2004; Stanely Mainzen y Kannan, 2006; Kalaiarasi y col., 2009; Akiyama y col., 2010; Habib y col., 2015;

Marella y col., 2015) o de aloxano (Saravanan y Pari, 2003; Ramkumar y col., 2008).

Luego de los tratamientos con las harinas de *Opuntia megapotamica*, los niveles de los TAG hepáticos se redujeron significativamente llegando incluso a valores inferiores a los registrados en los animales normales mientras que los DAG experimentaron una disminución más atenuada (*Figura 50*). La cantidad de los AGL no se modificó y este hecho podría deberse, en parte, a que la leve disminución registrada en la actividad de la FAS (*Figura 44*) no fue suficiente para afectarla y también a los oligosacáridos de la planta que podrían reducir su esterificación tal como se determinó en estudios en ratas normales a las cuales se les administró distintos tipos de dietas enriquecidas en estos compuestos (Fiordaliso y col., 1995; Kok y col., 1996; Delzenne y Kok, 1999). La drástica disminución de los TAG hepáticos podría relacionarse con los resultados de los estudios histopatológicos del hígado que mostraron, en las ratas diabéticas control, áreas con vacuolización citoplasmática indicativas del inicio de la degeneración grasa que desaparecieron luego de los tratamientos con la planta (*Figura 46*). De igual manera, la administración oral de la harina de semillas de *O. ficus-indica* disminuye los niveles de los lípidos totales hepáticos en ratas normales probablemente debido al elevado contenido en fibras de la planta (Ennouri y col., 2006b). Además, también en ratas normales, se determinó que los ácidos grasos de cadena corta, generados por la fermentación intestinal de las pectinas y de los mucílagos ingeridos, contribuyen a la caída de los lípidos

hepáticos a través de la disminución de la lipogénesis (Suzuki y Kajuu, 1983; Hara y col., 1999). En ratas Zucker (fa/fa) obesas, los cladodios deshidratados de *O. ficus-indica* atenúan la esteatosis hepática a través de una disminución del 50 % de los niveles de los TAG del hígado como resultado de aumentos en la β -oxidación de los ácidos grasos y en la síntesis de las VLDL (Morán-Ramos y col., 2012). En ratones obesos, la administración oral de semillas y de un extracto metanólico de cladodios de la misma especie de *Opuntia* disminuye los lípidos hepáticos mejorando la esteatosis debido en parte a la reducción de la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado (Rodríguez-Rodríguez y col., 2015; Kang y col., 2016).

Con respecto a la composición de los lípidos neutros hepáticos, en las ratas diabéticas control las principales variaciones se encontraron en los TAG (*Tabla 10*). Se registraron disminuciones significativas en los ácidos linoleico y araquidónico, un aumento en los ácidos palmitoleico y oleico, una tendencia al incremento en el ácido palmítico y una disminución en el UI. En los DAG se determinaron disminuciones significativas en los ácidos palmitoleico y linoleico, en los AGL solo se determinó un aumento en el ácido linoleico y en ambas clases lipídicas el UI se mantuvo constante (*Tablas 11 y 12*). En los lípidos totales hepáticos de ratas con diabetes tipo 1 inducida con STZ (Pari y Venkateswaran, 2004; Kumar y Pari, 2006; Rajasekaran y col., 2006) o con aloxano (Ramkumar y col., 2008) se encontraron cambios similares en la composición de acilos en especial en lo referente al aumento en el ácido oleico

y a la caída en los niveles de los ácidos linoleico y araquidónico. En el estado diabético, los radicales libres generados afectan las dobles ligaduras de los ácidos grasos y producen una disminución en el grado de insaturación (Baynes, 1991; Cameron y Cotter, 1999) y por otro lado la depresión de la actividad de las desaturasas microsomales hepáticas conduce a una disminución en la formación de los ácidos grasos poliinsaturados (Gellhorn y Benjamin, 1964; Mercuri y col., 1966 y 1967; Brenner y col., 1968; Faas y Carter, 1980; Brenner, 2003).

En general, en las tres clases lipídicas analizadas, la administración oral de las harinas de *Opuntia megapotamica* produjo aumentos en los ácidos grasos palmítico y esteárico y disminuciones en los ácidos palmitoleico, oleico y linoleico (*Tablas 10, 11 y 12*). Los tratamientos con las harinas de *Opuntia megapotamica* no tuvieron un efecto positivo sobre la insaturación lipídica disminuída por el estado diabético.

Está demostrado que la nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal y deriva de distintas alteraciones en factores metabólicos y hemodinámicos (Forbes y Cooper, 2013). La hiperglucemia, la presión arterial elevada, la obesidad, la dislipidemia y la duración prolongada de la diabetes promueven su desarrollo y progresión (Giacco y Brownlee, 2010; Mima, 2013; Tziomalos y Athyros, 2015). La mayoría de estos factores son modificables de modo que un manejo riguroso de los mismos es esencial para prevenir y demorar la declinación de la función renal.

La nefropatía diabética evoluciona lentamente manifestándose después de varios años del inicio de la diabetes. Consta de una fase preclínica o latente durante la cual actúan los mecanismos que derivan en la glomeruloesclerosis diabética y de una fase clínica en la que esas lesiones, en estado avanzado, se manifiestan y conducen a la insuficiencia renal terminal (Levey y col., 2003; Cohen Tervaert y col., 2010). Se caracteriza clínicamente por albuminuria, hipertensión e insuficiencia renal progresiva e histológicamente por daños a nivel glomerular (Drummond y Mauer, 2002; Wiggins, 2007; Ziyadeh y Wolf, 2008; Dabla, 2010). Este compromiso temprano en la función renal observado en humanos es reproducible en la diabetes experimental (Musabayane y col., 1995; Tesch y Allen, 2007; Kong y col., 2013).

Para evaluar los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el funcionamiento del riñón en las ratas diabéticas, se midieron parámetros bioquímicos y se analizó la histología del órgano. En comparación con los animales normales, la inducción de la diabetes con STZ generó aumentos significativos en el volumen de orina, en la glucosuria, albuminuria, potasiuria y en la tasa de filtración glomerular (*Tabla 13*) que son típicos de la etapa inicial de la nefropatía diabética (Breyer y col., 2005; Brosius y col., 2009). En referencia al balance electrolítico, en ratas con diabetes inducida con STZ, luego de tres semanas se determinaron aumentos en la excreción de sodio y de potasio (Hebden y col., 1986).

El peso de los riñones y el área glomerular se incrementaron significativamente aunque no se observaron lesiones morfológicas severas salvo un engrosamiento en las paredes de los capilares glomerulares (*Figuras 51 y 53*). En concordancia, otros autores evidenciaron un aumento marcado en el peso renal y en el ritmo de filtración glomerular en ratas con diabetes temprana inducida con STZ aunque no observaron lesiones glomerulares mayores (Hostetter y col., 1981; Zatz y col., 1986; Fujihara y col., 1992; Liu y col., 2009).

Los estudios histopatológicos no revelaron daños en los túbulos renales lo que permitiría descartar un efecto nefrotóxico de la STZ (*Figura 53*). En este sentido, se demostró que dosis superiores de STZ (60 mg/kg) tienen una toxicidad renal mínima en ratas Sprague-Dawley (Ngubane y col., 2015) y que los cambios sistémicos ocurridos luego de la inyección de la droga están relacionados directamente con la inducción del estado diabético (Grussner y col., 1993).

En general, los tratamientos con *Opuntia megapotamica* no tuvieron efectos marcados sobre los parámetros renales medidos salvo una disminución en el área glomerular (*Figura 53*) y en la potasiuria (*Tabla 13*). Asimismo, se observó una leve tendencia a la normalidad en los valores de creatinina y de urea plasmáticas (*Figura 52*), en la albuminuria y en el aclaramiento de creatinina (*Tabla 13*). Un efecto similar sobre el aclaramiento de creatinina se determinó en ratas Sprague-Dawley expuestas a una dosis mayor de STZ luego

de dos semanas de tratamiento con un extracto etanólico de cladodios de *O. megacantha* (Bwititi y col., 2001).

En las etapas iniciales de la diabetes, la diuresis osmótica inducida por la glucosa se asocia con el balance de electrolitos. En este sentido, si bien la administración de las harinas de *Opuntia megapotamica* no revirtió la poliuria, la harina de cladodios retornó los valores de potasiuria a los registrados en los animales normales. En *O. megacantha*, el tratamiento con un extracto etanólico de cladodios, revirtió las alteraciones generadas por la diabetes en el balance electrolítico renal sin que se afecte en forma significativa la concentración plasmática de las hormonas que influyen en su excreción (aldosterona y hormona antidiurética) y este hecho podría estar relacionado con una respuesta hemodinámica al extracto tal como se evidenció por el aumento en la tasa de filtración glomerular (Bwititi y col., 2001).

La albuminuria en la diabetes tiene bases hemodinámicas (hipertensión capilar glomerular e hiperfiltración) y estructurales/celulares (cambios en la membrana basal glomerular, en la matriz mesangial y en la función de los podocitos (Caramori y Mauer, 2003; Gruden y col., 2005; Fowler, 2008). La presión intraglomerular se eleva principalmente por los efectos constrictores de la angiotensina II sobre la arteriola glomerular eferente (Cao y Cooper, 2011). Se ha demostrado que algunos flavonoides inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, clave en la regulación del sistema renina-angiotensina (Loizzo y col., 2007; Maher y col., 2011). Estos compuestos se

hallan presentes en los cladodios y en las semillas de *Opuntia* spp. (Jaramillo-Flores y col., 2003; Liu y col., 2009; Morales y col., 2012) y podrían en parte explicar el leve efecto positivo registrado en la albuminuria y en el aclaramiento de creatinina luego de la administración de las harinas de *Opuntia megapotamica*. Los mismos resultados se observaron en un sistema experimental semejante luego del tratamiento con hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón), enriquecidas en flavonoides (Honoré y col., 2012).

Por otro lado, el estrés oxidativo es un componente importante en el desarrollo de la nefropatía diabética (Niedowicz y Daleke, 2005; Zhang y col., 2015) y los compuestos antioxidantes naturales de las plantas, entre ellas las *Opuntia*, tendrían un efecto protector en el desarrollo de esta patología (Wagener y col., 2009; Ibrahim y Abd El-Maksoud, 2015; Keller y col., 2015).

Los resultados derivados del análisis de los parámetros relacionados con la función del riñón y de su histología, luego de los tratamientos con las harinas de *Opuntia megapotamica*, podrían sugerir un rol benéfico de la planta en el funcionamiento de este órgano.

Sin embargo, para evaluar en mayor profundidad el funcionamiento renal, sería importante analizar biomarcadores de suero y orina que recientemente han sido identificados (cistatina C, ácido úrico, angiotensinógeno, N-acetil- β -D-glucosaminidasa, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina) y que permiten determinar el riesgo potencial del daño renal, distinguir diferentes tipos de lesiones renales, predecir la progresión de la enfermedad y aumentar la eficacia de la

intervención terapéutica (Čabarkapa, 2015; Hojs y col., 2015; Urushihara y Kagami, 2016). También sería útil, en estudios futuros, analizar en este sistema experimental el grado de expansión de la matriz mesangial, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, la presencia de depósitos de colágeno y la estructura de los podocitos.

La patogénesis de la nefropatía diabética está estrechamente vinculada con el metabolismo lipídico y con los depósitos de lípidos en el riñón que generan la acumulación de colágeno y de fibronectina, la expansión de la matriz mesangial y el incremento de proteínas en la matriz extracelular conduciendo a la glomeruloesclerosis y a la proteinuria tal como se determinó en pacientes diabéticos y en animales de experimentación (Keane, 2000; Sun y col., 2002; Rajasekaran y col., 2006; Murea y col., 2010; Kuwabara y col., 2014). Recientemente se ha establecido que la mencionada acumulación de lípidos se produce en las células epiteliales de los túbulos renales en mayor medida que en los glomérulos y es atribuible a aumentos en su captación desde el plasma y en su síntesis renal y a defectos en la utilización de ácidos grasos (Stadler y col., 2015; Kim y Park, 2016). Por otro lado, el aumento de los ácidos grasos renales genera niveles elevados de metabolitos (acil-carnitina, acil-CoA de cadena larga) que contribuyen también al desarrollo de la nefropatía diabética (Ravi y col., 2005).

En las *Figuras 54 y 55* se puede observar que en los animales diabéticos control, en comparación con los animales normales, los niveles totales de

fosfolípidos y de colesterol no variaron mientras que se registraron aumentos en los contenidos de TAG, DAG y AGL. En el mismo sentido, en ratas Wistar con diabetes inducida con dosis similares de STZ (Ravi y col., 2005; Kalaiarasi y col., 2009; Marella y col., 2015) o con aloxano (Saravanan y Pari, 2003; Ramkumar y col., 2008), se describieron también aumentos significativos en los TAG y en los AGL. En riñones de ratas Sprague-Dawley con diabetes tipo 1 inducida con STZ, se determinó un aumento en la expresión del factor de transcripción SREBP 1 con la consecuente estimulación de la FAS renal, de la síntesis de ácidos grasos y de la acumulación de TAG (Sun y col., 2002). El incremento en la expresión de SREBP 1 en el riñón contrasta con la disminución de su expresión en el hígado y la disminución de la actividad de la FAS, lo que sugeriría que la regulación de SREBP 1 por la hiperglucemia y/o por la deficiencia de insulina podría ser específica de tejido (Shimomura y col., 1999; Sun y col., 2002; Sanders y Griffin, 2016).

La administración oral de las harinas de *Opuntia megapotamica* no modificó los niveles renales de fosfolípidos ni de colesterol total (Figuras 54 y 55). La harina de semillas disminuyó drásticamente los valores de TAG y de DAG mientras que en los AGL se registró un efecto más atenuado. La harina de cladodios determinó una caída significativa en los AGL que alcanzaron los valores registrados en los animales normales mientras que los TAG y los DAG experimentaron un cambio similar aunque de menor magnitud. Teniendo en cuenta la relación entre los lípidos renales y los lípidos plasmáticos, las

disminuciones mencionadas podrían deberse en parte al efecto hipolipemiante de la planta sobre los últimos (*Figura 43*).

Se ha determinado que compuestos polifenólicos como el resveratrol y las antocianinas, presentes en las *Opuntia* y en otras plantas medicinales, producen una disminución de la lipogénesis a nivel renal, en parte a través de la estimulación de la proteína quinasa activada por 5' adenosina monofosfato (AMPK) que juega un rol clave en el desarrollo de la nefropatía diabética (Xie y Du, 2011; Vinayagam y Xu, 2015; Kim y Park, 2016). Por este motivo, actualmente se están diseñando nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad basadas en el empleo de compuestos naturales que puedan tener un efecto activador sobre la AMPK (Kim y Park, 2016).

En cuanto a los estudios composicionales de los lípidos neutros renales, en general la inducción de la diabetes con STZ no generó cambios significativos en comparación con las ratas normales (*Tablas 14, 15 y 16*). En los TAG se observó una tendencia al aumento en los ácidos linoleico y araquidónico y a la disminución en el ácido linolénico. En los DAG, se registró un aumento marcado en los niveles de ácido linoleico y una tendencia al aumento en los ácidos esteárico y oleico y a la disminución en el ácido linolénico. Con respecto a los AGL, se determinó una marcada caída en el ácido palmítico y un incremento significativo en el ácido esteárico.

En los TAG hepáticos y renales, que en ambos casos son los lípidos neutros mayoritarios, se observaron entre ellos diferencias significativas en el índice de

insaturación luego de la inducción de la diabetes. Mientras que en los TAG renales el UI permaneció constante, en los TAG hepáticos el grado de insaturación descendió en forma compatible con un estado diabético. Esta diferencia podría deberse a que el hígado es afectado tempranamente por la enfermedad mientras que en el riñón la progresión de la diabetes es más lenta como puede inferirse de los estudios histopatológicos. Cuando se analizaron los lípidos renales totales en períodos experimentales más largos en ratas con diabetes tipo 1 inducida con STZ (Pari y Venkateswaran, 2004; Kumar y Pari, 2006) se observaron también disminuciones en los PUFA y los aumentos en los SFA.

La administración de ambas harinas de *Opuntia megapotamica* afectó la composición de los TAG ya que significativamente disminuyó los niveles de ácido palmítico y aumentó los de ácido linoleico y araquidónico mientras que los niveles de ácido linolénico solo aumentaron luego de la administración de la harina de cladodios (*Tabla 14*). En los DAG, la harina de cladodios determinó una disminución significativa en el ácido linoleico y una tendencia al aumento en el ácido esteárico (*Tabla 15*). La harina de semillas produjo un leve aumento en los ácidos esteárico y oleico. En los AGL, ambas harinas produjeron descensos significativos en los niveles de los ácidos palmítico y esteárico e incrementos en los ácidos oleico, linoleico, linolénico y araquidónico (*Tabla 16*). Los tratamientos con las harinas de la planta tuvieron un efecto positivo ya que aumentaron el índice de insaturación de los TAG y de los AGL.

El análisis de los efectos de las harinas de *Opuntia megapotamica* sobre el contenido y la composición de los lípidos hepáticos y renales de ratas diabéticas constituye un aporte novedoso ya que hasta el presente no hay en la bibliografía estudios similares realizados en ninguna especie de *Opuntia*.

CONCLUSIONES



En este trabajo de Tesis, mediante la realización de estudios en ratas Wistar, se analizó en primer término la toxicidad de las harinas de cladodios, de pulpa de frutos y de semillas de *Opuntia megapotamica* y el efecto de su administración oral sobre la glucemia en pruebas de tolerancia a la glucosa y en ratas diabéticas. En estas últimas se evaluó también el efecto de las harinas de cladodios y de semillas sobre los lípidos plasmáticos, hepáticos y renales, sobre dos enzimas del metabolismo lipídico y sobre la estructura y el funcionamiento de páncreas, hígado y riñón. Además, se realizó la caracterización lipídica de las harinas de la planta.

- ✓ Los ensayos de toxicidad aguda y sub-aguda permitieron establecer que la administración oral de la harina de pulpa de frutos no posee efectos tóxicos. Las harinas de cladodios y de semillas no causan modificaciones en los parámetros bioquímicos ni cambios en el comportamiento y en el estado general de los animales aunque a nivel de hígado y de riñón producen alteraciones histológicas en las dosis máximas analizadas.
- ✓ En ratas normales con hiperglucemia transitoria se determinó que las harinas de cladodios, de pulpa y de semillas poseen un marcado efecto anti-hiperglucemiante y generan un retorno rápido a los valores basales de glucosa plasmática de modo semejante a la droga de referencia glimepirida. Se sugiere que este efecto podría deberse, en parte, a una disminución en la absorción intestinal de carbohidratos por el elevado contenido de fibras solubles de la planta.

- ✓ En ratas diabéticas, las harinas de cladodios y de semillas no modifican la glucemia basal luego de 30 días de tratamiento. Sin embargo, producen un aumento leve en los niveles plasmáticos de insulina que podrían atribuirse a la acción indirecta de los oligosacáridos derivados de los mucílagos y de las pectinas. El consumo de la planta no causa variaciones significativas en el peso corporal ni en los parámetros hematológicos y mejora la condición general de los animales.
- ✓ Ambas harinas tienen un marcado efecto hipolipemiante en los animales diabéticos que se refleja, en el plasma, en la reducción drástica de los niveles de los triacilglicéridos y por ende de las VLDL y en disminuciones de los ácidos grasos libres, colesterol total y LDL-c. Estos resultados podrían vincularse con el efecto de las fibras solubles sobre la absorción de los lípidos de la dieta y su excreción como ácidos biliares con el factible aporte de los compuestos antioxidantes. Además, los ácidos grasos de cadena corta, generados por la fermentación intestinal de las pectinas y de los mucílagos, podrían contribuir a la disminución de los lípidos plasmáticos
- ✓ En cuanto a los lípidos del hígado, la administración de las harinas de la planta a ratas diabéticas reduce significativamente los niveles de triacilglicéridos y de diacilglicéridos, sin modificar la cantidad de ácidos grasos libres, de colesterol y de fosfolípidos totales e individuales. Los

tratamientos no revierten la disminución en la insaturación lipídica generada por el estado diabético.

- ✓ Con referencia a los lípidos del riñón, ambas harinas disminuyen los niveles de triacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres, no producen cambios significativos en las cantidades de colesterol y de fosfolípidos totales e individuales y tienen un efecto positivo sobre el índice de insaturación de los triacilglicéridos y de los ácidos grasos libres.
- ✓ Solo la harina de cladodios restablece los valores en la actividad de la HMG-CoA reductasa y disminuye los de la ácido graso sintasa, enzimas hepáticas claves en la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos, respectivamente.
- ✓ Los tratamientos de las ratas diabéticas con las harinas de cladodios y de semillas mejoran en forma notoria el estado general del hígado y del sistema biliar que se evidencia en la estructura histológica y en el retorno de las enzimas marcadoras a los valores normales. Los datos derivados de la medición del área glomerular, la potasiuria, la creatinina y la urea plasmáticas, la albuminuria y el aclaramiento de creatinina, indican una leve tendencia al mejoramiento de la función renal luego de la administración de la planta. Estos datos podrían relacionarse con los ya mencionados efectos sobre los lípidos de ambos órganos y con el elevado contenido de antioxidantes naturales que mejora el balance redox y minimiza el daño oxidativo.

- ✓ La harina de cladodios posee un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados que le confiere un potencial valor nutracéutico.

En conjunto, los estudios pre-clínicos llevados a cabo en este trabajo de Tesis demuestran que las harinas de *Opuntia megapotamica* son bien toleradas cuando se las administra en forma oral, que en ratas con hiperglucemia transitoria tienen un marcado efecto anti-hiperglucemiante y que en ratas diabéticas ejercen una importante acción hipolipemiante y poseen efectos positivos sobre la estructura del páncreas y sobre el funcionamiento hepático y, por lo tanto, pueden servir como base para los ineludibles estudios clínicos que avalen su uso como recurso terapéutico natural.

A la hora de evaluar las ventajas ecológicas, económicas y sociales que podría tener el empleo medicinal y/o nutracéutico de *Opuntia megapotamica* en el país, será importante tener presente que se trata de una especie nativa, rústica, de fácil propagación, manipulación y procesamiento y que crece en zonas áridas y semiáridas donde otros cultivos no se desarrollan naturalmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, I. Z. A. (2008). Evaluation of hypoglycemic activity of *Opuntia dillenii* Haw fruit Juice in streptozotocin-induced diabetic rats. Egyptian J. Hosp. Med. 33, 544– 558.
- Ahmad, A., Davies, J., Randall, S. y Skinner, G. R. (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. Antiviral Res. 30, 75-85.
- Akiyama, S., Katsumata, S., Suzuki, K., Ishimi, Y., Wu, J. y Uehara, M. (2010). Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. J. Clin. Biochem. Nutr. 46, 87-92.
- Al-Khudairy, L., Hartley, L., Clar, C., Flowers, N., Hooper, L. y Rees, K. (2015). Omega 6 fatty acids for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane. Database. Syst. Rev. 11, CD011094.
- Al-Mustafa, A. H. y Al-Thunibat, O. Y. (2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. Pak. J. Biol. Sci. 11, 351-358.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Valdes-Arzate, A., Xolalpa-Molina, S., Banderas-Dorantes, T., Jimenez-Estrada, M., Hernandez-Galicia, E. y Roman-Ramos, R. (2003). Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*. Proc. West Pharmacol. Soc. 46, 139-142.
- Alimi, H., Hfaeidh, N., Bouoni, Z., Mbarki, S., Sakly, M. y Ben, R. K. (2013). Cactus (*Opuntia ficus indica* f. inermis) fruit juice protects against ethanol-induced hematological and biochemical damages in rats. Afr. J. Biotechnol. 12, 7099-7105.
- Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Sakly, M. y Ben, R. K. (2011). Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis flowers extract in rats. Environ. Toxicol. Pharmacol. 32, 406-416.
- Alimi, H., Hfaeidh, N., Mbarki, S., Bouoni, Z., Sakly, M. y Ben, R. K. (2012). Evaluation of *Opuntia ficus indica* f. inermis fruit juice hepatoprotective effect upon ethanol toxicity in rats. Gen. Physiol Biophys. 31, 335-342.
- Álvarez Armenta, R. y Peña-Valdivia, C. B. (2009). Structural polysaccharides in xoconostle (*Opuntia matudae*) fruits with different ripening stages. J. Profess. Assoc. Cactus Develop. 11, 26-44.

- Ammar, I., Bardaa, S., Mzid, M., Sahnoun, Z., Rebaii, T., Attia, H. y Ennouri, M. (2015). Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 483-490.
- Anderson, E. F. (2001). *The Cactus Family*. Ed. Timber Press, Oregon, 15-72.
- Andersson, D. A., Filipovic, M. R., Gentry, C., Eberhardt, M., Vastani, N., Leffler, A., Reeh, P. y Bevan, S. (2015). Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly: Involvement of peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 290, 15185-15196.
- Andrade-Cetto, A. y Wiedenfeld, H. (2011). Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. *J. Ethnopharmacol.* 133, 940-943.
- Ar'Rajab, A. y Ahren, B. (1993). Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas* 8, 50-57.
- Arends, M. J., White, E. S. y Whitelaw, C. B. (2016). Animal and cellular models of human disease. *J. Pathol.* 238, 137-140.
- Arvidson, G. A. (1968). Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.* 4, 478-486.
- Ashraf, H. y Zare, S. (2015). Preventive effects of aqueous extract of *Berberis integerrima* Bge. root on liver injury induced by diabetes mellitus (Type 1) in rats. *Iran J. Pharm. Res.* 14, 335-343.
- Asociación Americana de Diabetes. Informe 2016.
- Bagdade, J. D., Ritter, M. C. y Subbaiah, P. V. (1991). Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest* 21, 161-167.
- Baldassano, S., Rotondo, A., Serio, R., Livrea, M. A., Tesoriere, L. y Mule, F. (2011). Inhibitory effects of indicaxanthin on mouse ileal contractility: analysis of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 658, 200-205.
- Barbera, G., Inglese, P. y Pimienta-Barrios, E. (1999). Agroecología, cultivo y usos del nopal. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal, Ed. FAO, Roma 132, 1-213.
- Barret, K. E., Barman, S. M., Boitano, S. y Brooks, H. (2013). *Ganong Fisiología Médica* 24ª edición. Ed. Mc. Graw.-Hill, Estados Unidos.
- Batista, A. M., Mustafa, A. F., McAllister, T., Wang, Y., Soita, H. y McKinnon, J. J. (2003). Effects of variety on chemical composition, *in situ* nutrient disappearance and *in vitro* gas production of spineless cacti. *J. Sci. Food Agriculture* 83, 440-445.

- Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405-412.
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M. y Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 56, 952-964.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. y Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13, 198-208.
- Benítez-Cortés, I., Pérez-Martínez, A., Álvarez-Borroto, R., Collado-García, O., González-Díaz, Y. (2015). Perspectives of the production of inulin from tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Tecnología Química* 35, 193-205.
- Bennett, R. A. y Pegg, A. E. (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 41, 2786-2790.
- Bensellam, M., Laybutt, D. R. y Jonas, J. C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell Endocrinol.* 364, 1-27.
- Benvenuto, A. y Sánchez, D. (2002). Madres que curan. El uso de plantas medicinales y otras prácticas populares de curación entre las madres de los barrios Vista Alegre, Villa Nocito, Maldonado y 1 de Mayo de Bahía Blanca. En: *Noticias de Antropología y Arqueología Biblioteca on-line*, Equipo NAYA. com.ar.
- Berg, E. A., Wu, J. Y., Campbell, L., Kagey, M. y Stapleton, S. R. (1995). Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie* 77, 919-924.
- Berraaouan, A., Ziyat, A., Mekhfi, H., Legssyer, A., Sindic, M., Aziz, M. y Bnouham, M. (2014). Evaluation of antidiabetic properties of cactus pear seed oil in rats. *Pharm. Biol.* 52, 1286-1290.
- Bhatnagar, D., Durrington, P. N., Kumar, S., Mackness, M. I. y Boulton, A. J. (1996). Plasma lipoprotein composition and cholesteryl ester transfer from high density lipoproteins to very low density and low density lipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 13, 139-144.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37, 911-917.

- Bonner-Weir, S., Guo, L., Li, W. C., Ouziel-Yahalom, L., Lysy, P. A., Weir, G. C. y Sharma, A. (2012). Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. *Rev. Diabet. Stud.* 9, 407-416.
- Bouillon, R., Drucker, D. J., Ferrannini, E., Grinspoon, S., Rosen, C. J. y Zimmet, P. (2015). The past 10 years-new hormones, new functions, new endocrine organs. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 681-686.
- Boukeloua, A., Belkhir, A., Djerrou, Z., Bahri, L., Boulebda, N. y Hamdi, P. Y. (2012). Acute toxicity of *Opuntia ficus indica* and *Pistacia lentiscus* seed oils in mice. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 9, 607-611.
- Bouwens, L. y Rومان, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol. Rev.* 85, 1255-1270.
- Bravo-Hollis, H. (1978). Las Cactáceas de México. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Tomo 1, 1-719.
- Brenner, R. R. (2003). Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes. *PLEFA* 68, 151-162.
- Brenner, R. R., Peluffo, R. O., Mercuri, O. y Restelli, M. A. (1968). Effect of arachidonic acid in the alloxan-diabetic rat. *Am. J. Physiol* 215, 63-70.
- Breyer, M. D., Bottinger, E., Brosius, F. C., Coffman, T. M., Fogo, A., Harris, R. C., Heilig, C. W. y Sharma, K. (2005). Diabetic nephropathy: of mice and men. *Adv. Chronic. Kidney Dis.* 12, 128-145.
- Briones, E. R., Steiger, D. L., Palumbo, P. J., O'Fallon, W. M., Langworthy, A. L., Zimmerman, B. R. y Kottke, B. A. (1986). Sterol excretion and cholesterol absorption in diabetics and nondiabetics with and without hyperlipidemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 353-361.
- Brockman, R. P. (1982). Insulin and glucagon responses in plasma to intraportal infusions of propionate and butyrate in sheep (*Ovis aries*). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 73, 237-238.
- Brosius, F. C., III, Alpers, C. E., Bottinger, E. P., Breyer, M. D., Coffman, T. M., Gurley, S. B., Harris, R. C., Kakoki, M., Kretzler, M., Leiter, E. H., Levi, M., McIndoe, R. A., Sharma, K., Smithies, O., Susztak, K., Takahashi, N. y Takahashi, T. (2009). Mouse models of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2503-2512.
- Brun, T. y Maechler, P. (2016). Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2540-2549.

- Budinsky, A., Wolfram, R., Oguogho, A., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, Y. y Sinzinger, H. (2001). Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. *PLEFA* 65, 45-50.
- Bulotta, A., Farilla, L., Hui, H. y Perfetti, R. (2004). The role of GLP-1 in the regulation of islet cell mass. *Cell Biochem. Biophys.* 40, 65-78.
- Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J. E. y Bell, G. I. (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 47, 349-387.
- Bwititi, P. T., Machakaire, T., Nhachi, C. B. y Musabayane, C. T. (2001). Effects of *Opuntia megacantha* leaves extract on renal electrolyte and fluid handling in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. *Ren Fail.* 23, 149-158.
- Bwititi, P. T., Musabayane, C. T. y Nhachi, C. F. (2000). Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 69, 247-252.
- Čabarkapa, V. (2015). Cystatin C - More than the marker of the glomerular filtration rate. *Med. Pregl.* 68, 173-179.
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. En *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería* (Parodi, L. R. ed.), Ed. ACME, Buenos Aires, Tomo 2, Fascículo 2.
- Calder, P. C., Dangour, A. D., Diekman, C., Eilander, A., Koletzko, B., Meijer, G. W., Mozaffarian, D., Niinikoski, H., Osendarp, S. J., Pietinen, P., Schuit, J. y Uauy, R. (2010). Essential fats for future health. *Proceedings of the 9th Unilever Nutrition Symposium, 26-27 May 2010. Eur. J. Clin. Nutr.* 64 Suppl. 4, S1-S13.
- Cameron, N. E. y Cotter, M. A. (1999). Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45, 137-146.
- Canbay, A., Bechmann, L. y Gerken, G. (2007). Lipid metabolism in the liver. *Z. Gastroenterol.* 45, 35-41.
- Cani, P. D., Daubioul, C. A., Reusens, B., Remacle, C., Catillon, G. y Delzenne, N. M. (2005). Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* 185, 457-465.
- Cao, Z. y Cooper, M. E. (2011). Pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Diabetes Investig.* 2, 243-247.

Caramori, M. L. y Mauer, M. (2003). Diabetes and nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12, 273-282.

Cefalu, W. T., Stephens, J. M. y Ribnicky, D. M. (2011). Diabetes and herbal (Botanical) medicine. En *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd edition (Benzie, I. F. y Wachtel-Galor, S. eds.), Ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), Ch. 19.

Chang-Chen, K. J., Mullur, R. y Bernal-Mizrachi, E. (2008). Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 9, 329-343.

Chessa, I. y Nieddu, G. (1997). Descriptors for cactus pear (*Opuntia* spp.). Ed. FAO, Università degli Studi di Reggio Calabria, 1-39.

Chifa, C. y Ricciardi, A. I. A. (2002). Cactáceas medicinales en la flora chaqueña de Argentina usadas por las comunidades aborígenes Toba y Wichí. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste, 1-4.

Cohen Tervaert, T. W., Mooyaart, A. L., Amann, K., Cohen, A. H., Terence Cook, H., Drachenberg, C. B., Ferrario, F., Fogo, A. B., Haas, M., de Heer, E., Joh, K., Noe, L. H., Radhakrishnan, J., Seshan, S. V., Bajema, I. M. y Bruijn, J. A. (2010). Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 556-563.

Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J. y Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chem.* 126, 514-519.

Coşkuner, Y. y Tekin, A. (2003). Monitoring of seed composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L) fruits during maturation period. *J. Sci. Food Agric.* 83, 846-849.

Cruz Sánchez, G. (1951). Estudio folklórico de algunas plantas medicamentosas y tóxicas de la región norte del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 8, 1-4.

Dabla, P. K. (2010). Renal function in diabetic nephropathy. *World J. Diabetes* 1, 48-56.

Das, U. N. (2006). Essential Fatty acids - a review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 467-482.

Das, U. N. (2015). Nutritional factors in the prevention and management of coronary artery disease and heart failure. *Nutrition* 31, 283-291.

- de Smet, P. A. (2002). Herbal remedies. *N. Engl. J. Med.* 347, 2046-2056.
- Dell, R. B., Mott, G. E., Jackson, E. M., Ramakrishnan, R., Carey, K. D., McGill, H. C., Jr. y Goodman, D. S. (1985). Whole body and tissue cholesterol turnover in the baboon. *J. Lipid Res.* 26, 327-337.
- Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M. y Taper, H. S. (2002). Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br. J. Nutr.* 87 Suppl. 2, S255-S259.
- Delzenne, N. M. y Kok, N. N. (1999). Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J. Nutr.* 129, 1467S-1470S.
- Dhuria, R. S., Singh, G., Kaur, A., Kaur, R. y Kaur, T. (2015). Current status and patent prospective of animal models in diabetic research. *Adv. Biomed. Res.* 4, 1-14.
- Doyle, E. A. (2015). Autoimmune conditions associated with type 1 diabetes. *Pediatr. Nurs.* 41, 89-91.
- Drucker, D. J. (2003). Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol. Endocrinol.* 17, 161-171.
- Drucker, D. J. (2016). Evolving concepts and translational relevance of enteroendocrine cell biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 101, 778-786.
- Drummond, K. y Mauer, M. (2002). The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes* 51, 1580-1587.
- Easom, R. A. y Zammit, V. A. (1985). Effects of diabetes on the expressed and total activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver *in vivo*. Reversal by insulin treatment. *Biochem. J.* 230, 747-752.
- El-Abhar, H. S. y Schaalán, M. F. (2014). Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J. Diabetes* 5, 176-197.
- El Finti, A., El Boullani, R., Fallah, M., Msanda, F. y El Mousadik, A. (2013). Assessment of some agro-technological parameters of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica* Mill.) in Morocco cultivars. *J. Med. Plants Res.* 7, 2574-2583.
- El Mannoubi, I., Barrek, S., Skanji, T., Casabianca, H. y Zarrouk, H. (2009). Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia. *Chem. Nat. Compd.* 45, 616-620.

- Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S. y Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J. Diabetes Metab Disord.* 12, 1-7.
- Elosta, A., Ghous, T. y Ahmed, N. (2012). Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. *Curr. Diabetes Rev.* 8, 92-108.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. y Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43, 1528-1533.
- ENFR - 3ª Encuesta Nacional de Factores de Riesgo Para Enfermedades No Transmisibles (2014).
- Enigbokan, M. A., Felder, T. B. y Thompson, J. O. (1996). Hypoglycaemic effects of *Opuntia ficus-indica* Mill., *Opuntia lindheimeri* Engelm and *Opuntia robusta* Wendl. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* 10, 379-382.
- Ennouri, M., Bourret, E., Laurence, M. y Attia, H. (2005). Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chem.* 93, 431-437.
- Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N. y Attia, H. (2006a). Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. *Bioresour. Technol.* 97, 1382-1386.
- Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N., Guermazi, F. y Attia, H. (2006b). Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats. *Bioresour. Technol.* 97, 2136-2140.
- Etuk, E. U. (2010) Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2, 130-134.
- Ezuruike, U. F. y Prieto, J. M. (2014). The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: pharmacological and toxicological considerations. *J. Ethnopharmacol.* 155, 857-924.
- Faas, F. H. y Carter, W. J. (1980). Altered fatty acid desaturation and microsomal fatty acid composition in the streptozotocin diabetic rat. *Lipids* 15, 953-961.
- Federici, E., Multari, G., Gallo, F. R. y Palazzino, G. (2005). Herbal drugs: from traditional use to regulation. *Ann. Ist. Super. Sanita* 41, 49-54.
- Feijó, A. (2005). Utilização de animais na investigação e docência: uma reflexão ética necessária. Ed. Edipucrs, Porto Alegre.

- Feingold, K. R., Moser, A., Adi, S., Soued, M. y Grunfeld, C. (1990). Small intestinal fatty acid synthesis is increased in diabetic rats. *Endocrinology* 127, 2247-2252.
- Fernández, M. L., Lin, E. C., Trejo, A. y McNamara, D. J. (1992). Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J. Nutr.* 122, 2330-2340.
- Fernández, M. L., Lin, E. C., Trejo, A. y McNamara, D. J. (1994). Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.* 124, 817-824.
- Fernández, M. L., Trejo, A. y McNamara, D. J. (1990). Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *J. Nutr.* 120, 1283-1290.
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C. y Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci.* 11, 2574-2589.
- FID – Federación Internacional de Diabetes (2013) Atlas de la diabetes de la FID, 6ª edición, 1-153.
- FID – Federación Internacional de Diabetes (2015) Atlas de la diabetes de la FID, 7ª edición, 1-136.
- Fiebig, R. G., Hollander, J. M. y Ji, L. L. (2001). Exercise down-regulates hepatic fatty acid synthase in streptozotocin-treated rats. *J. Nutr.* 131, 2252-2259.
- Filipov, A. (1997). La farmacopea natural en los sistemas terapéuticos de los indígenas Pilagá. *Parodiana* 10, 35-74.
- Fiordaliso, M., Kok, N., Desager, J. P., Goethals, F., Deboyser, D., Roberfroid, M. y Delzenne, N. (1995). Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids* 30, 163-167.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Font, F. (2014). A revision of *Opuntia* series *Armatae* K. Schum (*Opuntia* ser. *Elatae* Britton & Rose -Cactaceae-Opuntioideae). *Succ. PI. Res.* 8, 94.

- Forbes, J. M. y Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* 93, 137-188.
- Fowler, M. J. (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin. Diabetes* 26, 77-82.
- Frati-Munari, A. C., Altamirano-Bustamante, E., Rodríguez-Barcenas, N., Ariza-Andraca, R. y López-Ledesma, R. (1989). Hypoglycemic action of *Opuntia streptacantha* Lemaire: study using raw extracts. *Arch. Invest Med. (Mex.)* 20, 321-325.
- Frati-Munari, A. C., Gordillo, B. E., Altamirano, P., Ariza, C. R., Cortés-Franco, R., Chavez-Negrete, A. y Islas-Andrade, S. (1991). Influence of nopal intake upon fasting glycemia in type II diabetics and healthy subjects. *Arch. Invest Med. (Mex.)* 22, 51-56.
- Frati-Munari, A. C., Vera, L. O. y Ariza Andraca, C. R. (1992). Evaluation of nopal capsules in diabetes mellitus. *Gac. Med. Mex.* 128, 431-436.
- Frayn, K. N., Arner, P. y Yki-Jarvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem.* 42, 89-103.
- Friederich, M., Hansell, P. y Palm, F. (2009). Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr. Diabetes Rev.* 5, 120-144.
- Friederich-Persson, M., Aslam, S., Nordquist, L., Welch, W. J., Wilcox, C. S. y Palm, F. (2012). Acute knockdown of uncoupling protein-2 increases uncoupling via the adenine nucleotide transporter and decreases oxidative stress in diabetic kidneys. *PLoS. One.* 7, e39635.
- Frode, T. S. y Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* 115, 173-183.
- Fujihara, C. K., Padilha, R. M. y Zatz, R. (1992). Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes. Role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. *Diabetes* 41, 286-293.
- Gajdosik, A., Gajdosikova, A., Stefek, M., Navarova, J. y Hozova, R. (1999). Streptozotocin-induced experimental diabetes in male Wistar rats. *Gen. Physiol Biophys.* 18, Spec Number, 54-62.
- Galati, E. M., Tripodo, M. M., Trovato, A., d'Aquino, A. y Monforte, M. T. (2003). Biological activity of *Opuntia ficus indica* cladodes II: Effect on experimental hypercholesterolemia in rats. *Pharm. Biol.* 41, 175-179.

- Galati, E. M., Monforte, M. T., Miceli, N., Mondello, M. R., Taviano, M. F., Galluzzo, M. y Tripodo, M. M. (2007). *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. mucilages show cytoprotective effect on gastric mucosa in rat. *Phytother. Res.* 21, 344-346.
- Galizzi, F. A., Felker, P., González, C. y Gardiner, D. (2004). Correlations between soil and cladode nutrient concentrations and fruit yield and quality in cactus pears, *Opuntia ficus indica* in a traditional farm setting in Argentina. *J. Arid Environ.* 59, 115-132.
- Galvez, M. J., Castro, H. A. y Villamil, C. B. (2009). Antigenic patterns of seed proteins in *Opuntioideae* (Cactaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 91-97.
- Gao, J., Han, Y. L., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Zha, X. Q., Chen, H. Q. y Yin, Y. Y. (2015). Protective effect of polysaccharides from *Opuntia dillenii* Haw. fruits on streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydr. Polym.* 124, 25-34.
- Gellhorn, A. y Benjamin, W. (1964). The intracellular localization of an enzymatic defect of lipid metabolism in diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* 84, 167-175.
- Gengiah, K., Hari, R. y Anbu, J. (2014). Antidiabetic antihyperlipidemic and hepato-protective effect of Gluconorm-5: A polyherbal formulation in streptozotocin induced hyperglycemic rats. *Anc. Sci. Life* 34, 23-32.
- Ghazi, Z., Ramdani, M., Fauconnier, M. L., El Mahi, B. y Cheikh, R. (2013). Fatty acids sterols and vitamin E composition of seed oil of *Opuntia ficus indica* and *Opuntia dillenii* from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 4, 967-972.
- Ghorbani, A. (2014). Clinical and experimental studies on polyherbal formulations for diabetes: current status and future prospective. *J. Integr. Med.* 12, 336-345.
- Giacco, F. y Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058-1070.
- Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Faulds, C. B. y Waldron, K. W. (2009). Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10323-10330.
- Godard, M. P., Ewing, B. A., Pischel, I., Ziegler, A., Benedek, B. y Feistel, B. (2010). Acute blood glucose lowering effects and long-term safety of OpunDia supplementation in pre-diabetic males and females. *J. Ethnopharmacol.* 130, 631-634.
- Goldberg, I. J., Eckel, R. H. y McPherson, R. (2011). Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1716-1725.

- Granados-Sánchez, D., Hernández-García, M. A., Vázquez-Alarcón, A. y Ruíz-Puga, P. (2013). The processes of desertification and arid regions. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 19, 45-66.
- Grube, B., Chong, P. W., Lau, K. Z. y Orzechowski, H. D. (2013). A natural fiber complex reduces body weight in the overweight and obese: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Obesity* 21, 58-64.
- Gruden, G., Perin, P. C. y Camussi, G. (2005). Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Curr. Diabetes Rev.* 1, 27-40.
- Grussner, R., Nakhleh, R., Grussner, A., Tomadze, G., Diem, P. y Sutherland, D. (1993). Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs. *Horm. Metab. Res.* 25, 199-203.
- Guevara, J.C., Gonnet, J. M. y Estevez, O. R. (2000). Frost hardiness and production of *Opuntia* forage clones in the Mendoza plain, Argentina. *J. Arid Environ.* 46, 199-207.
- Guevara-Arauza, J. C., Ornelas-Paz, J. J., Pimentel-González, D. J., Rosales Mendoza, S., Soria Guerra, R. E. y Paz Maldonado, L. M. T. (2012). Prebiotic effect of mucilage and pectic-derived oligosaccharides from nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Food Sci. Biotechnol.* 21, 997-1003.
- Gylling, H., Tuominen, J. A., Koivisto, V. A. y Miettinen, T. A. (2004). Cholesterol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 2217-2222.
- Habib, N. C., Honore, S. M., Genta, S. B. y Sánchez, S. S. (2011). Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: biochemical approach. *Chem. Biol. Interact.* 194, 31-39.
- Habib, N. C., Serra-Barcellona, C., Honoré, S. M., Genta, S. B. y Sánchez, S. S. (2015). Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats. *Pharm. Biol.* 53, 1183-1193.
- Hahm, S. W., Park, J., Oh, S. Y., Lee, C. W., Park, K. Y., Kim, H. y Son, Y. S. (2015). Anticancer properties of extracts from *Opuntia humifusa* against human cervical carcinoma cells. *J. Med. Food* 18, 31-44.
- Hahm, S. W., Park, J., Park, K. Y., Son, Y. S. y Han, H. (2016). Extracts of *Opuntia humifusa* fruits inhibit the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* 21, 31-37.

- Hahm, S. W., Park, J. y Son, Y. S. (2011). *Opuntia humifusa* stems lower blood glucose and cholesterol levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* 31, 479-487.
- Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y. y Kiriya, S. (1999). Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J. Nutr.* 129, 942-948.
- Hassan Abd El-Razek, F. y Hassan, A. A. (2011). Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5, 356-377.
- Hebden, R. A., Gardiner, S. M., Bennett, T. y MacDonald, I. A. (1986). The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin. Sci. (Lond)* 70, 111-117.
- Heinrich, M., Frei, H. B. y Leonti, M. (2014). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *J. Nat. Prod.* 77, 678-689.
- Hernández-Urbiola, M. I., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Quevedo, G., Rojas-Molina, J. I., Cortes, M. E. y Rodríguez-García, M. E. (2010). Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Open Nutr. J.* 4, 11-16.
- Hfaiedh, N., Allagui, M. S., Hfaiedh, M., Feki, A. E., Zourgui, L. y Croute, F. (2008). Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3759-3763.
- Hojs, R., Ekart, R., Bevc, S. y Hojs, N. (2015). Biomarkers of renal disease and progression in patients with diabetes. *J. Clin. Med.* 4, 1010-1024.
- Honoré, S. M., Cabrera, W. M., Genta, S. B. y Sánchez, S. S. (2012). Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1704-1715.
- Horrocks, L. A. y Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40, 211-225.
- Hostetter, T. H., Troy, J. L. y Brenner, B. M. (1981). Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 19, 410-415.
- Ibrahim, D. S. y Abd El-Maksoud, M. A. (2015). Effect of strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 96, 87-93.

- Inglese, P., Basile, F. y Schirra, M. (2002). Cactus per fruit production. En, *Cacti. Biology and Uses* (Nobel, P. S. ed.), Ed. University of California Press, Los Angeles, 163-183.
- Jain, G. C. y Jangir, R. N. (2014). Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacogn. Rev.* 8, 113-121.
- Janzen, K. M., Steuber, T. D. y Nisly, S. A. (2016). GLP-1 agonists in type 1 diabetes mellitus. *Ann. Pharmacother.* 50, 656-665.
- Jaramillo-Flores, M. E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-Alvarez, L., Gutiérrez-López, G. F. y Hernández-Sánchez, H. (2003). Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Sci. Technol. Int.* 9, 271-278.
- Jones, J. G. (2016). Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 59, 1098-1103.
- Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. y Renold, A. E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48, 2129-2139.
- Kagohashi, Y. y Otani, H. (2015). Role of nutritional factors at the early life stages in the pathogenesis and clinical course of type 1 diabetes. *Biomed. Res. Int.*, 1-9.
- Kalaiarasi, P., Kaviarasan, K. y Pugalendi, K. V. (2009). Hypolipidemic activity of 18 β -glycyrrhetic acid on streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 612, 93-97.
- Kalofoutis, C., Piperi, C., Kalofoutis, A., Harris, F., Phoenix, D. y Singh, J. (2007). Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches. *Exp. Clin. Cardiol.* 12, 17-28.
- Kaneto, H., Fujii, J., Seo, H. G., Suzuki, K., Matsuoka, T., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y., Kamada, T. y Taniguchi, N. (1995). Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 44, 733-738.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M. y Yamasaki, Y. (2007). Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 355-366.
- Kang, J. W., Shin, J. K., Koh, E. J., Ryu, H., Kim, H. J. y Lee, S. M. (2016). *Opuntia ficus-indica* seed attenuates hepatic steatosis and promotes M2 macrophage polarization in high-fat diet-fed mice. *Nutr. Res.* 36, 369-379.

- Kaufman, F. (2006). La "diabetes doble" en jóvenes y su tratamiento. *Diabetes Voice* 51, 19-22.
- Kaur, M., Kaur, A. y Sharma, R. (2012) Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *JAPS* 2, 15-18.
- Kazumi, T., Yoshino, G., Fujii, S. y Baba, S. (1978). Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. *Cancer Res.* 38, 2144-2147.
- Keane, W. F. (2000). The role of lipids in renal disease: future challenges. *Kidney Int. Suppl.* 75, S27-S31.
- Keller, J., Camare, C., Bernis, C., Astello-García, M., de la Rosa, A. P., Rossignol, M., del Socorro Santos, D. M., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. y Gueraud, F. (2015). Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia* cladodes: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *J. Physiol. Biochem.* 71, 577-587.
- Kielgast, U., Holst, J. J. y Madsbad, S. (2011). Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes* 60, 1599-1607.
- Kiesling, R. (2005). Cactaceae. (Bacigalupo, N. M. ed.). FI. II Entre Ríos, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agrop. 4, 401-444.
- Kim, S. H., Jeon, B. J., Kim, D. H., Kim, T. I., Lee, H. K., Han, D. S., Lee, J. H., Kim, T. B., Kim, J. W. y Sung, S. H. (2012). Prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* var. saboten) protects against stress-induced acute gastric lesions in rats. *J. Med. Food* 15, 968-973.
- Kim, Y. y Park, C. W. (2016). Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy. *Kidney Res. Clin. Pract.* 35, 69-77.
- Kleinsek, D. A., Dugan, R. E., Baker, T. A. y Porter, J. W. (1981). 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from rat liver. *Methods Enzymol.* 71 Pt C, 462-479.
- Kojima, H., Hidaka, H., Matsumura, K., Fujita, Y., Yamada, S., Haneda, M., Yasuda, H., Kikkawa, R. y Kashiwagi, A. (1999). Effect of glycemic control on plasma plant sterol levels and post-heparin diamine oxidase activity in type 1 diabetic patients. *Atherosclerosis* 145, 389-397.
- Kojima, H., Omoto, Y., Hidaka, H., Aoki, T., Nakamura, T., Kawabata, T., Konaka, K., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. y Shigeta, Y. (1992). Increased plasma post-heparin

diamine oxidase activity and plant sterol levels in streptozotocin diabetic rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 398-404.

Kok, N., Roberfroid, M. y Delzenne, N. (1996). Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45, 1547-1550.

Kong, L. L., Wu, H., Cui, W. P., Zhou, W. H., Luo, P., Sun, J., Yuan, H. y Miao, L. N. (2013). Advances in murine models of diabetic nephropathy. *J. Diabetes Res.*, 1-10.

Konrad, R. J., Mikolaenko, I., Tolar, J. F., Liu, K. y Kudlow, J. E. (2001). The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem. J.* 356, 31-41.

Kroncke, K. D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodríguez, M. L. y Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 179-185.

Kugler, F., Graneis, S., Schreiter, P. P., Stintzing, F. C. y Carle, R. (2006). Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4311-4318.

Kumar, N. A. y Pari, L. (2006). Combined n-benzoyl-d-phenylalanine and metformin treatment reverses changes in the fatty acid composition of streptozotocin diabetic rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 17, 17-28.

Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H. y Nakao, K. (2014). Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.* 18, 584-592.

Kwon, N. S., Lee, S. H., Choi, C. S., Kho, T. y Lee, H. S. (1994). Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB J.* 8, 529-533.

Labra, M., Grassi, F., Bardini, M., Imazio, S., Guiggi, A., Citterio, S., Banfi, E. y Sgorbati, S. (2003). Genetic relationships in *Opuntia* Mill. genus (Cactaceae) detected by molecular marker. *Plant Sci.* 165, 1129-1136.

Lambert, J. E., Ryan, E. A., Thomson, A. B. y Clandinin, M. T. (2013). *De novo* lipogenesis and cholesterol synthesis in humans with long-standing type 1 diabetes are comparable to non-diabetic individuals. *PLoS. One.* 8, e82530.

- Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J. y Jang, Y. S. (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6490-6496.
- Letawe, C., Boone, M. y Pierard, G. E. (1998). Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. *Clin. Exp. Dermatol.* 23, 56-58.
- Levetan, C. (2010). Distinctions between islet neogenesis and beta-cell replication: implications for reversal of Type 1 and 2 diabetes. *J. Diabetes* 2, 76-84.
- Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M. W., Hogg, R. J., Perrone, R. D., Lau, J. y Eknoyan, G. (2003). National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann. Intern. Med.* 139, 137-147.
- Lewis, G. F., Xiao, C. y Hegele, R. A. (2015). Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr. Rev.* 36, 131-147.
- Linarès, E., Thimonier, C. y Degre, M. (2007). The effect of NeOpuntia[®] on blood lipid parameters - risk factors for the metabolic syndrome (syndrome X). *Adv. Ther.* 24, 1115-1125.
- Liu, I. M., Tzeng, T. F., Liou, S. S. y Chang, C. J. (2009). The amelioration of streptozotocin diabetes-induced renal damage by Wu-Ling-San (Hoelen Five Herb Formula), a traditional Chinese prescription. *J. Ethnopharmacol.* 124, 211-218.
- Liu, W., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Tong, M. H., Wu, N., Liu, X. L. y Zhang, S. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chem.* 114, 334-339.
- Liu, Z., Long, W., Fryburg, D. A. y Barrett, E. J. (2006). The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J. Nutr.* 136, 212S-217S.
- Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Rashed, K., Statti, G. A., Hufner, A. y Menichini, F. (2007). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother. Res.* 21, 32-36.
- López-Palacios, C., Peña-Valdivia, C. B., Rodríguez-Hernández, A. I. y Reyes-Aguero, J. A. (2016). Rheological flow behavior of structural polysaccharides from edible tender cladodes of wild, semidomesticated and cultivated 'nopal' (*Opuntia*) of mexican highlands. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 1-8.

- López-Romero, L., Romero, E. y Villar, P. (2014a). Assessing the stability of psychopathic traits: adolescent outcomes in a six-year follow-up. *Span. J. Psychol.* 17, E97.
- López-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Avila-Nava, A., Vázquez-Manjarrez, N., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J. y Torres, N. (2014b). The effect of nopal (*Opuntia ficus indica*) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in Mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts. *J. Acad. Nutr. Diet.* 114, 1811-1818.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lozano, L. (2011). Ecofisiología de la tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Horticultura Argentina* 30, 37-52.
- Lozano, L. (2013). Nopalitos: Alternative food for the north of Argentina. *Cactusnet Newsletter* 13, 107-115.
- Luo, C., Zhang, W., Sheng, C., Zheng, C., Yao, J. y Miao, Z. (2010). Chemical composition and antidiabetic activity of *Opuntia* Milpa Alta extracts. *Chem. Biodivers.* 7, 2869-2879.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. y Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104, 305-344.
- Maher, P., Dargusch, R., Ehren, J. L., Okada, S., Sharma, K. y Schubert, D. (2011). Fisetin lowers methylglyoxal dependent protein glycation and limits the complications of diabetes. *PLoS. One.* 6, e21226.
- Marella, S., Maddirela, D. R., Badri, K. R., Jyothi Kumar, M. V. y Chippada, A. (2015). Antihyperlipidemic and biochemical activities of Mcy protein in streptozotocin induced diabetic rats. *Cell Physiol. Biochem.* 35, 1326-1334.
- Marles, R. J. y Farnsworth, N. R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomed.* 2, 137-189.
- Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 873-893.
- McConn, M. M. y Nakata, P. A. (2004). Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1371-1374.

- McGonigle, P. y Ruggeri, B. (2014). Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem. Pharmacol.* 87, 162-171.
- Meckes-Lozyoa, M. y Roman-Ramos, R. (1986). *Opuntia streptacantha*: a coadjutor in the treatment of diabetes mellitus. *Am. J. Chin. Med.* 14, 116-118.
- Mercuri, O., Peluffo, R. O. y Brenner, R. R. (1966). Depression of microsomal desaturation of linoleic to γ -linolenic acid in the alloxan-diabetic rat. *Biochim. Biophys. Acta* 116, 409-411.
- Mercuri, O., Peluffo, R. O. y Brenner, R. R. (1967). Effect of insulin on the oxidative desaturation of α -linolenic, oleic and palmitic acids. *Lipids* 2, 284-285.
- Miettinen, T. A., Gylling, H., Tuominen, J., Simonen, P. y Koivisto, V. (2004). Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27, 53-58.
- Miller, M., Stone, N. J., Ballantyne, C., Bittner, V., Criqui, M. H., Ginsberg, H. N., Goldberg, A. C., Howard, W. J., Jacobson, M. S., Kris-Etherton, P. M., Lennie, T. A., Levi, M., Mazzone, T. y Pennathur, S. (2011). Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 123, 2292-2333.
- Mima, A. (2013). Diabetic nephropathy: protective factors and a new therapeutic paradigm. *J. Diabetes Complicat.* 27, 526-530.
- Mizrahi, Y., Nerd, A. y Nobel, P. S. (1997). Cacti as crops. *Hort. Rev.* 18, 291-320.
- Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S. A. y Splittstoesser, W. E. (1996). A note on the uses of *Opuntia* spp. in Central/North America. *J. Arid Environ.* 32, 347-353.
- Mondragón-Jacobo, C. y Pérez-González, S. (2003). El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. *Estudio FAO Producción y Protección Vegetal*, Ed. FAO, Roma, 169.
- Mooradian, A. D. (2009). Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab* 5, 150-159.
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sanchez-Mata, M., Carvalho, A. M. y Ferreira, I. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.* 46, 279-285.
- Morán-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., López-Romero, P. y Torres, N. (2012). *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic

- steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Nutr.* 142, 1956-1963.
- Morrison, W. R. y Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600-608.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. (2006). Cactus Pear Fruits (*Opuntia* spp.): A Review of Processing Technologies and Current Uses. *J. Profess. Assoc. Cactus Develop.* 8, 1-25.
- Muñoz de Chávez, M., Chávez, A., Valles, V. y Roldán, J. A. (1995). The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev. Nutr. Diet.* 77, 109-134.
- Muñoz, L., Díaz, Y., González, C., Medina, E. y Cardona, E. (2014). Efecto de la administración oral de nopal deshidratado sobre el perfil de lípidos en individuos con dislipidemia y sobrepeso/obesidad. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1, 149-159.
- Murea, M., Freedman, B. I., Parks, J. S., Antinozzi, P. A., Elbein, S. C. y Ma, L. (2010). Lipotoxicity in diabetic nephropathy: the potential role of fatty acid oxidation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 2373-2379.
- Musabayane, C. T., Ndhlovu, C. E. y Balment, R. J. (1995). Renal fluid and electrolyte handling in streptozotocin-diabetic rats. *Ren. Fail.* 17, 107-116.
- Najm, W. y Lie, D. (2010). Herbals used for diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *Prim. Care* 37, 237-254.
- Nassar, A. G. (2008). Chemical composition and functional properties of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) seeds flour and protein concentrate. *World J. Dairy & Food Sci.* 3, 11-16.
- Ncibi, S., Ben, O. M., Akacha, A., Krifi, M. N. y Zourgui, L. (2008). *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food Chem. Toxicol.* 46, 797-802.
- Nepokroeff, C. M., Lakshmanan, M. R. y Porter, J. W. (1975). Fatty-acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol.* 35, 37-44.
- Ngubane, P. S., Hadebe, S. I., Serumula, M. R. y Musabayane, C. T. (2015). The effects of transdermal insulin treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on kidney function and renal expression of glucose transporters. *Ren. Fail.* 37, 151-159.

- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le, B. J., Siliart, B. y Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 92, 272-283.
- Niedowicz, D. M. y Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 43, 289-330.
- Niesen, M., Bedi, M. y López, D. (2008). Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 470, 111-115.
- Nobel, P. S. (1994). Remarkable agaves and cacti. Ed. Oxford University Press, New York, 166 págs.
- Nobel, P. S. (1995). Environmental Biology. En *Agroecología, cultivo y usos del nopal*, Ed. FAO, América Latina y el Caribe, Tomo 132, 36-48.
- Nobel, P. S. (1998). Los incomparables ágaves y cactus. Ed. Trillas, México, 211 págs.
- Nobel, P. S. (1999). Environmental Biology. En *Agroecología, cultivo y usos del nopal*, Ed. FAO, América Latina y el Caribe, 132, 37-50.
- Nobel, P. S. y Bobich, E. G. (2002). Environmental Biology. *Cacti-Biology and Uses* (Nobel, P. S. ed.), University of California Press, Los Angeles, 57-74.
- Nobel, P. S. e Israel, A. A. (1994). Cladode development, environmental responses of CO₂ uptake, and productivity for *Opuntia ficus-indica* under elevated CO₂. *J. Exp. Botany* 45, 295-303.
- Nobel, P. S., Pimienta-Barrios, E., Zañudo Hernández, J. y Ramírez-Hernández, B. C. (2002). Historical aspects and net CO₂ uptake for cultivated Crassulacean acid metabolism plants in México. *Annals Appl. Biol.* 140, 133-142.
- Ochoa, J. (1997). Estado actual del nopal en la República Argentina. En *Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, Monterrey, Mexico, b, 21-27.
- Ochoa, J. (2003). Principales características de las distintas variedades de tuna (*Opuntia* spp.) de la República Argentina. *Cactusnet Newsletter*, Número especial.
- OMS - Organización mundial de la salud (2016) Informe mundial sobre la diabetes.
- Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., Garduno-Siciliano, L., Alvarez, V. B. y Hernández-Navarro, M. D. (2012). Antihyperlipidemic effect of methanolic extract from *Opuntia joconostle* seeds in mice fed a hypercholesterolemic diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67, 365-370.

- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E. y Mori, M. (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10845-10850.
- Özcan, M. M. y Al Juhaimi, F. Y. (2011). Nutritive value and chemical composition of prickly pear seeds (*Opuntia ficus indica* L.) growing in Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62, 533-536.
- Packard, C. J., Ford, I., Robertson, M., Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Gaw, A., Hyland, M., Jukema, J. W., Kamper, A. M., Macfarlane, P. W., Perry, I. J., Stott, D. J., Sweeney, B. J., Twomey, C. y Westendorp, R. G. (2005). Plasma lipoproteins and apolipoproteins as predictors of cardiovascular risk and treatment benefit in the PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER). *Circulation* 112, 3058-3065.
- Padilla-Camberos, E., Flores-Fernandez, J. M., Fernandez-Flores, O., Gutierrez-Mercado, Y., Carmona-de la Luz, J., Sandoval-Salas, F., Mendez-Carretero, C. y Allen, K. (2015). Hypocholesterolemic effect and *in vitro* pancreatic lipase inhibitory activity of an *Opuntia ficus-indica* extract. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1-4.
- Palumbo, B., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, J., Oguogho, A., Budinsky, A., Palumbo, R. y Sinzinger, H. (2003). Prickly pear induces upregulation of liver LDL binding in familial heterozygous hypercholesterolemia. *Nucl. Med. Rev. Cent. East Eur.* 6, 35-39.
- Parasuraman, S., Thing, G. S. y Dhanaraj, S. A. (2014). Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. *Pharmacogn. Rev.* 8, 73-80.
- Parhofer, K. G. (2015). Interaction between glucose and lipid metabolism: More than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab. J.* 39, 353-362.
- Pari, L. y Venkateswaran, S. (2004). Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes. *J. Med. Food* 7, 204-209.
- Park, E. H., Kahng, J. H., Lee, S. H. y Shin, K. H. (2001). An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 72, 288-290.
- Park, E. H., Kahng, J. H. y Paek, E. A. (1998). Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* 21, 30-34.
- Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., Arroyo-Peña, V. B., Sánchez Urdaneta, A. B. y Balois, M. R. (2012). Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in

domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). Chem. Biodivers. 9, 1599-1610.

Perfumi, M. y Tacconi, R. (1996). Antihyperglycemic effect of fresh *Opuntia dillenii* fruit from Tenerife (Canary Islands). Int. J. Pharmacog. 34, 41-47.

Pimienta-Barrios, E. (1990). El nopal Tunero. En Libros de tiempos de ciencia, Ed. Universidad de Guadalajara, México, Tomo 5, 246 págs.

Pimienta-Barrios, E. (1994). Prickly Pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. J. Arid Environ. 28, 1-11.

Piyachaturawat, P., Poprasit, J. y Glinsukon, T. (1991). Gastric mucosal secretions and lesions by different doses of streptozotocin in rats. Toxicol. Lett. 55, 21-29.

Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D. y Fontes, G. (2010). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. Biochim. Biophys. Acta 1801, 289-298.

Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. y Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2924-2929.

Prieto-García, F., Filardo-Kerstup, S., Pérez-Cruz, E., Beltrán-Hernández, R., Román-Gutiérrez, A. y Méndez-Marzo, M. (2006). Caracterización física y química de semillas de *Opuntias* (*Opuntia* spp.) cultivadas en el estado de Hidalgo, México. Bioagro 18, 163-169.

Pritchard, H. N. y Hall, J. A. (1976). The chemical composition of glochids from *Opuntia*. Can. J. Bot. 54, 173-176.

Qinna, N. A. y Badwan, A. A. (2015). Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. Drug Des. Devel. Ther. 9, 2515-2525.

Qiu, Y. K., Zhao, Y. Y., Dou, D. Q., Xu, B. X. y Liu, K. (2007). Two new alpha-pyrone and other components from the cladodes of *Opuntia dillenii*. Arch. Pharm. Res. 30, 665-669.

Rajasekaran, S., Ravi, K., Sivagnanam, K. y Subramanian, S. (2006). Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33, 232-237.

Ramadan, M. F. y Mörsel, J. T. (2003). Lipid profile of prickly pear pulp fractions. Food Agric. Environ. 1, 66-70.

- Ramkumar, K. M., Vijayakumar, R. S., Ponmanickam, P., Velayuthaprabhu, S., Archunan, G. y Rajaguru, P. (2008). Antihyperlipidaemic effect of *Gymnema montanum*. a study on lipid profile and fatty acid composition in experimental diabetes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 538-545.
- Ranganath, L. R. (2008). Incretins: pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *J. Clin. Pathol.* 61, 401-409.
- Ravi, K., Rajasekaran, S. y Subramanian, S. (2005). Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1433-1439.
- Rerup, C. C. (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22, 485-518.
- Retamal, N., Durán, J. M. y Fernández, J. (1987). Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) miller). *J. Sci. Food Agric.* 38, 303-311.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre, J. R. y Valiente-Banuet, A. (2006). Reproductive biology of *Opuntia*. A review. *J. Arid Environ.* 64, 549-585.
- Roberts, C. K. y Sindhu, K. K. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 84, 705-712.
- Rodríguez, Y. E. (2012). Ethical challenges of genetic manipulation and research with animals. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* 29, 535-540.
- Rodríguez-Felix, A. y Cantwell, M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38, 83-93.
- Rodríguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S. W., Herrera-Ruiz, D. y Torres, E. (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 125-135.
- Rodríguez-Rodríguez, C., Torres, N., Gutiérrez-Urbe, J. A., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Leal-Díaz, A. M., Antunes-Ricardo, M., Márquez-Mota, C., Ordaz, G., Chavez-Santoscoy, R. A., Serna-Saldivar, S. O. y Tovar, A. R. (2015). The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food Funct.* 6, 805-815.
- Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L. y Alarcon-Aguilar, F. J. (1995). Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* 48, 25-32.

- Rosado, J. L. y Díaz, M. (1995). Physico-chemical properties related to gastrointestinal function of 6 sources of dietary fiber. *Rev. Invest. Clin.* 47, 283-289.
- Rouser, G., Fleischer, S. y Yamamoto, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494-496.
- Rubio-Ruiz, M. E., El, H. M., Perez-Torres, I., Banos, G. y Guarner, V. (2013). Medicinal agents and metabolic syndrome. *Curr. Med. Chem.* 20, 2626-2640.
- Sacks, F. M. (2015). The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr. Opin. Lipidol.* 26, 56-63.
- Sáenz, C. (2006). Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*, Ed. FAO, América Latina y el Caribe 162, 97 págs.
- Sáenz, C. (2013). Agro-industrial utilization of cactus pear. Ed. FAO, Roma, 150 págs.
- Saleem, R., Ahmad, M., Azmat, A., Ahmad, S. I., Faizi, Z., Abidi, L. y Faizi, S. (2005). Hypotensive activity, toxicology and histopathology of opuntioside-I and methanolic extract of *Opuntia dillenii*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1844-1851.
- Salt, T. A., Tocker, J. E. y Adler, J. H. (1987). Dominance of n5-sterols in eight species of the Cactaceae. *Phytochemistry* 26, 731-733.
- Saltiel, A. R. y Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Salvo, F., Galati, E. M., Lo Curto, S. y Tripodo, M. M. (2002). Study on the chemical characterization of lipid composition of *Opuntia ficus-indica* L. seed oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 79, 395-398.
- Samuel, V. T. y Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126, 12-22.
- Sánchez, S. S., Abregu, A. V., Aybar, M. J. y Sánchez Riera, A. N. (2000). Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biol. Int.* 24, 897-904.
- Sanders, F. W. y Griffin, J. L. (2016). *De novo* lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91, 452-468.

- Sandler, S. y Swenne, I. (1985). DNA repair synthesis in the pancreatic islets of streptozotocin-treated mice. *Diabetes Res.* 2, 255-258.
- Saoudi, M., Ben, H. A., Trigui, M., Jamoussi, K., Jaoua, S. y El, F. A. (2012). Differential oxidative stress responses to methanol in intraperitoneally exposed rats: ameliorative effects of *Opuntia vulgaris* fruit extract. *Toxicol. Ind. Health* 28, 549-559.
- Saoudi, M., Jebahi, S., Jamoussi, K., Ben, S. G., Kallel, C. y El, F. A. (2011). Haematological and biochemical toxicity induced by methanol in rats: ameliorative effects of *Opuntia vulgaris* fruit extract. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1963-1971.
- Saravanan, G. y Pari, L. (2003). Effect of Cogent db, a herbal drug, on serum and tissue lipid metabolism in experimental hyperglycaemic rats. *Diabetes Obes. Metab.* 5, 156-162.
- Scarpa, G. F. y Arenas, P. (1996). Especies y colorantes en la cocina tradicional de la Puna jujeña (Argentina). *Candollea* 51, 483-514.
- Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C. C., Abdalla, F. H., Daci da Silva, S. J., Zanini, D., Vieira, J. M., Cardoso, A. M., Schetinger, M. R. y Morsch, V. M. (2012). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 94, 374-383.
- Schofield, J. D., Liu, Y., Rao-Balakrishna, P., Malik, R. A. y Soran, H. (2016). Diabetes dyslipidemia. *Diabetes Ther.* 7, 203-219.
- Shane-McWhorter, L. (2005). Botanical dietary supplements and the treatment of diabetes: what is the evidence? *Curr. Diab. Rep.* 5, 391-398.
- Shapiro, K. y Gong, W. C. (2002). Natural products used for diabetes. *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash.)* 42, 217-226.
- Sharapin, N., Rocha, L. M., Souza Carvalho, E., Rocha de Albuquerque, E. M., Valverde Macedo dos Santos, E. y Lopes de Almeida, J. M. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. (Pinzón, S. R. ed.), CAB – CYTED, Colombia, 1-26.
- Shimano, H. (2009). SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.* 276, 616-621.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13656-13661.

Simões, C., Domingues, P., Ferreira, R., Amado, F., Duarte, J. A., Vitorino, R., Neuparth, m. J., Nunes, C., Rocha, C., Duarte, I. y Domingues, M. R. (2013). Remodeling of liver phospholipidomic profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 538, 95-102.

Simopoulos, A. P. (2013). Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 5, 2901-2923.

Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* 8, 128.

Sinclair, H. M. (1990). Essential fatty acids - an historical perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 756-761.

Snyman, H. A. (2004). Effect of various water applications on root development of *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta* under greenhouse growth conditions. *J. Profess. Assoc. Cactus Develop.* 6, 35-61.

Snyman, H. A. (2005). A case study on in situ rooting profiles and water-use efficiency of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*. *J. Profess. Assoc. Cactus Develop.* 7, 1-21.

Snyman, H. A. (2006). A greenhouse study on root dynamics of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*. *J. Arid Environ.* 65, 529-542.

Sotnikova, R., Skalska, S., Okruhlicova, L., Navarova, J., Kyselova, Z., Zurova, J., Stefek, M., Hozova, R. y Nosalova, V. (2006). Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. *Gen. Physiol. Biophys.* 25, 289-302.

Stadler, K., Goldberg, I. J. y Susztak, K. (2015). The evolving understanding of the contribution of lipid metabolism to diabetic kidney disease. *Curr. Diab. Rep.* 15, 40-54.

Stanely Mainzen, P. P. y Kannan, N. K. (2006). Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1373-1383.

Stintzing, F. C. y Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 175-194.

- Sudzuki, F., Muñoz, C. y Berger, H. (1993). El Cultivo de la tuna, cactus pear. Ed. Departamento de Producción Agrícola, Universidad Nacional de Chile, 88 págs.
- Suzuki, M. y Kajuu, T. (1983). Galacturonic acid and lipid metabolism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 29, 553-562.
- Sun, L., Halaihel, N., Zhang, W., Rogers, T. y Levi, M. (2002). Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 277, 18919-18927.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50, 537-546.
- Sztalryd, C. y Kraemer, F. B. (1995). Regulation of hormone-sensitive lipase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 44, 1391-1396.
- Tan, C. P. y Che Man, Y. B. (2000). Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 143-155.
- Taskinen, M. R. (2003). Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 46, 733-749.
- Taskinen, M. R. y Boren, J. (2015). New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 239, 483-495.
- Tassone, F., Broglio, F., Gianotti, L., Arvat, E., Ghigo, E. y Maccario, M. (2007). Ghrelin and other gastrointestinal peptides involved in the control of food intake. *Mini. Rev. Med. Chem.* 7, 47-53.
- Tesch, G. H. y Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 12, 261-266.
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C. y Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* 111, 415-423.
- Tlili, N., Bargougui, A., Elfalleh, W., Triki, S. y Nasri, N. (2011). Phenolic compounds, protein, lipid content and fatty acids compositions of cactus seeds. *J. Med. Plants Res.* 5, 4519-4524.
- Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A. y Adisakwattana, S. (2015). Antidiabetic activities of aqueous ethanol and n-butanol fraction of *Moringa stenopetala* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 242-250.

- Torres, D. P. M., Gonçalves, M. P. F., Teixeira, J. A., Rodriguez, L. R. (2010). Galacto-oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 9, 438-454.
- Trejo-González, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Pérez, A. M., Huízar-Contreras, M. D., Munguía-Mazariegos, M. R., Mejía-Arreguín, S. y Calva, E. (1996). A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *J. Ethnopharmacol.* 55, 27-33.
- Tziomalos, K. y Athyros, V. G. (2015). Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis. *Rev. Diabet. Stud.* 12, 110-118.
- Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A. y Okamoto, H. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 6084-6088.
- Uehara, M., Ohta, A., Sakai, K., Suzuki, K., Watanabe, S. y Adlercreutz, H. (2001). Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats. *J. Nutr.* 131, 787-795.
- Urushihara, M. y Kagami, S. (2016). Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of renal disease. *Pediatr. Nephrol.*
- Vázquez-Ramírez, R., Olguín-Martínez, M., Kubli-Garfias, C. y Hernández-Muñoz, R. (2006). Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J. Gastroenterol.* 12, 4318-4324.
- Vergès, B. (2009). Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 35, 353-360.
- Vergès, B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia* 58, 886-899.
- Vinayagam, R. y Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr. Metab. (Lond)* 12, 60-80.
- Wagener, F. A., Dekker, D., Berden, J. H., Scharstuhl, A. y van der Vlag, J. (2009). The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis* 14, 1451-1458.
- Wang, X. T., Li, J., Liu, L., Hu, N., Jin, S., Liu, C., Mei, D. y Liu, X. D. (2012). Tissue cholesterol content alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 909-917.

- Warraich, H. J., Wong, N. D. y Rana, J. S. (2015). Role for combination therapy in diabetic dyslipidemia. *Curr. Cardiol. Rep.* 17, 32.
- Wiggins, R. C. (2007). The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 71, 1205-1214.
- Willecke, F., Scerbo, D., Nagareddy, P., Obunike, J. C., Barrett, T. J., Abdillahi, M. L., Trent, C. M., Huggins, L. A., Fisher, E. A., Drosatos, K. y Goldberg, I. J. (2015). Lipolysis, and not hepatic lipogenesis, is the primary modulator of triglyceride levels in streptozotocin-induced diabetic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 102-110.
- Williamson, M. P., Behme, M. T., Dupre, J., Grant, D. R., Guan, J. y Zhong, R. (1996). Rats with portal-caval vein transposition show hyperinsulinemia and insulin resistance. *Metabolism* 45, 120-125.
- Wolfram, R. M., Kritz, H., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J. y Sinzinger, H. (2002). Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia - a pilot study. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114, 840-846.
- Wright, C. R. y Setzer, W. N. (2014). Chemical composition of volatiles from *Opuntia littoralis*, *Opuntia ficus-indica*, and *Opuntia prolifera* growing on Catalina Island, California. *Nat. Prod. Res.* 28, 208-211.
- Wu, J., Yang, X., Chen, B. y Xu, X. (2015). Pancreas β cell regeneration and type 1 diabetes (Review). *Exp. Ther. Med.* 9, 653-657.
- Xie, W. y Du, L. (2011). Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines. *Diabetes Obes. Metab.* 13, 289-301.
- Yamamoto, H., Uchigata, Y. y Okamoto, H. (1981). Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294, 284-286.
- Yang, N., Zhao, M., Zhu, B., Yang, B., Chen, C., Cui, C. y Jiang, Y. (2008) Anti-diabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 570-574.
- Yeddes, N., Cherif, J. K., Jrad, A., Barth, D. y Trabelsi-Ayadi, M. (2012). Supercritical SC-CO₂ and soxhlet n-hexane extract of tunisian *Opuntia ficus indica* seeds and fatty acids analysis. *J. Lipids* 2012, 1-6.

- Yeh, G. Y., Eisenberg, D. M., Kaptchuk, T. J. y Phillips, R. S. (2003). Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 26, 1277-1294.
- Yoon, J. A. (2013). Effects of *Opuntia ficus-indica* complex on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Food & Nutr.* 26, 526-534.
- Yoon, J. A. y Son, Y. S. (2009). Effects of fruits and stems of *Opuntia ficus-indica* on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38, 146-153.
- Young, N. L., Lopez, D. R. y McNamara, D. J. (1988). Contributions of absorbed dietary cholesterol and cholesterol synthesized in small intestine to hypercholesterolemia in diabetic rats. *Diabetes* 37, 1151-1156.
- Zafar, M., Naqvi, S. N., Ahmed, M. y Kaimkhani, Z. A. (2009). Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.* 3, 719-725.
- Zatz, R., Dunn, B. R., Meyer, T. W., Anderson, S., Renke, H. G. y Brenner, B. M. (1986). Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J. Clin. Invest.* 77, 1925-1930.
- Zhang, J., Meng, G., Zhang, C., Lin, L., Xu, N., Liu, M., Cui, F. y Jia, L. (2015). The antioxidative effects of acidic-, alkalic-, and enzymatic-extractable mycelium zinc polysaccharides by *Pleurotus djamor* on liver and kidney of streptozocin-induced diabetic mice. *BMC Complement Altern. Med.* 15, 440-452.
- Zhao, L. Y., Lan, Q. J., Huang, Z. C., Ouyang, L. J. y Zeng, F. H. (2011). Antidiabetic effect of a newly identified component of *Opuntia dillenii* polysaccharides. *Phytomed.* 18, 661-668.
- Zhao, L. Y., Zhang, S. L., Yuan, Q. X., Cheng, J. y Zeng, F. H. (2012). Immunomodulatory effects of *Opuntia dillenii* polysaccharides on specific immune function of mice. *Zhong. Yao Cai.* 35, 98-102.
- Zhou, L. y Nilsson, A. (2001). Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J. Lipid Res.* 42, 1521-1542.
- Ziyadeh, F. N. y Wolf, G. (2008). Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr. Diabetes Rev.* 4, 39-45.