

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía  
Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales**

**Efecto Hipoglucemiante de un Extracto de Fresa Rico en  
Polifenoles, en un Modelo Murino de Obesidad Inducida con Dieta  
Alta en Grasa**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y  
ALIMENTOS MEDICINALES**

**Presenta:**

**Jesús Guadalupe Espinoza Alderete**

# APROBACIÓN

**Efecto Hipoglucemiante de un Extracto de Fresa Rico en Polifenoles, en un Modelo Murino de Obesidad Inducida con Dieta Alta en Grasa**

**Autor**

**Jesús Guadalupe Espinoza Alderete**

MONICA CASTRO ACOSTA

---

Dra. Mónica Lizzette Castro Acosta  
Directora de tesis



---

Dra. Verónica López Teros  
Codirectora de tesis



---

Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez  
Asesora



---

Dr. Francisco Cabrera Chávez  
Asesor



---

Dr. Álvaro Montoya Rodríguez  
Asesor

## DERECHOS DE AUTOR



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

### CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 14 del mes de agosto del año 2020, el que suscribe L.N. Jesús Guadalupe Espinoza Alderete alumno del Programa de Maestría de Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales con número de cuenta 09158316, de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de las Dras. Mónica Lizzette Castro Acosta y Verónica López Teros, y cede los derechos del trabajo titulado “Efecto Hipoglucemiante de un Extracto de Fresa Rico en Polifenoles, en un Modelo Murino de Obesidad Inducida con Dieta Alta en Grasa”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Jesús GPe.*

---

Jesús Guadalupe Espinoza Alderete

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por abrirme las puertas de sus instalaciones y permitirme continuar mi formación académica.

A la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía por compartir su espacio de trabajo y permitir el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los apoyos otorgados en mi etapa como estudiante.

A PRODEP por el financiamiento del proyecto.

Al Laboratorio de Investigación No. 2, de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, especialmente a la Dra. Mónica Lizzette Castro Acosta por compartirme sus enseñanzas y asesorías durante mi desarrollo como estudiante de posgrado.

A la Universidad de Sonora, por permitirme hacer una estancia de investigación en el Laboratorio de Nutrición con la Dra. Verónica López Teros y en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas con la Dra. Maribel Ovando Martínez.

Al Dr. Francisco Cabrera Chávez por permitirme utilizar los equipos e instalaciones del Laboratorio de Investigación No. 2 de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía.

A la North Dakota State University, especialmente a la Dra. Senay Simsek y Dra. Alice Fujita por la realización del análisis cromatográfico en plasma.

Al Dr. Humberto Astiazarán por la capacitación en las técnicas para la eutanización y punción cardíaca en modelo murino.

Al M.C. Orlando Tortoledo Ortiz por su apoyo técnico en el análisis proximal del extracto de fresa rico en polifenoles.

A mis asesores Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez, Dr. Álvaro Montoya Rodríguez y Dr. Francisco Cabrera Chávez por sus observaciones puntuales a lo largo del desarrollo del proyecto de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Paola Galindo Vidales, Yubel Alarcón Rodríguez, Elena Angulo Leyva, Lorena Serrano Corral y Alma Felix Heras por su apoyo para la obtención de datos fundamentales presentados en este trabajo de tesis.

A mi novia Heidy Vega Gaxiola por su apoyo en la obtención de datos presentados en el presente trabajo.

A mi familia por su apoyo incondicional Delia Yolanda, Fredi Samuel y Yolivet.

# DEDICATORIA

*A Delia Yolanda Alderete Pérez*

# ÍNDICE

DERECHOS DE AUTOR .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
DEDICATORIA .....	IV
ÍNDICE .....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XII
RESUMEN.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	4
Polifenoles.....	4
Antocianinas .....	4
Ingesta dietaria .....	8
Absorción, distribución, metabolismo y excreción.....	14
Metabolismo de antocianinas por la microbiota intestinal.....	17
Polifenoles y salud .....	18
Diabetes .....	19
Epidemiología .....	19
Diabetes tipo 2 .....	20
Patogénesis .....	21
Resistencia a la insulina.....	23
Tratamiento.....	25
Modificaciones en el estilo de vida. ....	26

Antocianinas de frutos rojos y diabetes tipo 2.....	27
Estudios epidemiológicos.....	28
Estudios clínicos.....	30
Estudios en modelos animales.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS.....	39
Objetivo general.....	39
Objetivos específicos.....	39
METODOLOGÍA.....	40
Diseño experimental.....	40
Extracto de fresa rico en polifenoles (EFRP).....	40
Estudio 1: 0, 6 y 12 mg de EFRP.....	42
Estudio 2: 0, 18 y 24 mg de EFRP.....	42
Prueba de tolerancia oral a la glucosa.....	46
Determinación de insulina.....	48
Eutанизación y punción cardiaca.....	48
Análisis del extracto de fresa rico en polifenoles.....	49
Proximal.....	49
Determinación de polifenoles totales y flavonoides.....	50
Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de fresa.....	51
Determinación de polifenoles en plasma.....	52
Preparación de las muestras.....	52
Análisis HPLC/DAD y obtención de fracciones de corrida.....	53
Análisis cualitativo ESI- QTOF-MS de polifenoles en plasma.....	53



Análisis cuantitativo por LC-QTOF-MS de polifenoles en plasma .....	54
Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
Ganancia de peso corporal.....	56
Consumo de alimento y calorías.....	60
Glucosa en ayuno .....	62
Estudio 1: Efecto de las dosis de 6 y 12 mg del EFRP sobre la glucosa postprandial.....	64
Prueba de tolerancia oral a la glucosa.....	64
Concentración máxima de glucosa postprandial.....	66
Tiempo máximo para alcanzar la $C_{max}$ de glucosa postprandial.....	68
Área bajo la curva e incremento del área bajo la curva de glucosa postprandial .....	70
Insulina sérica .....	73
Estudio 2: Efecto de las dosis de 18 y 24 mg del EFRP sobre la glucosa postprandial.....	75
Prueba de tolerancia oral a la glucosa.....	75
Concentración máxima de glucosa postprandial.....	77
Tiempo máximo para alcanzar la $C_{max}$ de glucosa postprandial.....	77
Área bajo la curva e incremento del área bajo la curva de glucosa postprandial .....	77
Extracto de fresa rico en polifenoles .....	83
Fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante .....	83
Determinación de polifenoles en plasma .....	84
Identificación de metabolitos presentes el plasma .....	84
Cuantificación de metabolitos presentes en plasma .....	86

CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
ANEXOS .....	105
ANEXO 1 .....	106
ANEXO 2.....	107
ANEXO 3.....	108

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Estructura química general de los flavonoides. ....	6
2	Estructura base de las antocianinas .....	6
3	Principales antocianidinas presentes en plantas y alimentos ...	7
4	Ratones de la cepa C57BL/6N expuestos a las dosis 0, 6 o 12 mg del extracto de fresa rico en polifenoles.....	43
5	Esquematización de las evaluaciones en el periodo con dietas especiales .....	44
6	Ratones de la cepa C57BL/6N expuestos a las dosis: 0, 18 o 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles .....	45
7	Prueba de tolerancia oral a la glucosa .....	47
8	Peso inicial de los ratones de la cepa C57BL/6N en los estudios 1 y 2 .....	57
9	Ganancia de peso corporal en el curso de las 11 semanas con dietas especiales.....	58
10	Diferencias en ganancia de peso corporal después de 11 semanas con las dietas especiales.....	59
11	Efectos de las dosis de 6 y 12 mg del extracto de fresa sobre el aumento en la concentración de la glucosa postprandial en ratones de la cepa C57BL/6N .....	65
12	$C_{max}$ de glucosa postprandial en ratones administrados con 0, 6 y 12 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa .....	67
13	$T_{max}$ para alcanzar la $C_{max}$ de glucosa postprandial en ratones expuestos a las dosis de 0 (Control), 6 y 12 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa.....	69
14	Concentraciones de insulina sérica postprandial.....	74

15	Efectos de las dosis de 0, 18 y 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles sobre la concentración de glucosa postprandial en ratones de la cepa C57BL/6N.. .....	76
16	Efecto de las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa sobre la concentración máxima de glucosa postprandial ( $C_{max}$ ).. .....	78
17	$T_{max}$ para alcanzar la $C_{max}$ de glucosa postprandial en ratones expuestos a las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. ....	79
18	Metabolitos identificados en plasma de ratones alimentados con dieta alta en grasa y tratados con 0, 18 y 24 mg de EFRP....	85
19	Metabolitos cuantificados en plasma de ratones alimentados con dieta alta en grasa y tratados con 0, 18 y 24 mg de EFRP...	87

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Alimentos con mayor contenido de antocianinas .....	9
2	Estimación de la ingesta de polifenoles en diferentes regiones o países.....	11
3	Efecto de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos en la resistencia a la insulina y diabetes.....	31
4	Estudios en modelos animales de los efectos de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos sobre la respuesta glucémica ....	34
5	Antocianinas presentes en el extracto de fresa.....	41
6	Análisis proximal del extracto de fresa rico en polifenoles.....	49
7	Consumo diario de alimento y energía en ratones de la cepa C57BL/6N durante el protocolo de once semanas con dietas especiales .....	61
8	Glucosa en ayuno de los ratones de los estudios 1 y 2, después de once semanas con dietas especiales .....	63
9	AUC de la glucosa postprandial en el estudio de 0, 6 y 12 mg de EFRP.....	71
10	iAUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 6 y 12 mg de EFRP.....	72
11	AUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 18 y 24 mg de EFRP.....	80
12	iAUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 18 y 24 mg de EFRP.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

A1C = Hemoglobina glucosilada

AG = Dieta alta en grasa

AKT = Proteína quinasa B

AUC = Área bajo la curva

BCRP = Proteína de resistencia al cáncer de mama

BG = Dieta baja en grasa

CETP = Proteína de transferencia de ésteres de colesterol plasmática

CFCA = Cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos

CG = Carga glucémica

cGMP = Guanosil monofosfato cíclico

cHDL = Colesterol HDL

cLDL = Colesterol LDL

C<sub>max</sub> = Concentración máxima

CRP = Proteína C reactiva

DMEs = Enzimas metabólicas de fármacos

DOF = Diario oficial de la federación

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

E.D.T.A. = Ácido etilendiaminotetraacético

EAG = Equivalentes de ácido gálico

EFRP = Extracto de fresa rico en polifenoles

ENSANUTMC = Encuesta nacional de salud y nutrición, medio camino

EQ = Equivalentes de quercetina

ESI + = Electronebulización positiva

ESI- = Electronebulización negativa

ET = Equivalente Trolox

FC = Folin-Ciocalteu

FDA = Food and Drug Administration

GLUT2 = Transportador de glucosa 2

GLUT4 = Transportador de glucosa 4

HR = Cociente de riesgo

IDF = International diabetes federation

IG = Índice glucémico

iGTT = Prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa

IL-6 = Interleucina 6

IP = intraperitoneal

IR = Receptor de insulina

ISR-1 = Sustrato del receptor de insulina – 1

JNK = Quinasa C Jun N terminal

LPH = Lactasa florizina hidrolaza

MCP-1 = Proteína quimiotáctica de monocitos-1

MRPs = Proteínas asociadas a múltiples fármacos

NF-κB = Factor nuclear Kapa B

OMS = Organización Mundial de la Salud

P – gp = P-glicoproteína

PIP3 = Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato

PPAR- $\gamma$  = Receptor activado por proliferador peroxisomales gamma

PTFE = Politetrafluoroetileno

PTOG = Prueba de tolerancia oral a la glucosa

RBP4 = Reducción de la proteína de unión al retinol-4

RR = Riesgo relativo

SGLT1 = Transportadores de glucosa acoplado a sodio

SGLT2 = Transportador de glucosa acoplado a sodio 2

sVCAM-1 = Molécula de adhesión celular vascular soluble-1

T<sub>max</sub> = Tiempo máximo

TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF-  $\alpha$  = Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

USDA = Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

WAT = Tejido adiposo blanco



## RESUMEN

**Introducción:** los polifenoles de los frutos rojos pueden reducir los niveles de glucosa en sangre al inhibir la digestión de carbohidratos, la absorción de glucosa y aumentar la sensibilidad y secreción de insulina. La fresa es una fuente de polifenoles, especialmente antocianinas, que pudieran desencadenar propiedades hipoglucémicas en estudios en modelos animales. **Objetivo:** evaluar el efecto sobre la glucemia postprandial de diferentes dosis de un extracto de fresa rico en polifenoles (EFRP) cuando se administra antes de una carga oral de glucosa en un modelo murino de obesidad inducida. **Métodos:** Un total de 108 ratones macho de la cepa C57BL/6N fueron utilizados en dos estudios *in vivo*, la distribución consistió en seis grupos por estudio. Tres grupos por estudio (n = 24 o 30), fueron alimentados con dieta alta en grasa (AG), y otros tres (n = 24 o 30) con dieta baja en grasa (BG) durante 11 semanas. Después del periodo de alimentación con las dietas especiales, los ratones fueron sometidos a seis horas de ayuno, seguido de prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Las muestras de sangre fueron obtenidas antes (0 min) y 15, 30, 60, 90, 120 min después de la administración del EFRP (estudio 1: 0, 6 y 12 mg y, estudio 2: 0, 18 y 24 mg) y la carga de glucosa (60 mg). El plasma obtenido, por punción cardiaca, después de los 120 min de la administración del EFRP se analizó por HPLC/MS-MS para identificar y cuantificar los metabolitos de polifenoles presentes. Los datos se presentan como medias  $\pm$  error estándar o medianas y rango intercuartil. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías con medidas repetidas. El área bajo la curva se calculó mediante la regla trapezoidal y se analizó mediante ANOVA de una vía sin medidas repetidas. **Resultados:** El aumento de peso fue mayor en los grupos AG en comparación con los grupos BG ( $P < 0.001$ ). La administración del EFRP antes de la carga de glucosa no mostró efectos significativos sobre el aumento de la concentración de glucosa en sangre en los grupos BG de ambos estudios tras la PTOG. No obstante, la administración de 18 y 24 mg de EFRP mostró una disminución significativa en la glucosa postprandial en el grupo AG, 30 min después de la administración de glucosa y hasta 120 min ( $P < 0.05$ ). Este resultado se reflejó

en una disminución en los iAUC de 0-60, 0-90 y 0-120 min ( $P < 0.05$ ). La concentración máxima de glucosa postprandial se redujo mediante el tratamiento de 18 mg y 24 mg en comparación con 0 mg en ratones del grupo AG ( $P < 0.05$ ). Se encontraron biodisponibles metabolitos fenólicos como el ácido p-cumárico, isorhamnetina-3-O-glucósido y ácido ferúlico. Este último aumentó de manera significativa con relación a la dosis de EFRP administrada ( $P < 0.05$ ) **Conclusión:** la administración de 18 y 24 mg de EFRP en ratones de los grupos AG, redujo la concentración máxima de glucosa posprandial y aumentó la concentración de metabolitos de polifenoles en plasma.

## INTRODUCCIÓN

Los polifenoles o compuestos polifenólicos son un grupo de sustancias bioactivas ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal, siendo las frutas, verduras, nueces, legumbres, cereales y bebidas derivadas de vegetales los mayores aportadores de polifenoles en la dieta (Zamora-Ros et al., 2018). Los polifenoles tienen en común la presencia de uno o más anillos fenólicos (anillo aromático) en su estructura principal, son producidos primordialmente como glucósidos o forma conjugada con uno o más residuos de azúcares unidos a grupos hidroxilos o directamente a los átomos de carbono del anillo aromático. Los polifenoles pueden también encontrarse libres, o sin azúcares adheridos a su estructura principal, y son denominados agliconas (Bravo, 1998). De acuerdo con su estructura química los polifenoles se dividen en cuatro clases principales: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Los flavonoides comparten una estructura general que consiste en dos anillos fenólicos unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>), nombrados anillos A, B y C, respectivamente (Manach et al., 2004). Los flavonoides se dividen en diferentes subclases en función del grado de hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación (Gonzalez et al., 2014) y son clasificados en 7 subclases: antocianinas, chalconas, flavononas, flavanoles, flavonoles, flavonas e isoflavonas (Rzepecka-Stojko et al., 2015). Hoy se sabe que los polifenoles poseen efectos protectores hacia el desarrollo de varias enfermedades crónicas y se ha demostrado que el consumo de polifenoles impacta en la reducción de la incidencia de algunos tipos de cáncer (Fink et al., 2007), enfermedad cardiovascular (Hooper et al., 2008, Cassidy et al., 2013), deterioro de la función cognitiva (Bastianetto et al., 2015) y diabetes tipo 2 (DT2) (Kim et al., 2016, Jennings et al., 2014, Zamora-Ros et al., 2013b). En particular, los flavonoides se han vinculado estrechamente con efectos beneficiosos en muchos estudios clínicos, *in vivo* e *in vitro* (Vauzour et al., 2010). Los flavonoides han demostrado tener efectos sobre la salud cardiovascular disminuyendo la formación de lesiones ateroscleróticas (Medina-Remon et al., 2017), inhibiendo la agregación plaquetaria (Krga et al., 2018), mejorando la función

endotelial y la presión arterial (Medina-Remon et al., 2015), y mejorando los niveles de glucosa en ayuno y/o postprandial (Castro-Acosta et al., 2016b, Castro-Acosta et al., 2017, Torronen et al., 2012). Dentro de las subclases de flavonoides, las antocianinas; malvidina, petunidina, delfinidina, peonidina, pelargonidina y cianidina y sus respectivas formas glucosiladas (McGhie and Walton, 2007), se han vinculado principalmente con propiedades hipoglucemiantes e hipoinsulinémicas (Belwal et al., 2017). Las antocianinas son compuestos solubles en agua y responsables de los colores brillantes y fuertes asociados con ciertas frutas y verduras como uvas, fresas, cerezas, berenjena y cebolla roja (Manach et al., 2004). Sin embargo, las frutas rojas son los principales aportadores de antocianinas en la dieta (De Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta), siendo la fresa uno de los principales frutos rojos consumidos con concentración elevada de polifenoles, principalmente antocianinas entre las que sobresale la pelargonidina-3-glucósido (Fredericks et al., 2013). Posee las características de ser más estables y tener una tasa de absorción *in vivo* más elevada que otros polifenoles de la fresa (Prior et al., 2009).

Actualmente existen estudios epidemiológicos que demuestran una asociación inversa entre un mayor consumo de alimentos con contenido elevado de polifenoles y el riesgo de desarrollar DT2 (Ding et al., 2015, Knekt et al., 2002, Grosso et al., 2017, Zamora-Ros et al., 2013b). Un metaanálisis llevado a cabo por Guo et al. (2016) concluyó que el consumo de frutos rojos disminuía el riesgo de desarrollar DT2 en un 18 %, mientras que las antocianinas promovían un decremento del 15 % de nuevos casos de DT2. Estudios clínicos han comprobado el efecto de los frutos rojos sobre la modulación de la respuesta glicémica, insulinemia y secreción de incretinas en humanos (Castro-Acosta et al., 2016b, Torronen et al., 2012). Estudios en modelos murinos (cepa C57BL/6), con obesidad inducida con dieta, demuestran los efectos moduladores de las antocianinas sobre las repuestas glucémicas e insulinémicas (Chuang et al., 2012, Farrell et al., 2015, Li et al., 2012, Prior et al., 2009, Tsuda et al., 2003, Wu et al., 2013, Wu et al., 2017). Por otro lado, estudios *in vitro* han evidenciado que las antocianinas pueden ejercer efectos en diferentes tejidos o moléculas involucrados en la homeostasis de la glucosa, se han demostrado efectos hipoglucemiantes e hipoinsulinémicos de las antocianinas al

actuar, en el intestino delgado, sobre la inhibición del transportador de glucosa acoplado a sodio (SGLT1) (Manzano & Williamson, 2010, Schulze et al., 2014) y de enzimas digestivas como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Akkarachiyasit et al., 2011). Otros efectos, que se han atribuido a las antocianinas son la estimulación de la secreción de insulina a través del 'efecto incretina' (Castro-Acosta et al., 2016a), la protección de las células  $\beta$  del páncreas (Hong et al., 2013, Lee et al., 2015) y, un efecto similar a la insulina (Scazzocchio et al., 2011).

Los estudios de los compuestos polifenólicos aportan evidencia científica para su utilización en la prevención y el tratamiento de enfermedades caracterizadas por concentraciones altas de glucosa e insulina en sangre (hiperglucemia e hiperinsulinemia, respectivamente) y los compuestos polifenólicos presentes en la fresa han mostrado efectos positivos prometedores en la prevención y tratamiento de la diabetes tipo 2.

## **ANTECEDENTES**

### **Polifenoles**

En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de compuestos naturales para los tratamientos de numerosas patologías asociadas con el estrés oxidativo, tales como la diabetes tipo 2. Los polifenoles o compuestos polifenólicos son un grupo de compuestos bioactivos, no nutricionales y no energéticas, con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y anticancerígenas encontrados en las plantas y productos de plantas (Li et al., 2014). Estos compuestos no sintetizados en animales ni en humanos, son encontrados principalmente en alimentos como el té, café, vino, frutas, verduras, cereales integrales, cacao y bebidas derivadas de vegetales en la dieta humana (Zamora-Ros et al., 2014). Estos compuestos son producidos en parte, como respuestas protectoras contra agentes bióticos y abióticos como patógenos y radiación ultravioleta, respectivamente. En alimentos se han identificado más de 500 polifenoles que difieren en sus anillos aromáticos, estado de oxidación y grupos funcionales (Tangney & Rasmussen, 2013). Cuatro clases de polifenoles comprenden la mayoría de los polifenoles en los alimentos: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos (McGhie and Walton, 2007, Tangney and Rasmussen, 2013, Zamora-Ros et al., 2018). Los polifenoles en los alimentos son encontrados comúnmente como complejos o conjugados con azúcares (glucósidos) y ácidos orgánicos. Flavonoides, lignanos y estilbenos a menudo son encontrados como complejos glucosados, mientras que los ácidos fenólicos se encuentran esterificados con otros polifenoles, o libres (agliconas), sin azúcares o polifenoles adheridos (Perez-Jimenez et al., 2010, Vitale et al., 2018).

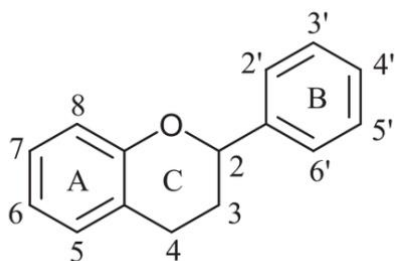
### **Antocianinas**

Los flavonoides dietarios representan una amplia diversidad de compuestos polifenólicos que ocurren naturalmente en los alimentos de origen vegetal. Su complejidad estructural ha obligado a subclasificarlos en siete grupos diferentes: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas, isoflavonas, y chalconas (Cassidy, 2018, Rzepecka-Stojko et al., 2015). La estructura química de los

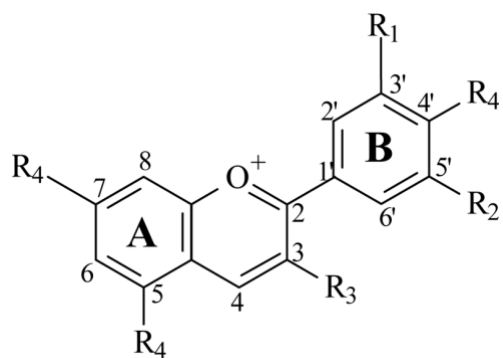
flavonoides se caracteriza por tener el sistema de anillo difenolpropan con un esqueleto benzo- $\gamma$ -pirona (**Figura 1**) (Rzepecka-Stojko et al., 2015), están presentes en cantidades significativas en muchos alimentos de origen vegetal comúnmente consumidos como frutas, verduras y bebidas.

Las antocianinas son responsables de los tonos rojo, púrpura y azul en las flores y frutas de las plantas (Cassidy, 2018, McGhie & Walton, 2007), poseen la característica de ser solubles en agua y a menudo son más consumidas que otros flavonoides. La función principal de las antocianinas no se limita a la coloración de los frutos, sus efectos antioxidantes se han relacionado con la supervivencia de las plantas, principalmente en ambientes de gran altitud con mayor alcance de luz ultravioleta (Belwal et al., 2017, Cassidy, 2018). Químicamente las antocianinas son moléculas glucosiladas, polihidroxiladas, polimetiladas basadas en el promotor 2-fenilbenzopirilio, constituido por dos anillos benzeno (A y B) y un anillo heterocíclico (C) (**Figura 2**) (McGhie & Walton, 2007). Las unidades de agliconas de antocianinas, comúnmente denominados antocianidinas, presentes en plantas y alimentos de origen vegetal como formas no glicosiladas son la pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (**Figura 3**) (Belwal et al., 2017). Las diferencias estructurales de las antocianinas se deben a las variaciones en el número y posicionamiento de grupos hidroxilos (-OH) y metilos (CH) y al tipo (glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, y xilosa) y posicionamiento de las moléculas de azúcares que se conjugan con la aglicona (McGhie & Walton, 2007).

Los frutos rojos (fresa, arándano, cereza, frambuesa, mora, etc.) son la principal fuente de antocianinas, sin embargo, muchos otros frutos como la uva, aceituna negra y cebolla roja también contienen niveles altos de antocianinas (Perez-Jimenez et al., 2010). Las antocianinas se encuentran predominantemente en el exocarpio (cáscara) de las frutas, con excepción de los frutos rojos, las cuales están presentes tanto en el exocarpio como en el endocarpio (pulpa) (Manach et al., 2004).

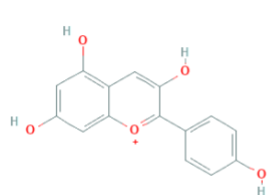


**Figura 1.** Estructura química general de los flavonoides.

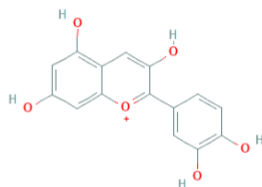


**Figura 2.** Estructura base de las antocianinas.

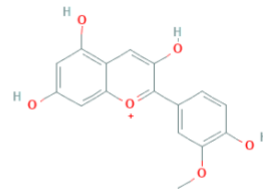




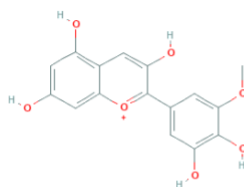
Pelargonidina



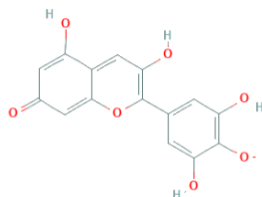
Cianidina



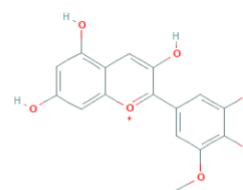
Peonidina



Petunidina



Delfinidina



Malvidina

**Figura 3.** Principales antocianidinas presentes en plantas y alimentos.  
Fuente: Perez-Jimenez et al. (2010).

Los frutos rojos son la principal fuente de antocianinas en la dieta humana, siendo los saucos, aronia, grosella negra y arándanos los mayores aportadores de antocianinas con un contenido estimado que varía de 160 - 1300 mg/100 g de peso fresco (**Tabla 1**). Aunque el contenido total de antocianinas en los alimentos oscila entre 0.7 a 1480 mg/100 g tanto en frutas como verduras, por lo que la ingesta dietaria de antocianinas se limita al consumo de una serie relativamente limitada de alimentos (Wu et al., 2006). Entre los alimentos con contenido elevado de antocianinas, la fresa es uno de los de mayor consumo, aportando principalmente la aglicona pelargonidina, la cual posee la característica de ser más estable y tener una tasa de absorción *in vivo*, más elevada que otros polifenoles de la fresa (Wu et al., 2004).

### **Ingesta dietaria**

En la actualidad se han demostrado los efectos benéficos de los polifenoles sobre la salud en humanos, sin embargo, los resultados han sido inconsistentes y dependientes de la cantidad consumida de alimentos, fuentes de polifenoles y su biodisponibilidad (Zamora-Ros et al., 2013c). Dado que los polifenoles en alimentos constan de más de 500 compuestos diferentes, su biodisponibilidad y propiedades biológicas varían en gran medida por su estructura química, por lo que resulta relevante tomar en consideración la heterogeneidad de la ingesta de polifenoles individuales cuando se investiga su asociación con efectos en la salud (Manach et al., 2004). La ingesta promedio de polifenoles sigue siendo un reto complicado, dado que en la actualidad la ingesta de polifenoles se evalúa a través de datos arrojados por cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA), diarios de alimentación y recordatorios de 24 horas, y dichos métodos pueden sobreestimar o subestimar la ingesta de polifenoles. El CFCA no es específico para alimentos individuales, sino que agrupa alimentos con contenido diferente de polifenoles, ej. frutas, verduras, cereales y tubérculos, productos de maíz y bebidas (Castro-Acosta et al., 2016a)

**Tabla 1.** Alimentos con mayor contenido de antocianinas.

<b>Alimento</b>	<b>Antocianina predominante</b>	<b>Antocianinas (mg/100 g PF<sub>1</sub>)</b>
Baya del saúco negra ( <i>Sambucus nigra</i> )	Cianidina 3-O-glucosido	1316.6
Aronia ( <i>Aronia prunifolia</i> )	Cianidina 3-O-galactósido	878.1
Grosella negra ( <i>Ribes nigrum</i> )	Delfinidina 3-O-rutinósido	592.2
Arándano Lowbush ( <i>Vaccinium stenophyllum</i> )	Malvidina 3-O-glucósido	187.2
Zarzamora ( <i>Rubus ulmifolius</i> )	Cianidina 3-O-glucósido	172.6
Cereza dulce ( <i>Prunus avium</i> )	Cianidina 3-O-rutinósido	171.4
Arándano ( <i>Vaccinium erythrocarpum</i> )	Delfinidina-3-O-galactósido	134.9
Aceituna negra ( <i>Olea europaea 'Koroneiki'</i> )	Cianidina 3-O-rutinósido	83.0
Uva negra aestivalis ( <i>Vitis aestivalis</i> )	Cianidina 3-O-glucósido	75.8
Fresa ( <i>Fragaria x ananassa</i> )	Pelargonidina-3-O-glucósido	73.0
Frambuesa roja ( <i>Rubus idaeus</i> )	Cianidina 3-O-soforósido	72.5

<sup>1</sup> Peso fresco; Fuente: Perez-Jimenez et al. (2010)

El diario de alimentos proporciona una representación más precisa de la ingesta, pero refleja estimaciones a corto plazo en lugar de patrones de consumo habitual, lo que conduce a errores en la estimación debidos la disponibilidad de frutos en ciertas temporadas, como los frutos rojos (Castro-Acosta et al., 2016a). Los resultados obtenidos a partir del CFCA son analizados con bases de datos que permiten estimar el consumo de flavonoides, como la del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) (Bhagwat et al., 2013); o el consumo de polifenoles totales (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos) como la Phenol-Explorer (Rothwell et al., 2013). La base de datos de la USDA expresa el contenido de flavonoides como equivalentes de agliconas, mientras que Phenol-Explorer expresa el contenido de polifenoles como agliconas, glucósidos o ésteres dependiendo de su presencia en la naturaleza (mg/100 g peso fresco), el contenido total de polifenoles se calcula como la sumatoria de los componentes individuales analizados por cromatografía sin hidrólisis y también incluye factores de retención para calcular cambios en el contenido debido a procesos culinarios (Rothwell et al., 2013). El uso de diferentes bases de datos para la estimación de la ingesta de polifenoles representa también una potencial fuente de error, y limita el análisis a los alimentos contenidos en ellas, dejando fuera a alimentos que podrían ser fuentes importantes de polifenoles, pero cuyo contenido no está aún caracterizado (Witkowska et al., 2015).

Hasta ahora, la ingesta total o por clases individuales (parcial) de polifenoles han sido estimadas en algunos estudios descriptivos (**Tabla 2**), demostrando una gran variabilidad en los resultados debido a las diferentes clases de polifenoles incluidas (estimación de ingesta parcial o total), bases de datos, metodologías aplicadas para la evaluación dietaria (Zamora-Ros et al., 2013b) y por las diferencias intrínsecas de la dieta en cada población. La estimación del consumo de polifenoles ha permitido identificar cuáles grupos de alimento proporcionan ciertas clases o subclases de polifenoles, por ejemplo, Chun et al. (2010), en su estudio en Estados Unidos, reportó que las frutas y jugos de frutas son fuentes importantes de flavonoles, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas, así como los vinos los cuales aportan flavonoles y antocianidinas principalmente. Ivey et al. (2017) realizaron un

**Tabla 2.** Estimación de la ingesta de polifenoles en diferentes regiones o países.

Referencia	País y población (n)	Método de evaluación dietaria	Base de datos de composición de alimentos	Ingesta de polifenoles totales (mg/d)	Ingesta de flavonoides (mg/d)	Principal subclase	Principal fuente de polifenoles totales
Zamora-Ros et al., 2013	MED <sup>1</sup> y No-MED <sup>2</sup> (35628)	Rec. 24 h	USDA <sup>3</sup> , Phenol-Explorer, UK food standard agency	NA <sup>4</sup>	MED: 370.2 no-MED: 373.7	Flavanonas	No-MED: té y frutas. MED: frutas, vino, verduras
Wisnuwardani et al., 2018	MED no-MED (2428)	Rec. 24 h	Phenol-Explorer	MED: 275 no-MED:457	MED: 202 no-MED: 329	Flavonoides	Frutas y chocolate
Chun et al., 2007	EUA (8809)	Rec. 24 h	USDA	NA	189.7	Flavanoles	Frutas, jugos, té
Zamora-Ros et al., 2013	España (40683)	CHDC <sup>5</sup>	USDA	NA	313.3	Proantocianidinas	Manzanas y vino tinto

<sup>1</sup> MED: Países del mediterráneo, Grecia, España, Italia y Francia; <sup>2</sup> No-MED: Países no pertenecientes al mediterráneo, Alemania, Países Bajos, Reino Unido, Dinamarca, Suecia y Noruega; <sup>3</sup>USDA: Departamento de agricultura de los Estados Unidos; <sup>4</sup>NA: No analizado; <sup>5</sup>CHDC: Cuestionario de historia dietética computarizada; <sup>6</sup>EPIC: Investigación prospectiva europea sobre cáncer y nutrición; <sup>7</sup>CFCA: Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos;.

**Tabla 3. Estimación de la ingesta de polifenoles en diferentes regiones o países (continuación).**

Referencia	País y población (n)	Método de evaluación dietaria	Base de datos de composición de alimentos	Ingesta de polifenoles totales (mg/d)	Ingesta de flavonoides (mg/d)	Principal subclase	Principal fuente de polifenoles totales
Vitale et al., 2016	Italia (2573)	Cuestionario o EPIC <sup>6</sup>	USDA, Phenol-Explorer	~683.3	~358.7	Flavonoides	Frutas
Cassidy et al., 2011	EUA (87242)	CFCA <sup>7</sup>	USDA	NA	358-413	Flavanoles	Té, manzanas y jugo de naranja
Zamora-Ros et al., 2018	México (106446)	CFCA	Phenol-Explorer	~643	~215	Ácidos fenólicos	Café y frutas
Miranda et al., 2016	Brasil (1103)	Rec. 24 h	Phenol-Explorer	377	NA	Ácidos fenólicos	Café y frutas tropicales
Jun et al., 2015	Corea del sur	Rec. 24 h	USDA	NA	317	Proantocianidinas	Manzanas y mandarinas

<sup>1</sup> MED: Países del mediterráneo, Grecia, España, Italia y Francia; <sup>2</sup> No-MED: Países no pertenecientes al mediterráneo, Alemania, Países Bajos, Reino Unido, Dinamarca, Suecia y Noruega; <sup>3</sup>USDA: Departamento de agricultura de los Estados Unidos; <sup>4</sup>NA: No analizado; <sup>5</sup>CHDC: Cuestionario de historia dietética computarizada; <sup>6</sup>EPIC: Investigación prospectiva europea sobre cáncer y nutrición; <sup>7</sup>CFCA: Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos;.

estudio analítico retrospectivos y reportaron un consumo promedio de flavonoides de 379 mg/día en la población estadounidense. Estos resultados concuerdan con estudios transversales realizados en España (~400 mg/día) y en Suecia (~350 mg/día). Varios estudios han reportado el consumo de polifenoles totales en países de la Unión Europea, Asia, Estados Unidos y Canadá y algunos países de Latinoamérica. Existe una gran variabilidad en los resultados entre países incluso del mismo continente y, como se mencionó anteriormente, uno de los motivos puede ser la diversidad en la dieta entre poblaciones. Se ha reportado que en promedio los habitantes de los países del Mediterráneo consumen alrededor de 805 mg/d, mientras que en otros países desarrollados como Polonia y Estados Unidos se ha estimado un consumo de 1172 mg/d y 801 mg/d, respectivamente. En la actualidad existen muy pocos estudios que reporten la ingesta de polifenoles en países de Latinoamérica (Galvan-Portillo et al., 2007, Hernandez-Ramirez et al., 2009, Nascimento-Souza et al., 2018, Rossi et al., 2018, Zamora-Ros et al., 2018). En una cohorte de mujeres mexicanas (Zamora-Ros et al. 2018) se reportó la ingesta de polifenoles totales y por clases. El consumo de polifenoles totales fue de alrededor de 700 mg/día, de los cuales 63.5 % provenían de ácidos fenólicos, se estimó la ingesta de 287 polifenoles individuales y al menos 42 de ellos fueron consumidos en  $\geq 1$  mg/día. Las principales fuentes de alimentos de polifenoles fueron el café (47.4 %) y frutas (~17 %). Más estudios acerca del consumo de polifenoles totales son necesarios para identificar los principales aportadores de polifenoles y para realizar posteriores asociaciones con los estados de salud y enfermedad. En México se deberá considerar establecer niveles óptimos de consumo de polifenoles a través de la dieta en función de sus efectos farmacodinámicos, por lo que la evaluación de la ingesta alimentaria y los comportamientos de los grupos de subpoblación también es clave para establecer políticas nacionales de alimentos y salud para mantener en las mejores condiciones tanto la salud y la productividad agrícola.

## **Absorción, distribución, metabolismo y excreción**

La biodisponibilidad de los polifenoles depende de la estructura química, interacciones con otras moléculas polifenólicas, proteínicas y enzimas del huésped y de factores como el sexo, edad, composición de la microbiota, así como de la concentración de polifenoles en la fuente alimentaria. Por su variedad estructural, es importante considerar que la heterogeneidad de los polifenoles puede aportar diferentes beneficios a la salud los cuales deben ser investigados de manera individual (Zamora-Ros et al., 2018). Por lo tanto, el entendimiento de su metabolismo (farmacocinética y farmacodinamia) resulta indispensable para implementar enfoques preventivos y terapéuticos para las condiciones anormales o de enfermedad dentro de las cuales pueden estar sujeto los individuos. En este punto, no solamente es importante conocer la cantidad del compuesto a partir del alimento administrado por vía oral, sino, cuánto de ello o ellos están presentes y son asimilados (McGhie y Walton, 2007). Los polifenoles poseen diferencias en su farmacocinética debido a sus variedades estructurales. Esto cobra relevancia dado que la farmacocinética es un factor crucial para la biodisponibilidad de polifenoles. Las propiedades fisicoquímicas, tal como pH, temperatura y textura de la matriz alimentaria influyen en la digestión de los compuestos polifenólicos (Fernandes et al., 2014). Generalmente, los polifenoles son absorbidos por los enterocitos en el intestino delgado, aunque la absorción y biodisponibilidad difiere en gran medida de un polifenol a otro (Wang et al., 2019). Los ácidos fenólicos y las isoflavonas son los polifenoles mejor absorbidos alcanzando tasas de absorción de hasta 60 y 40 %, respectivamente.

La absorción de antocianinas puede comenzar en el estómago y aparecer en sangre casi inmediatamente después de la ingestión del alimento fuente de antocianinas (Fernandes et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que la biodisponibilidad de las antocianinas no es tan baja como se creía (< 2 %) (Manach et al., 2004), utilizando isótopos estables para marcar las antocianinas e identificarlas a partir de muestras de sangre, orina, aliento y heces fecales, se logró una cuantificación más precisa que provocó un aumento en el resultado de tasas de absorción, demostrado



que la antocianina cianidina-3-glucósido se absorbía en un 12.4 % (Czank et al. (2013). Por otro lado, un estudio mostró que aproximadamente el 25 % de las dosis de antocianinas conjugadas con azúcares eran absorbidas en el estómago de ratones después de una administración *in situ* (Talavera et al., 2003). Posterior a la ingestión, las antocianinas son favorecidas por las condiciones ácidas del estómago, proporcionándoles estabilidad y permitiendo subsistir en su forma glucosilada. La presencia de antocianinas glucosiladas en circulación, dentro de pocos minutos después de la ingestión de un alimento rico en polifenoles, sugiere que, a diferencia de otros flavonoides, las antocianinas pueden absorberse en su forma intacta en el estómago (Krga & Milenkovic, 2019) . Hasta la fecha se han propuesto dos mecanismos que incluyen el transportador bilitranslocasa y un transportador saturable, GLUT1 (Fernandes et al., 2012). Sin embargo, la propuesta del mecanismo de transporte por GLUT1 está basado únicamente en estudios *in vitro* por lo que su relevancia en la absorción y metabolismo en humanos permanece incierta (Krga & Milenkovic, 2019).

El principal sitio de absorción de antocianinas se encuentra en el intestino delgado. Similar a otros flavonoides, las antocianinas son sometidas a deglicosilación por la enzima lactasa florizina hidrolaza (LPH), produciendo agliconas lipofílicas, característica que les permiten penetrar en los enterocitos por difusión pasiva (Manach et al., 2004). Sucesivamente, la absorción de las antocianinas en el intestino involucra los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT1) y los transportadores de glucosa GLUT2 (Lila et al., 2016). Algunas antocianinas, como la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-galactósido son resistentes a la digestión por la LPH y son transportados por los mecanismos recientemente mencionados. Dentro de los enterocitos, las antocianinas intactas son sometidas a hidrólisis por la enzima  $\beta$ -glucosidasa citosólica, lo que da lugar a la formación de sus metabolitos postabsortivos (de Ferrars et al., 2014). Las agliconas de las antocianinas interiorizadas en los enterocitos son sometidas a reacciones metabólicas para alcanzar la circulación portal. Estas reacciones metabólicas comprenden tanto de la fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) como de la fase II (conjugación) (Jia et al., 2004). En los enterocitos del intestino delgado las antocianinas están expuestas

a metilación, sulfuronidación y glucuronidación por las enzimas catecol-O-metiltransferasa, sulfotransferasa y uridina-5'-difosfo-glucuronosiltransferasa, respectivamente (McGhie & Walton, 2007). Los metabolitos de la fase II son transportados a circulación portal por la proteína de resistencia a múltiples fármacos 3 (MDR3) o transportadores GLUT2 expresados en la membrana basolateral (Williamson et al., 2000). Posteriormente, las reacciones de la fase II son llevadas a cabo nuevamente en hígado si es necesario. Los metabolitos de las antocianinas (sulfatados, metilados y glucoronidados) son dirigidos a órganos y tejidos dianas donde ejercen sus efectos o para ser eliminados en orina (Krga & Milenkovic, 2019). Los metabolitos de las antocianinas catalizados por enzimas metabólicas de fármacos (DMEs, por sus siglas en inglés) se pueden bombear hacia la luz intestinal o bilis por transportadores de flujo de salida, como las proteínas asociadas a múltiples fármacos (MRPs) (Zhang et al., 2015), la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) (Bircsak & Aleksunes, 2015) y la P-glucoproteína (P-gp), para participar en reciclaje enterohepático, entérico y local (Wang et al., 2019). Los resultados de estudios de biodisponibilidad de antocianinas en humanos demuestran que las antocianinas y sus metabolitos de fase II aparecen rápidamente en circulación. Estos logran alcanzar valores en plasma de hasta  $\geq 1$  milimolar, aunque habitualmente los valores varían de 1 a 592 nM dentro de 1.5 h y suelen desaparecer de circulación hasta 6 h posterior al consumo (Krga & Milenkovic, 2019). Czank et al. (2013) administraron 500 mg de cianidina-3-glucósido marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ , a 8 hombres, demostrando que algunos ácidos fenólicos presentaban  $^{13}\text{C}$  así como metabolitos de la fase II. A diferencia de las antocianinas, presentes en los alimentos, las cuales alcanzaron una concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ ) de 141 nM en 1.8 h y desaparecieron de circulación en 6 h; los metabolitos de antocianinas mostraron un perfil bifásico en suero, alcanzando picos de 0.2 a 2  $\mu\text{M}$  a las 10 h y fueron detectados como trazas hasta 48 h posterior a la ingestión (Czank et al., 2013). Por lo tanto, este estudio proporciona evidencia del extenso metabolismo que sufren las antocianinas y la dominancia de metabolitos de antocianinas producidos por la microbiota en circulación, los cuales podrían

contribuir en los efectos benéficos asociados con el consumo de fuentes ricas en antocianinas (Krga & Milenkovic, 2019).

Las antocianinas que sobreviven a la digestión intestinal y sobrepasan la absorción alcanzando las primeras porciones del colon pueden, de manera alternativa, someterse a degradación y ser convertidos en ácidos fenólicos y aldehídos dentro del lumen intestinal o en los colonocitos (Lila et al., 2016). La microbiota puede escindir el anillo C y modificar los restantes A y B (Tian et al., 2019). Algunos de los principales productos de la degradación son el ácido gálico, ácido propiocatecuico, ácido siríngico y ácido 4-hidroxibenzoico (Fleschhut et al., 2006). Los ácidos fenólicos producidos pueden ser absorbidos a partir del intestino a través de un mecanismo que involucra a los transportadores de ácidos monocarboxílicos. Las antocianinas que no son absorbidas son eliminadas por las heces.

#### Metabolismo de antocianinas por la microbiota intestinal

Debido a la pequeña cantidad de antocianinas dietarias absorbidas en el estómago o intestino delgado, grandes cantidades de compuestos ingeridos alcanzan el colon. Estudios *In vitro* han probado que el metabolismo de las bacterias involucra la escisión de enlaces glucosídicos, rompimiento del anillo heterocíclico de las antocianinas (anillo C), degradación en derivados de floroglucinol (anillo A) y ácidos benzoicos (anillo B) (Fernandes et al., 2014). Los principales metabolitos formados por la microbiota intestinal humana de las antocianinas; pelargonidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, delphinidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido, y malvidina-3-O-glucósido, son los ácidos fenólicos; 4-hidroxibenzoico, protocatecuico, gálico, vanílico, y siríngico, respectivamente (Fernandes et al., 2014). Además, las antocianinas que son transformados en ácido protocatecuico puede ser posteriormente metabolizado a ácido ferúlico y ácido hipúrico (Chistiakov et al., 2015). La formación de metabolitos de ácidos fenólicos a partir de las antocianinas es catabolizada por enzimas bacterianas o rompimientos espontáneos los cuales conducen a la formación de los monómeros fenólicos (Chen et al., 2017).

## Polifenoles y salud

La organización mundial de la salud (OMS, 2016) logró estimar que alrededor de 1.9 billones de adultos de 18 años o más padecían sobrepeso, de estos, 650 millones de adultos tenían obesidad. Se sabe que la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad se debe a un desbalance de energía entre las que se consume y las que se gasta. De manera global, se ha visto que un incremento en los alimentos densamente energéticos altos en grasa y azúcares, junto con descenso de la actividad física son las principales causas de desarrollo de sobrepeso y obesidad. Asimismo, se ha demostrado que cambios temprano en la calidad de la dieta y aumento de la actividad física son acciones que ayudan a mitigar la prevalencia de sobrepeso y obesidad, y sus comorbilidades, como enfermedades cardiovasculares y diabetes (OMS, 2020). Entre los cambios asociados a la dieta, el aumento de la ingesta de polifenoles ha demostrado que, por sí mismo, puede prevenir el sobrepeso y obesidad, existen estudios que demuestran una asociación inversa entre la ingesta de flavonoides totales y el exceso de índice de masa corporal ( $IMC \geq 25$ ) (Marranzano et al., 2018). Una estudio de cohorte, realizado en población italiana con diabetes (Vitale et al., 2016) reveló que los individuos con la enfermedad en curso tenían una ingesta menor de polifenoles ( $683.3 \pm 5.8$  mg/día) comparada con otro estudio (Zamora-Ros et al., 2016) aplicado en la misma población sin diabetes ( $\sim 1000$  mg/día). A través de diferentes estudios se ha demostrado que los polifenoles tienen efectos hipoglucemiantes e hipoinsulinémicos, actuando en el intestino delgado ya sea sobre la inhibición del transportador de glucosa acoplado a sodio, SGLT1 (Manzano & Williamson, 2010, Schulze et al., 2014) y/o la inhibición de enzimas digestivas como la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Akkarachiyasit et al., 2011, Correia-da-Silva et al., 2014). Otros efectos, no menos importantes, son la estimulación de la secreción de insulina a través del 'efecto incretina', y la protección de las células  $\beta$  por glucotoxicidad. (Hong et al., 2013, Lee et al., 2015).

## **Diabetes**

La diabetes es una enfermedad crónica grave que sobreviene cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no es capaz de utilizarla eficazmente (OMdl, 2018). La diabetes representa una enorme carga económica para los sistemas de salud del mundo y la economía mundial. La carga de la diabetes se puede medir en forma de gastos médicos directos, gastos indirectos por pérdida de trabajo o productividad y muertes prematuras. Se calcula que la diabetes genera gastos directos anuales a escala mundial por US\$ 827,000 millones (Seuring et al., 2015) y se pronostica que para 2030 las cifras ascenderán a US\$ 1.7 billones (IDF, 2017). En México, la diabetes causa más de 70,000 muertes y se desarrollan 400,000 mil nuevos casos al año. Al igual que otros países, México enfrenta problemas diversos que limitan la eficacia de los programas institucionales para la contención de la enfermedad entre los cuales destacan por su importancia, la insuficiencia en el abasto de medicamentos, limitaciones de los servicios de apoyo psicológico, nutricional, nula promoción de la actividad física, automonitoreo, y escasa supervisión de los servicios para alcanzar la adherencia terapéuticas (DOF, 2010). Para detener el aumento de la frecuencia de obesidad y diabetes tipo 2, es absolutamente necesario desarrollar; estrategias de prevención de alcance poblacional, normas y políticas para mejorar el acceso de alimentos y bebidas saludables y asequibles, así como promover la actividad física y reducir el tabaquismo (OMS, 2018).

### **Epidemiología**

De manera global, el número de personas que viven con diabetes cuadruplicaron el número entre 1980 y 2014 (Holman et al., 2015). Se calcula que 424.9 millones de adultos tenían diabetes en 2017, comparado con los 108 millones en 1980, indicando un ascenso en la prevalencia de diabetes en la población adulta del 4.7% al 8.8% (OMS, 2018). De acuerdo con un análisis reciente de los datos procedentes de siete países (Imamura et al., 2016), del 24% al 62% de las personas que padecen diabetes no han sido diagnosticadas ni tratadas. Se ha estimado que entre 2010 y 2030, el número de adultos con diabetes aumentará un 20% en países

desarrollados y un 69% en países en vías de desarrollo (Imamura et al., 2016). Alrededor del 79% de los individuos con diabetes viven en países de ingresos bajos y medios (IDF, 2017). Si estas tendencias continúan, para el año 2045, 629 millones de individuos de 20 a 79 años padecerán la enfermedad (IDF, 2017). Se estimó que en 2010 la diabetes causó 3.92 millones de muertes en adultos de 20 a 79 años, lo que se traduce en 6.8% de mortalidad global. Estas cifras aumentaron a 5.0 millones de muertes debidas a la diabetes y a sus complicaciones durante el año 2015, lo que es equivalente a una muerte cada 6 segundos (IDF, 2017). Los autores del Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study (2017) estimaron que un nivel elevado de glucosa en ayuno estuvo en la cuarta posición entre los factores de riesgo más predominantes en el desarrollo de incapacidad, alrededor de 143 millones de personas desarrollaron incapacidad en el año 2015, y con un aumento del 22 % del 2005 a ese año (Collaborators, 2017). En México el 9.4% de los adultos de 20 años o más, han recibido el diagnóstico de diabetes por parte de un médico (ENSANUTMC, 2016). Las cifras han ido en aumento con respecto a cifras publicadas en 2006 (7.2%) y en 2012 (9.2%) (ENSANUT, 2006 & 2012). En Sinaloa la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en personas mayores a 20 años fue del 8.2% en 2012 (ENSANUT, 2012) y en 2016, la región norte, donde se encuentra Sinaloa, la diabetes afectó al 8.7% de los individuos.

## **Diabetes tipo 2**

La diabetes puede ser clasificada en diabetes tipo 1, tipo 2, gestacional o por otras causas (American Diabetes, 2018). La diabetes tipo 2 (DT2) es la forma más frecuente, y representa aproximadamente el 90% del total de los casos con dicha afección (Shah et al., 2015). La hiperglucemia en la DT2 es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo de responder a dicha hormona (IDF, 2017). Los síntomas de la DT2 incluyen polidipsia, poliuria, polifagia, cansancio, lentitud en la curación de heridas, infecciones recurrentes y hormigueo o entumecimiento de manos y pies. Sin embargo, los síntomas suelen desarrollarse de manera lenta por lo que resulta complicado determinar el momento exacto de la aparición de la enfermedad (IDF, 2017). La DT2 puede desencadenar

complicaciones en el organismo y aumentar el riesgo de morir prematuramente. Algunas de las complicaciones más severas son el infarto al miocardio, los accidentes cerebrovasculares, la insuficiencia renal, y la amputación de miembros inferiores (OMS, 2018). La DT2 puede ser diagnosticada con base en los valores de glucosa plasmática, ya sea por glucosa plasmática en ayuno, glucosa plasmática postprandial, mediante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), que incluye la administración de 75 g de glucosa, o evaluando los valores de hemoglobina glucosilada (A1C). Las causas para desarrollar diabetes tipo 2 tienen, de manera general, una base genética, epigenética y de factores del estilo de vida, las cuales interactúan unas con otras y operan dentro del mismo ambiente fisiológico y sociocultural (Zheng et al., 2018). El exceso de grasa corporal, cuya medición refleja varios aspectos de la calidad en la alimentación y de la actividad física, es el factor que se asocia más estrechamente con el riesgo de desarrollar DT2. No solo existen pruebas contundentes al respecto, sino que el riesgo relativo correspondiente es el más alto (OMS, 2018). La edad avanzada, el origen étnico y los antecedentes familiares también son factores de riesgo importantes. Algunos factores de riesgo modificables son el exceso de adiposidad, malnutrición y dieta inadecuada, inactividad física, prediabetes o alteración de la tolerancia a la glucosa, tabaquismo y antecedentes de diabetes mellitus gestacional (IDF, 2017). Entre los factores dietarios, el consumo elevado de bebidas azucaradas se asocia cada vez más fuerte con la incidencia de DT2 (Malik et al., 2010). Otros factores, incluyen la ingesta inadecuada de frutas y verduras, cereales integrales y fibra dietética, así como la ingesta elevada de energía en forma de grasas saturadas (IDF, 2017).

### Patogénesis

Para comprender las alteraciones de las concentraciones de glucosa y lípidos en sangre en individuos con DT2 primero se debe puntualizar el estado homeostático de la glucosa. La hormona insulina es un polipéptido de 52 aminoácidos secretado por las células  $\beta$  del páncreas, con acciones indispensables para el control de los niveles de glucosa en sangre, facilitando la captación de glucosa en tejidos dependientes de insulina (Stumvoll et al., 2005). En el estado basal o postabsortivo (ayuno nocturno 10 - 12 h), aproximadamente el 50% de toda la glucosa se utiliza

para las funciones cerebrales, este estado es independiente de insulina y es saturado con concentraciones de glucosa plasmática de 40 mg/dL. Otro 25% de la glucosa disponible es utilizado por los órganos esplénicos como el hígado y tejidos gastrointestinales, los cuales son independientes de insulina. El restante 25% de glucosa es captado por los tejidos dependientes de insulina, principalmente el músculo y en menor medida el tejido adiposo.

En el estado posprandial (posterior a la ingesta), el incremento de la concentración de glucosa en plasma estimula la liberación de insulina, y la combinación de hiperinsulinemia e hiperglucemia, estimula la captación de glucosa por los órganos esplénicos (hígado e intestinos) y en la periferia por los músculos. La mayoría de la glucosa captada por los tejidos periféricos (~80% – 85%) se da en el tejido muscular, y pequeñas cantidades son metabolizados en los adipocitos (~4% – 5%) (DeFronzo 2004). La rápida y sostenida estimulación de las células  $\beta$  con glucosa, induce una secreción bifásica de la insulina. La estimulación por un incremento abrupto en la concentración de glucosa promueve una tasa de secreción inicial acelerada de insulina que disminuye lentamente (primera fase), y eventualmente incrementa de nuevo en una tasa de liberación lenta (segunda fase) (Henquin et al., 2002). La pérdida de la primera fase de secreción de insulina es una característica y anomalía temprana en pacientes destinados a desarrollar DT2. En la mayoría de los sujetos con DT2 se manifiesta la reducción de la primera fase de secreción de insulina durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) entre los 0 – 30 min (DeFronzo, 2004). La pérdida de la primera fase de la secreción de insulina tiene importantes consecuencias patogénicas debido a que la respuesta temprana de insulina prepara los tejidos diana, especialmente el hígado, responsables del mantenimiento de la homeostasis normal de la glucosa. Asimismo, la desregulación de la primera fase de la secreción de insulina promueve un estado de glucotoxicidad y lipotoxicidad en diferentes tejidos (DeFronzo 2004). Las condiciones de glucotoxicidad y lipotoxicidad pueden provocar alteraciones que conducen a la disminución en la secreción de insulina debido a un fallo en la función de las células  $\beta$  del páncreas, a medida que progresa la disfunción los individuos desarrollan intolerancia a la glucosa. La progresión de tolerancia normal a intolerancia a la



glucosa y, posteriormente, diabetes tipo 2 es evidenciado por los niveles de glucosa en ayuno que varían entre  $\leq 100$  y  $140$  mg/dL. El estado de hiperglucemia crónico en ayuno conduce a la disminución progresiva de la secreción de insulina en ayuno e inducida por glucosa (alimento con glucosa). Se ha demostrado que la exposición prolongada de las células  $\beta$  a concentraciones elevadas de glucosa también provoca defectos en la transcripción del gen de insulina, lo que conduce a la disminución de síntesis y secreción de insulina (DeFronzo2004).

### Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una condición que limita la acción de la insulina en los tejidos dependientes de insulina como el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Está fuertemente asociada con obesidad y un estilo de vida sedentario. La insulina se encarga de proporcionar glucosa al miocito (célula del tejido muscular), y al adipocito (célula del tejido adiposo) promoviendo que los niveles de glucosa en plasma disminuyan, mientras que en los hepatocitos (célula del hígado) suprime la síntesis endógena de glucosa (Shulman, 2000). El incremento de tamaño del tejido adiposo provocado por el almacenamiento descontrolado y constante de triglicéridos es un promotor de la ineficiencia de la insulina para suprimir la lipólisis. Esto resulta en la liberación descontrolada de ácidos grasos libres y glicerol, los cuales exacerban la resistencia a la insulina en el músculo esquelético e hígado (Boden, 1996). Asimismo, el aumento crónico de nutrientes en circulación, tal como glucosa y ácidos grasos libres, resulta en la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios. Esta teoría está soportada por varios hallazgos y evidencia clínica donde marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), e interleucina 6 (IL-6) están en concentraciones elevadas en individuos con obesidad y resistencia a la insulina (Dandona et al., 2004, Phosat et al., 2017, Kern et al., 2001). En el hígado, la inflamación crónica de bajo grado impide que la glucosa sea captada y la producción de glucosa por glucogenólisis no disminuye tras la acción de la insulina, por lo que coexisten condiciones de hiperglucemia con hiperinsulinemia (Ormazabal et al., 2018). Las células  $\beta$  desarrollan respuestas compensatorias durante la resistencia a la insulina incrementando la síntesis y liberación de insulina para restaurar la concentración de

glucosa en plasma a rangos normales. La disminución de la sensibilidad a la insulina provoca el agotamiento de las células  $\beta$ , y esto resulta en hiperglucemia persistente y DT2 (Shulman, 2000).

En general, los mecanismos moleculares que subyacen en la resistencia a la insulina y en el comienzo de alteraciones metabólicas asociadas, están vinculadas con un estado de inflamación subclínico de bajo grado, desencadenado por una secreción y función incrementada de citocinas proinflamatorias. Esta condición impide la señalización del receptor de insulina en tejidos como el muscular esquelético, hepático, intestinal y adiposo (Marette, 2002). El mecanismo celular que subyace a la respuesta a la insulina involucra a proteínas de membrana y proteínas intracelulares que en conjunto promueven reacciones en cascada. El receptor de insulina (IR, por sus siglas en inglés) está conformado por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , el primero de estos está posicionado en la membrana celular y el segundo compartimiento está localizado en la cara intracelular de la membrana, actuando como quinasa para residuos de tirosina. La interacción de la insulina con el IR provoca un cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$  permitiendo la activación de la tirosina quinasa, induciendo la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés) (Taniguchi et al., 2006). La interacción de las proteínas IRS fosforiladas con la unidad reguladora del PI3K (fosfo-inositol-3-quinasa) genera una segunda molécula mensajera, la fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3) la cual activa a la proteína quinasa B (AKT, por sus siglas en inglés). La AKT posee tres isoformas, de las cuales la AKT2 es la más involucrada en los procesos del metabolismo energético, la AKT2 fosforila la proteína TBC1D4 (AS160) conduciendo a la estimulación de GTPasas, lo que provoca una reorganización del citoesqueleto promoviendo la translocación del GLUT4, el principal transportador de glucosa en el músculo, a la membrana plasmática (Zhang & Liu, 2014). En resumen, el mecanismo celular activado por la insulina se puede dividir en 3 nodos importantes, IR/IRS, PI3K y AKT siendo los responsables de la transducción de señales para las distintas funciones metabólicas de la insulina, como lo son la captación de glucosa, promoción de la glucogénesis e inhibición de gluconeogénesis (Taniguchi et al., 2006).

Estudios en animales y humanos han identificado al tejido adiposo blanco (WAT) como el sitio principal donde inicia y exagera la inflamación crónica relacionada con la obesidad (Zatterale et al., 2019). La remodelación del WAT durante la obesidad proporciona señales que desencadenan la activación de respuestas inflamatorias a través de las vías del JNK y NF- $\kappa$ B (Blüher, 2009, Shoelson et al., 2006). La activación de estas vías de señalización incrementa la producción de citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión endotelial, y mediadores quimiotácticos que promueven la infiltración de monocitos al tejido adiposo (Shoelson et al., 2006). La infiltración de macrófagos produce y libera muchos mediadores inflamatorios que promueven los estados proinflamatorios locales y sistémicos y fallo en la señalización de la insulina (Haase et al., 2014). La vía de transducción de señales por JNK es reconocida por provocar resistencia a la insulina en modelos de obesidad, es activada por la exposición a estímulos inflamatorios como citocinas y nutrimentos como ácidos grasos libres. La actividad del JNK promueve la transcripción de genes inflamatorios e inhibe la vía de señalización de la insulina a través de la fosforilación inhibitoria de los residuos de serina-treonina del sustrato del receptor de insulina (IRS-1), por lo que disminuye la señalización de la PI3K y AKT (Gual et al., 2005). Asimismo, la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B asociado con la obesidad culmina con el incremento de la expresión de varios genes que involucran citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ , proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), e interleucina-1 $\beta$ , los cuales exageran la progresión de resistencia a la insulina.

### Tratamiento

La DT2 debe ser atendida por su progresividad a complicaciones micro y macrovasculares, el principal riesgo para el desarrollo de complicaciones es la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, así pues, los esfuerzos por disminuir los niveles de glucemia en sangre ha sido el principal punto de atención para retrasar el desarrollo de secuelas derivadas de la diabetes (OMS, 2016). A menudo la hiperglucemia es controlada a través de modificaciones en el estilo de vida (hábitos de consumo de alimentos y actividad física), promoción de pérdida de peso, y fármacos. En conjunto, la intervención es capaz de mejorar la intolerancia a la

glucosa, además de, reducir la progresión de complicaciones como enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico (Knowler et al., 2002, Tuomilehto et al., 2001). Entre los tratamientos farmacológico más utilizados se encuentran; acarbosa, gliflozinas, sulfonilureas, metformina, y tiazolidinedionas los cuales son hipoglucemiantes con diferentes mecanismos de acción, que actúan en distintos órganos promoviendo, ya sea, la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (ej. acarbosa), la inhibición del cotransportador sodio-glucosa SGLT2 (gliflozinas), la estimulación de secreción de insulina directa en el páncreas (sulfonilureas), la inhibición de la producción de glucosa en hígado (metformina), la supresión de la liberación de ácidos grasos no esterificados (tiazolidinedionas) (Stumvoll et al., 2005).

#### Modificaciones en el estilo de vida.

Existe una fuerte y consistente evidencia de que el manejo de la obesidad puede ser beneficioso en el tratamiento de la DT2 (Aune et al., 2015, Buchwald et al., 2009). En individuos con obesidad y DT2, la pérdida de peso, aun cuando es modesta pero sostenida, ha sido vinculada con la mejora en el control glicémico y con la reducción en la necesidad de medicamentos hipoglucemiantes (American Diabetes, 2018). La pérdida de peso se puede lograr con apego a programas de estilo de vida los cuales logran un déficit energético de 500 – 700 Kcal/día o proporcionan aproximadamente 1,200 – 1,500 Kcal/día en mujeres y 1,500 – 1,800 Kcal en hombres. Franz et al. (2015) elaboraron una revisión sistemática y metaanálisis donde concluyen que la pérdida de peso <5% no posee efecto sobre la hemoglobina glucosilada (A1C) y presión arterial en individuos con DT2. Sin embargo, los beneficios pueden ser percibidos a partir del 5% de pérdida de peso. Algunos estudios han demostrado que dietas muy bajas en calorías (<800 Kcal/día) pueden reducir las concentraciones de A1C a <6.5% y de glucosa en ayunas a <126 mg/dL (Franz et al., 2015). Debido a que los carbohidratos son los principales componentes dietarios que afectan la glucemia, algunos estudios han descrito los efectos involucrados con los carbohidratos de la dieta (Gannon et al., 1998, Lin et al., 2012, Wolever et al., 1994). Tanto la cantidad como los tipos de carbohidratos tienen un efecto sobre la glucemia e insulinemia postprandial, por lo que para preveer el efecto de los alimentos en la glucosa postprandial se utilizan indicadores

como el índice glucémico (IG) y la carga glucémica (CG), que toman en cuenta la calidad y cantidad de los carbohidratos presentes en los alimentos (Jenkins et al., 1981, Salmerón et al., 1997). Se han asociado las dietas con bajo IG con menor riesgo de desarrollar diabetes, un estudio mostró que las mujeres en el quintil más alto de carga glucémica tenían un riesgo 40 % mayor de desarrollar DT2 en comparación con las mujeres en el quintil más bajo (Willett et al., 2002). Asimismo, un metaanálisis concluyó que los individuos con dietas altas en IG o CG, independientemente, incrementan el riesgo de desarrollo de DT2 (IG RR = 1.4, CG RR = 1.27) (Barclay et al., 2008). Los datos de los estudios observacionales sugieren el reemplazo de dietas con alimentos de alto IG por alimentos con bajo IG para reducir el riesgo de alteraciones metabólicas y DT2 (Blaak et al., 2012). También se ha demostrado que el riesgo de desarrollo de diabetes se asocia, de manera inversa, al consumo de fibra, granos enteros y vegetales de hoja verde (de Munter et al., 2007). La fibra soluble reduce la respuesta de glucosa postprandial y la fibra insoluble de los cereales se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina en individuos con sobrepeso y obesidad (Weickert et al., 2006). En un estudio el consumo de granos enteros durante un día disminuyó la glucemia postprandial, aunque no provocó cambios en los picos de glucosa, si disminuyó el área bajo la curva (AUC) de los individuos tratados. Los mecanismos aparentemente involucrados en la disminución de la glucosa postprandial se deben a un incremento temprano en la secreción de insulina y GIP (Weickert et al., 2005). Así, el consumo de fibra parece estar asociado con la disminución en la glucosa postprandial y este efecto debe ser, al menos, parcialmente responsable de la reducción del riesgo de desarrollar diabetes en los individuos que consumen granos enteros (Blaak et al., 2012).

## **Antocianinas de frutos rojos y diabetes tipo 2**

La diabetes definida como una anormalidad en la glucosa postprandial y en ayuno es frecuentemente asociada a varios factores de riesgos, entre los cuales se destacan el sobrepeso, historia familiar, dieta inadecuada, inactividad física, edad avanzada, hipertensión, etnia, intolerancia a la glucosa, diabetes gestacional y

malnutrición durante el embarazo (IDF, 2020). La piedra angular del tratamiento de la diabetes es la promoción de un estilo de vida que incluya una dieta sana, actividad física regular, no fumar y el mantenimiento de un peso corporal saludable. No obstante, si los intentos de modificar el estilo de vida para controlar los niveles de glucosa en la sangre fallan, se suele comenzar la administración oral de medicamentos hipoglucémicos. Aunque, existen compuestos naturales en los alimentos que pueden ejercer efectos similares a los hipoglucemiantes, tales como las antocianinas. Se ha demostrado que las antocianinas tienden a disminuir la resistencia a la insulina e incrementar la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la ganancia de peso corporal y la acumulación de lípidos (Belwal et al., 2017). Las antocianinas tienen capacidades inhibitorias sobre las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, sin embargo, los mecanismos más relevantes incluyen, el incremento de la translocación del transportador GLUT-4, activación del AMPK y enzimas lipolíticas, disminución de la fosforilación de la serina del IRS-1 (sustrato del receptor de insulina-1), aumento de la actividad de PPAR- $\gamma$ , disminución de la concentración de hs-CRP (proteína C reactiva de alta sensibilidad), reducción de la proteína de unión al retinol-4 (RBP4), así como en la inhibición de la síntesis de enzimas involucradas en la formación de ácidos grasos y triglicéridos. Todos estos juegan un rol efectivo en el incremento de la sensibilidad de la insulina y en la reversa de las condiciones de obesidad y diabetes (Belwal et al., 2017). Estudios epidemiológicos (Mursu et al., 2014), *in vitro* (Akkarachiyasit et al., 2011, Correia-da-Silva et al., 2014, Hong et al., 2013, Lee et al., 2015, Manzano & Williamson, 2010, Schulze et al., 2014, Xu et al., 2018) e *in vivo* (Jayaprakasam et al., 2006, Guo et al., 2016, Prior et al., 2009, Roopchand et al., 2013) han dirigido su atención al consumo de frutos rojos y sus efectos en la regulación del metabolismo de la glucosa, principalmente, por sus hallazgos como alimentos con características hipoglucemiantes.

### **Estudios epidemiológicos**

Estudios observacionales prospectivos y transversales han demostrado que el consumo de alimentos ricos en antocianinas, especialmente el consumo de frutos rojos (fresas, moras, arándanos, frambuesas, etc.) se asocia con un riesgo menor

de desarrollar DT2, proporcionando evidencia sobre los efectos potencialmente benéficos que surge tras el aumento de la ingesta de frutos rojos (Guo et al., 2016, Mendonca et al., 2019, Muraki et al., 2013, Mursu et al., 2014, Vitale et al., 2017, Zamora-Ros et al., 2013a). En una cohorte finlandesa (Mursu et al., 2014) se observó que el consumo de 60 g o más de frutos rojos por día comparado con <1.3 g, provocó un efecto protector contra el desarrollo de DT2 (HR: 0.65; 95% IC: 0.49 – 0.88), reduciendo el riesgo de incidencia. Notablemente, en este estudio no se mostraron asociaciones significativas entre las frutas, jugos de frutas o frutos rojos, o verduras y la disminución de la incidencia en DT2. Mientras que en población estadounidense el consumo de  $\geq 2$  porciones de mora azul por semana, comparado con <1 porción, fue asociado con un riesgo menor de desarrollar DT2 (HR: 0.77; 95% IC: 0.68 - 0.87) (Muraki et al., 2013, Wedick et al., 2012). En el análisis secundario de antocianinas individuales en la población estadounidense la asociación más fuerte se observó con la cianidina (HR: 0.79; 95% IC: 0.72 – 0.85), mientras que las asociaciones más débiles fueron para la delfinidina (HR: 0.87; 95% IC: 0.80 - 0.96), peonidina (HR: 0.87; 95% IC: 0.78 - 0.96), y petunidina (HR: 0.88; 95% IC: 0.81 - 0.97). La pelargonidina no mostró asociaciones significativas con el riesgo de diabetes (Wedick et al., 2012). A diferencia de lo mencionado anteriormente, en otro estudio no encontraron asociaciones significativas entre la ingesta de antocianinas y el riesgo de desarrollar DT2 (HR: 0.98; 95% IC: 0.88 – 1.09) (Jacques et al., 2013). Debido a la inconsistencia en los resultados de los estudios. Guo et al. (2016) realizaron una revisión sistemática y metaanálisis para analizar las asociaciones entre la ingesta de frutos rojos o antocianinas dietarias con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. El efecto resultante de la combinación entre los estudios evaluados (n=5) fue que la ingesta de antocianinas disminuye 15% el riesgo de desarrollar DT2 (RR=0.85; 95% IC: 0.80 – 0.91). A su vez el consumo de frutos rojos también disminuyó 18% el riesgo de desarrollar DT2 (RR = 0.82; 95% IC: 0.76 – 0.89). Los hallazgos inconsistentes entre los estudios podrían deberse a limitaciones y errores inherentes a la metodología de la ingesta dietaria. Sin embargo, existen suficientes datos epidemiológicos que apoyan la relación de

los efectos potencialmente beneficiosos de las antocianinas y los frutos rojos, y la disminución del riesgo de desarrollar DT2 en adultos (Castro-Acosta et al., 2016a).

### **Estudios clínicos**

Los potenciales antidiabéticos de los alimentos ricos en antocianinas han sido documentados en el sentido de sus propiedades antiinflamatorias, hipolipidémicas, hipoglucemiantes e hipoinsulinémicos (**Tabla 3**). Un estudio controlado aleatorizado, cruzado, doble ciego con 26 voluntarios sanos, fue llevado a cabo para examinar los efectos del consumo de néctar de grosella negra y arándano rojo . Los resultados demuestran que los individuos tratados con 17.5 g de frutos rojos en 300 mL tuvieron efectos significativamente favorecedores al reducir los niveles de glucosa en sangre posterior a una prueba de tolerancia oral a la glucosa, y los niveles de insulina sérica postprandial comparado con el placebo (Torrönen et al., 2017). Recientemente, se mostró que el consumo de una bebida que contenía 600 mg de extracto de grosella negra rico en antocianinas, junto con un alimento rico en carbohidratos provocó una reducción significativa en las concentraciones plasmáticas postprandiales de glucosa, insulina y incretinas GIP y GLP-1 comparado con el grupo control (Castro-Acosta et al., 2016b). Además, el consumo de 80 mg de delfinidina 3-glucósido y cianidina 3- glucósido en cápsulas fueron suficientes para disminuir significativamente los niveles de cLDL en plasma, así como un incremento de cHDL, comparado con el grupo control que no recibió delfinidina 3-glucósido y cianidina 3- glucósido (Zhu et al., 2013). Estos resultados son similares a los reportados por Basu et al. (2009) y Moazen et al. (2013), ellos demostraron que fresas liofilizadas mejoraron el perfil lipídico, así como el metabolismo de la glucosa y disminución de biomarcadores de la inflamación (proteína C reactiva [CRP]). Debido a que los estudios clínicos mencionados anteriormente tienen la posibilidad de que los hallazgos reflejen la actividad de otros componentes dietarios presentes en los alimentos ricos en antocianinas, se necesitan ensayos aleatorios que ayuden a establecer los efectos atribuibles a las antocianinas.



**Tabla 4.** Efecto de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos en la resistencia a la insulina y diabetes.

<b>Participantes (número)</b>	<b>Diseño del estudio</b>	<b>Periodo de intervención</b>	<b>Forma de administración y dosis de ACN<sub>1</sub></b>	<b>Principales resultados</b>	<b>Referencias</b>
Individuos con síndrome metabólico (n=27)	ECA-DC <sub>2</sub>	6 semanas	5 g de pulpa de acai liofilizada.	Redujo la expresión de mediadores proinflamatorios IL-6, TLR <sub>4</sub> , IL-6, TNF- $\alpha$ y MCP-1 <sub>4</sub> .	Santamarina et al., 2019
Individuos con síndrome metabólico (n=138)	ECA-DC	26 semanas	Solución por vía oral con 26 g de arándanos	Mejóro la función endotelial y aumentó la concentración de cHDL.	Curtis et al., 2018
Individuos con obesidad y diabetes tipo 2 (n=25)	ECA, cruzado.	Dosis única	Comida rápida alta en grasa, con 40 g de arándano (35 mg ACN)	Disminución de la concentración de glucosa postprandial.	Schell et al., 2017
Individuos con síndrome metabólico (n=27)	ECA-C <sub>5</sub>	8 semanas	Solución por vía oral, 2 tazas de bebida de fresa (154 mg ACN/día)	Disminución de 6 y 4% sobre la presión arterial sistólica y diastólica, respectivamente.	Basu et al., 2010
Hombres y mujeres adultos sanos (n=23)	ECA-DC, cruzado	Dosis única	Solución por vía oral 150, 300 o 600 mg ACN de grosella negra.	Disminución de glucosa e insulina sérica postprandial.	Castro-Acosta et al., 2016
Mujeres adultas sanas (n=20)	ECA-C, cruzado	Dosis única	Solución por vía oral 150 g de grosella negra y arándanos (~300 y 100 mg ACN, respectivamente)	Disminución de la concentración de glucosa e insulina postprandial.	Törrönen et al., 2012

<sup>1</sup>ACN: antocianinas; <sup>2</sup>ECA-DC: Estudio clínico aleatorizado, doble ciego; <sup>3</sup>TLR<sub>4</sub>: Receptor tipo Toll; <sup>4</sup>MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1, <sup>5</sup>ECA-C: Estudio clínico aleatorizado, controlado.

Los esfuerzos recientes se han dirigido a elucidar el impacto del consumo de antocianinas purificadas en el desarrollo y la progresión de obesidad y DT2 (Guo et al., 2016). Un ensayo doble ciego controlado con placebo, en 58 individuos con DT2, examinó los efectos del consumo de antocianinas durante 24 semanas. Esta intervención resultó en una disminución significativa de las concentraciones séricas de glucosa en ayuno, colesterol LDL, triglicéridos, IL-6, disminución de la resistencia a la insulina, e incremento de colesterol HDL (Zhanget al., 2015). Resultados similares fueron reportados por Zhu et al. (2013), al administrar 80 mg de antocianinas, sosteniendo la evidencia de que antocianinas purificadas disminuyen biomarcadores de la inflamación: CRP, molécula de adhesión celular vascular soluble-1 (sVCAM-1) e IL-1 $\beta$  en plasma. Estos resultados prometedores justifican ensayos clínicos a largo plazo que evalúen los efectos del consumo de frutos rojos en personas sanas y con DT2.

### **Estudios en modelos animales**

Un amplio número de modelos animales con inducción experimental, nutricional, o génica de enfermedad han sido probados como excelentes herramientas para el estudio de mecanismos moleculares de resistencia a la insulina y varias formas de diabetes, así como sus comorbilidades (Srinivasan & Ramarao, 2007). Un ejemplo bien establecido es el modelo de ratón inducido con dieta alta en grasa, el cual se caracteriza por ganancia rápida de peso debido al incremento de la ingesta dietaria en combinación con eficiencia reducida del metabolismo, lo que resulta en resistencia a la insulina (Surwit et al., 1988, Winzell & Ahren, 2004). En la actualidad existen estudios clínicos que evalúan el efecto de la exposición aguda, ya sea a frutos rojos o a antocianinas de frutos rojos en la prediabetes o diabetes y sus complicaciones (Castro-Acosta et al., 2016b, Schell et al., 2017, Torronen et al., 2012). La mayoría de los estudios son protocolos crónicos con exposición diaria durante numerosas semanas. Esta tendencia se sigue en estudios *in vivo* que utilizan modelos murinos, de obesidad inducida con dieta alta en grasa, y se administran frutos rojos o antocianinas de frutos rojos, de manera diaria durante varias semanas. Los estudios muestran que los frutos rojos o antocianinas de frutos

rojos, modulan la respuesta glucémica por diferentes mecanismos (Akkarachiyasit et al., 2011, Castro-Acosta et al., 2016b, Hong et al., 2013, Manzano & Williamson, 2010, Xu et al., 2018). Existen diversos estudios que han demostrado que los frutos rojos disminuyen los niveles de glucosa postprandial y en ayuno, aumentan la concentración plasmática de colesterol HDL (cHDL) y disminuyen los triglicéridos, mejoran la sensibilidad a la insulina, y aumentan las concentraciones de hormonas intestinales como GLP-1. Asimismo, en un estudio se demostró que las antocianinas de los frutos rojos, pero no el fruto completo, ejercen efectos moduladores sobre la glucemia en ayunas y reduce la ganancia de peso (Prior et al., 2008). En la **Tabla 4** se detallan algunos estudios en modelos murinos de obesidad inducida, con tratamientos de frutos rojos o antocianinas de frutos rojos, dosificados de manera crónica y aguda.

Un ensayo en ratones de la cepa C57BL/6 que seguían una dieta alta en grasa, o una dieta alta en grasa suplementada con 50 mg/kg de alimento de extracto de moras por 12 semanas, demostró disminuciones significativas en las concentraciones de glucosa (~ 400 vs ~470 mg/dL), cLDL (~25 vs ~40 mg/dL) y triglicéridos (~60 vs ~75 mg/dL) en el grupo suplementado con el extracto (Lee et al., 2019). Estos resultados sugieren que los frutos rojos y sus antocianinas regulan el metabolismo de la glucosa, promoviendo la disminución de las concentraciones de insulina en ayuno. En un modelo de ratón (C57BL/6J) con obesidad inducida con dieta alta en grasa, se demostró que 200 mg de extracto de uva por kilogramo de alimento poseía propiedades hipoglucemiantes al administrarlo previo a una prueba de tolerancia a la glucosa, notablemente el grupo que recibió el extracto de uva mejoró la tolerancia a la glucosa en los minutos 30 y 60 comparado con el grupo control que no recibió el extracto (Chuang et al., 2012). Choi et al. (2016) demostraron que el consumo de 5 g de extracto de moras por kilogramo de alimento, en ratones diabéticos C57BL/KsJ-db/db, disminuyó los niveles de glucosa postprandial.

**Tabla 5.** Estudios en modelos animales de los efectos de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos sobre la respuesta glucémica.

<b>Modelo animal</b>	<b>Extracto o ACN<sub>1</sub></b>	<b>Periodo de intervención</b>	<b>Forma de administración y dosis de ACN</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Referencias</b>
Ratones C57BL/6J	Arándano rojo	12 semanas	Tx <sub>2</sub> : Mezclado con el alimento alto en grasa, 5% arándano rojo. Control: Dieta alta en grasa sin extracto.	Disminución significativa de glucosa en ayuno, TAG <sub>3</sub> y citocinas proinflamatorias.	Madduma Hewage et al., 2020
Ratones C57BL/6J	Cereza	8 semanas	Tx: Vía oral; 200 mg/kg de peso. Control: Solución vehículo.	Disminución significativa en los niveles de glucosa e insulina sérica postprandial.	Anhe et al., 2014
Ratones C57BL/6J	Fresa	24 semanas	Tx: Mezclado con el alimento alto en grasa, 2.6 % de extracto. Control: Dieta alta en grasa sin extracto	Disminución de la glucosa en ayuno después de 22 semanas con el extracto de fresa suplementado.	Pareiman et al., 2012

<sup>1</sup>ACN: antocianinas; <sup>2</sup>Tx: tratamiento; <sup>3</sup>TAG: triacilglicéridos

**Tabla 4.** Estudios en modelos animales de los efectos de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos sobre la respuesta glicémica (continuación).

<b>Modelo animal</b>	<b>Extracto o ACN<sub>1</sub></b>	<b>Periodo de intervención</b>	<b>Forma de administración y dosis de ACN</b>	<b>Resultados principales</b>	<b>Referencias</b>
Ratones C57BL/6J	Cianidina-3-glucósido	5 semanas	Tx <sub>2</sub> : Mezclado con el alimento alto en grasa, 0.2% de cianidina 3-glucósido. Control: Dieta alta en grasa sin extracto.	Aumento en la sensibilidad a la insulina. Disminución significativa en los niveles de glucosa postprandial.	Guo et al., 2012
Ratones C57BL/6N	Arándano rojo	6 semanas	Tx: Mezclado con el alimento alto en grasa, 20% arándano rojo 80% dieta alta en grasa. Control: Dieta alta en grasa sin extracto.	Disminución significativa de glucosa en ayuno, TAG <sub>3</sub> colesterol, ganancia de peso corporal, y leptina.	Ryyti et al., 2020

<sup>1</sup>ACN: antocianinas; <sup>2</sup>Tx: tratamiento; <sup>3</sup>TAG: triacilglicéridos

El área bajo la curva (AUC 0 - 120 min) para la concentración de glucosa postprandial en sangre en el grupo suplementado con el extracto fue significativamente menor que el grupo control db/db ( $1025.77 \pm 20.48$ , y  $1193.87 \pm 29.32$  mg/dL·h, respectivamente). No obstante, los extractos utilizados en los estudios mencionados no son purificados de antocianinas por lo que efectos sinérgicos con otros polifenoles o componentes del extracto, pudieran ser responsables de las propiedades hipoglucemiantes. Por su parte, Guo et al. (2012) demostraron el efecto hipoglucemiante de la antocianina; cianidina-3-glucósido en un modelo de ratones con diabetes (db/db). El grupo de ratones que recibió la cianidina-3-glucósido (2 g/kg de alimento alto en grasa) mostró niveles de glucosa postprandial significativamente menores, a los 60 minutos de la prueba, que el grupo control que recibió únicamente el vehículo. De esta manera se demuestra el efecto de las antocianinas sobre la modulación de la respuesta glucémica postprandial.

Estudios *in vivo* (Jaroslawska et al., 2011, Parelman et al., 2012, Roy et al., 2008) han demostrado los efectos que tienen los polifenoles de fresas en la protección hacia enfermedades caracterizadas por resistencia a la insulina, estrés oxidativo y mutagénicas. Sin embargo, existen otros estudios que no han demostrado tales efectos. Prior et al. (2009) probaron un extracto de fresa (*Fragaria x ananassa*) en ratones de la cepa C57BL/6J con obesidad inducida a través de la dieta, aunque no encontraron resultados prometedores en la normalización de parámetros lipídicos con el uso del extracto completo de fresa (1 mg/ml de agua desionizada), los autores comparten que la utilización de las antocianinas purificadas a partir del extracto de fresa mostró efectos hipolipemiantes. Hasta la fecha todos los estudios dirigidos a la evaluación de posibles efectos hipoglucemiantes de los extractos de fresa en ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa han utilizado la vía intraperitoneal como sitio de administración de glucosa, por un bioensayo denominado prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (iGTT por sus siglas en inglés). Por lo que se debería destacar el descarte de cualquier actividad de los extractos de fresa y/o sus antocianinas sobre los componentes celulares como enzimas y transportadores alojados en el tracto gastrointestinal.

## JUSTIFICACIÓN

La alimentación de México se ha caracterizado por un alto consumo de alimentos densamente energéticos, siendo los carbohidratos los principales aportadores de energía. La obesidad originada por el consumo elevado en calorías se ha convertido en el mayor determinante para el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, condición estrechamente relacionada con enfermedades cardiometabólicas. Por lo que las modificaciones dietarias son el eje principal para la prevención de enfermedades crónicas. Hoy se conoce que los polifenoles de la dieta poseen efectos moduladores sobre el metabolismo de la glucosa al retrasar la absorción de glucosa, aumentar la secreción de insulina o aumentar la sensibilidad de esta. La pertinencia de realizar un trabajo de investigación acerca de los efectos potencialmente benéficos de los compuestos polifenólicos sobre el metabolismo de la glucosa en un modelo murino con obesidad, proporcionará evidencia necesaria para aportar conocimiento pre-clínico que sirva como antecedente para la realización de estudios clínicos en humanos y de esta manera coadyuvar en el tratamiento de las entidades patológicas caracterizadas por hiperglucemia e hiperinsulinemia. Lo anterior es debido a que en la actualidad preocupa el número de individuos con DT2 en Sinaloa y en México. Las estrategias para controlar la hiperglucemia postprandial crónica mediante la optimización de la funcionalidad de los alimentos fortalecerían los esfuerzos para reducir el riesgo de DT2. Los polifenoles de fresa podrían ayudar a retrasar la absorción de glucosa y, por lo tanto, controlar los niveles de glucosa después de una comida o bebida que contenga carbohidratos.

## **HIPÓTESIS**

El consumo agudo (dosis única) de un extracto de fresa rico en polifenoles, seguido de la administración oral de glucosa, disminuirá la concentración máxima de glucosa postprandial, en ratones alimentados con dieta alta en grasa, en relación con el grupo control que sólo recibirá la solución placebo.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto sobre la glucemia postprandial de diferentes dosis de un extracto de fresa rico en polifenoles cuando se administra antes de una carga oral de glucosa en un modelo murino de obesidad inducida.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar los cambios del peso corporal dentro del protocolo de 11 semanas con dietas especiales.
- Cuantificar los niveles de glucosa en sangre con una prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratones de la cepa C57BL/6N al ser expuestos a diferentes dosis del extracto de fresa rico en polifenoles.
- Evaluar las concentraciones de insulina en diferentes tiempos posteriores a la administración del extracto de fresa y una carga de glucosa.
- Identificar los metabolitos presentes en plasma después de dos horas de la administración del extracto de fresa rico en polifenoles.

## METODOLOGÍA

### Diseño experimental

Un total de 110 ratones macho de la cepa C57BL/6N, libre de patógenos de 4 semanas de edad, fueron comprados a BIOINVERT®. Estuvieron alojados en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía con ciclos de 12 h/12 h luz/oscuridad a una temperatura de  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Los ratones se criaron y alimentaron con dieta estándar (Rodent laboratory chow 5001, purina®) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía (CE-UACNyG-2018-MAY-01).

#### Extracto de fresa rico en polifenoles (EFRP)

El extracto de fresa Nerina strawberry® (*Fragaria x ananassa*, L.) rico en polifenoles fue donado por la compañía Berrypharma®, Iprona en forma liofilizada. El extracto es soluble en agua y según datos del proveedor, tiene un alto contenido de vitamina C, seis veces más antocianinas y 18 veces más polifenoles que una fresa cultivada típicamente. Las antocianinas identificadas en el extracto fueron; cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, pelargonidina-3-arabinósido y pelargonidina-3,6'-malonilglucósido, el fabricante estima una concentración total de antocianinas de 8.27 mg/g de extracto, de los cuales 6.99 mg (84.54%) son aportados por la pelargonidina-3-glucósido (**Tabla 5**). El contenido total estimado de polifenoles es de 36.84 mg EqAG por gramo de extracto, otros polifenoles presentes en el extracto de fresa son catequina, p-coumaroil hexosa, ácido p-cumárico, cinamoil glucosa, isorhamnetina-3-O-glucosido y quercetina-3-O-malonilglucosido. Cuatro dosis del EFRP; 6, 12, 18 y 24 mg fueron evaluados en dos estudios, los cuales aportaron 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 mg de antocianinas, respectivamente. En el primer ensayo, las dosis de 6 y 12 mg del EFRP se diluyeron en 300  $\mu\text{L}$  de agua natural estéril, mientras que, en el segundo ensayo, las dosis de 18 y 24 mg se diluyeron en 600  $\mu\text{L}$  de agua.

**Tabla 6.** Antocianinas presentes en el extracto de fresa.

<b>Antocianinas*</b>	<b>mg/g</b>
Cianidina-3-glucósido	0.27
Pelargonidina-3-glucósido	6.99
Pelargonidina-3-rutinósido	0.31
Pelargonidina-3,6'-malonilglucósido	0.70

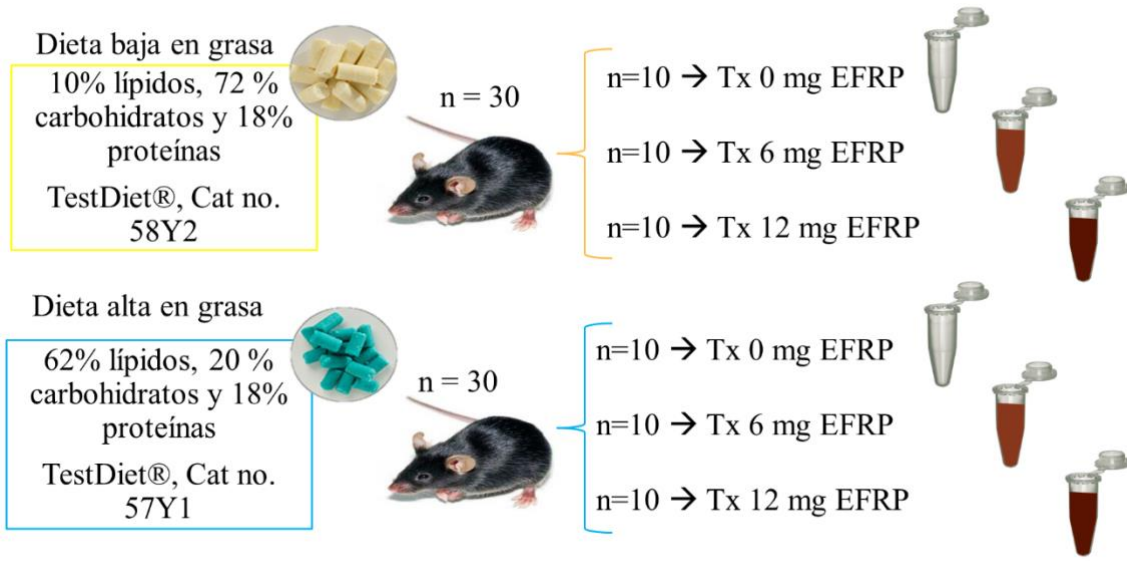
\*Método HPLC-UV, datos proporcionados por el proveedor. Fuente: Fredericks et al. (2013)

### **Estudio 1: 0, 6 y 12 mg de EFRP**

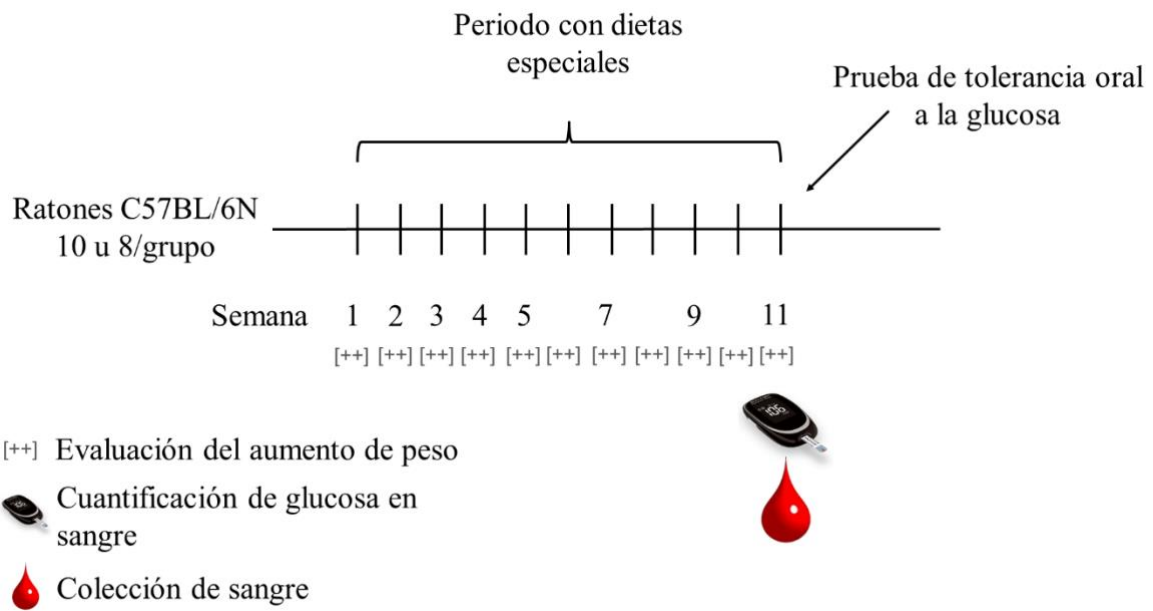
Sesenta ratones de la cepa C57BL/6N se sometieron a dos semanas de aclimatación con dieta estándar, posteriormente fueron aleatorizados para formar 6 grupos. Los grupos se organizaron de la siguiente manera: 3 grupos (n=10 por grupo) fueron alimentados con dieta baja en grasa (3.76 kcal/g; TestDiet®, Cat no. 58Y2), 10 % del valor calórico total aportado por lípidos (manteca de cerdo y aceite de soya), 72 % por carbohidratos (maltodextrina y sacarosa) y 18 % por proteínas (caseína); y 3 grupos con dieta alta en grasa (5.1 kcal/g; TestDiet®, Cat no. 57Y1), 60 % de calorías a partir de lípidos (manteca de cerdo y aceite de soya), 20.3 % a partir de carbohidratos (maltodextrina y sacarosa) y 18.1 % a partir de proteínas (caseína) (**Figura 4**). Las dietas especiales se administraron durante 11 semanas (**Figura 5**). Cada grupo de 10 ratones se distribuyó en dos jaulas (5 ratones por jaula), los 3 grupos con dieta baja en grasa se alojaron en 6 jaulas, el mismo método fue utilizado para los animales con dieta alta en grasa. Los ratones se pesaron semanalmente y el consumo de alimento se registró dos veces por semana. Después de las 11 semanas con las dietas especiales, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas, subsecuentemente se hizo un corte en la cola para la cuantificación de la concentración de glucosa en sangre, y coleccionar muestras para la determinación de insulina en suero, antes y después de la administración del EFRP. Los 6 grupos fueron expuestos a una de las 3 dosis del EFRP, 0, 6 o 12 mg disueltos en agua, después de 5 minutos, se administró la carga oral de glucosa y se realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Finalmente, los animales fueron eutanizados a través de una punción cardíaca (previa anestesia).

### **Estudio 2: 0, 18 y 24 mg de EFRP**

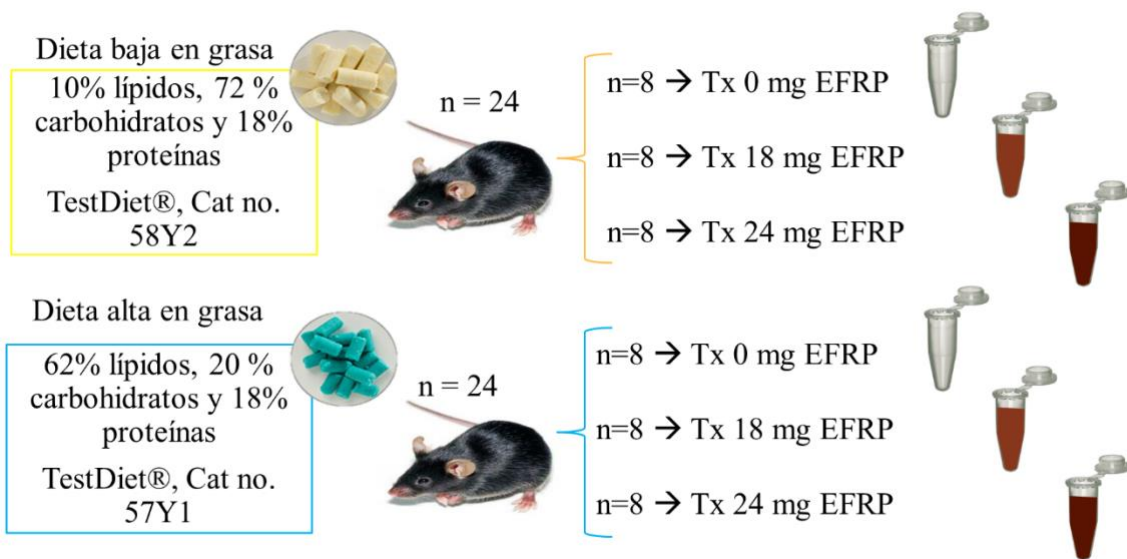
Cuarenta y ocho ratones de la cepa C57BL/6N estuvieron con dieta estándar durante 10 semanas. Los grupos se organizaron de la siguiente manera: 3 grupos (n=10 per-grupo) fueron alimentados con dieta baja en grasa, y 3 grupos con dieta alta en grasa durante 11 semanas (**Figura 6**).



**Figura 4.** Ratones de la cepa C57BL/6N expuestos a las dosis: 0, 6 o 12 mg del extracto de fresa rico en polifenoles.



**Figura 5.** Esquematización de las evaluaciones en el periodo con dietas especiales.



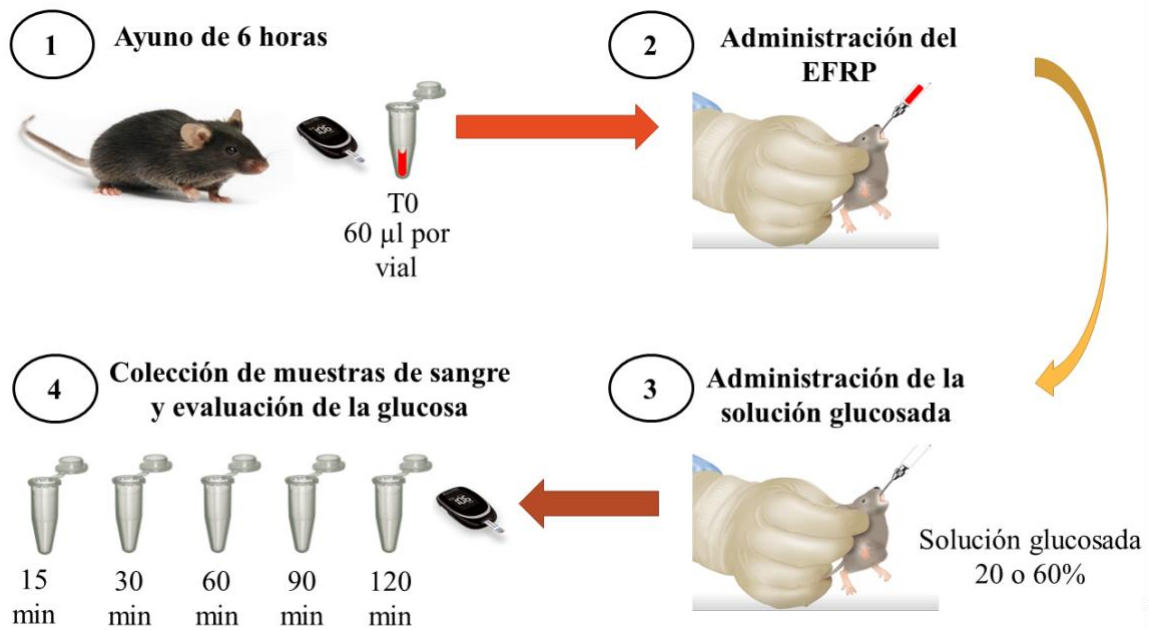
**Figura 6.** Ratones de la cepa C57BL/6N expuestos a las dosis 0, 18 o 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles.

Cada grupo de 10 ratones se distribuyó en dos jaulas (5 ratones por jaula), los 3 grupos con dieta baja en grasa se alojaron en 6 jaulas, el mismo método fue utilizado para los animales con dieta alta en grasa. Los ratones fueron pesados semanalmente y el consumo de alimento se registró dos veces por semana (**Figura 5**). Después de las 11 semanas con las dietas especiales, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas, subsecuentemente se hizo un corte en la cola para la cuantificación de la concentración de glucosa en sangre, y coleccionar muestras para la determinación de insulina en suero, antes y después de la administración del EFRP. Los 6 grupos fueron expuestos a una de las 3 dosis del EFRP, 0, 18 o 24 mg disueltos en agua, después de 5 minutos, se administró la carga oral de glucosa y se realizó la PTOG. Finalmente, los animales fueron eutanizados a través de una punción cardíaca (previa anestesia).

### **Prueba de tolerancia oral a la glucosa**

La prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) en los ratones de la cepa C57BL/6N consistió en la determinación de las concentraciones de glucosa antes, t 0 min, y después de la administración del EFRP y la carga de glucosa, t 15, t 30, t 60, t 90 y t 120 minutos (**Figura 7**). Primeramente, los ratones se pusieron en ayuno de 6 horas y posteriormente se tomó la primera muestra de sangre, después se administró la dosis correspondiente del EFRP (0, 6, 12, 18 o 24 mg) y la solución de glucosa. El EFRP fue administrado con la ayuda de una sonda orogástrica (Instech, 20ga x 30mm) 5 minutos previos a la administración de una carga oral de glucosa (dextrosa anhidra, Sigma Cat. No. 50-99-7) al 20% (60 mg en 300  $\mu$ L) o 60% (60 mg en 100  $\mu$ L) para el estudio 1 y 2, respectivamente. La solución con el EFRP fue preparada el mismo día del ensayo utilizando agua como disolvente con un volumen final de 300  $\mu$ L (estudio 1) o 600  $\mu$ L (estudio 2) de agua, respectivamente. Los valores de glucosa en sangre se obtuvieron al medir una gota de sangre, posterior a la disección de una porción de cola, con un glucómetro Accu-Check Performance® en cada uno de los puntos de tiempo mencionado anteriormente.





**Figura 7.** Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

## **Determinación de insulina**

Las muestras de sangre colectadas durante la PTOG, se sometieron a centrifugación (12,000 rpm 15 minutos, 4°C) en una microcentrifuga, el suero fue almacenado a -80 °C hasta su uso (Nagy & Einwallner, 2018). Las muestras de suero se utilizaron para la determinación cuantitativa de insulina con el método ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) tipo sándwich, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ALPCO, Cat. no. 80-INSMS-E01, E10). Brevemente, microplacas de 96 pozos fueron cubiertas con un anticuerpo específico para insulina. Posteriormente, 10 µL de los estándares, controles o muestras de suero fueron agregados a los pozos de la microplaca, luego se añadieron 75 µL de un conjugado de anticuerpo-enzima que detecta como antígeno a la insulina. Después, la microplaca se dejó en un periodo de incubación a temperatura ambiente y agitación (700 a 900 RPM) durante 2 horas. Posteriormente se realizaron 6 lavados con la solución de lavado ~300 µL por pozo y al final se agregó el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Subsecuentemente, la reacción se dejó correr durante 15 minutos y se detuvo con la ayuda de una solución stop. La densidad óptica para el lector de placas (Thermo Scientific. Cat. 51119000) fue de 450 nm.

## **Eutanización y punción cardiaca**

Los ratones fueron sacrificados por exanguinación a través de una punción cardiaca de acuerdo con la siguiente metodología. Primeramente, los ratones fueron pesados para determinar la cantidad del sedante a administrar, utilizando la fórmula: 30 - 90 mg del sedante/kg de peso (Gaertner et al., 2008). Posteriormente, se administró el sedante (pentobarbital sódico, pisabental) por vía intraperitoneal (IP) a los ratones y se dejaron en jaulas hasta que no mostraran signos de conciencia o dolor. Luego se realizó un corte en 'V' en el abdomen hasta llegar a las costillas y se extrajeron los intestinos con cuidado. Se realizó el corte del diafragma e inmediatamente se preparó la jeringa de 21 a 25 G con 5 mL de capacidad y se realizó la punción en el ventrículo izquierdo del corazón para llegar a la aurícula derecha haciendo un impulso de manera diagonal. Finalmente, se colectaron entre 500 y 1000 µL de sangre total y fueron

vertidos en viales preparados con EDTA. El hígado fue retirado cuidadosamente para mantener su morfología y evitar daños celulares, fueron colocados en papel encerado y cubiertos en papel aluminio. Todos los tejidos fueron almacenados a -80°C en un ultracongelador. El reactivo E.D.T.A. (Sigma, Cat No. E5134) (ácido etilendiaminotetraacético) sal disódica para uso anticoagulante se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración final del stock del reactivo E.D.T.A. sal disódica fue de 0.21 M (80 mg en un volumen final de 1 mL). Se tomaron 19 µL a partir del stock los cuales aportaban 1.5 mg del reactivo E.D.T.A. sal disódica y se agregaron a viales de 2 mL. El fabricante reporta que la concentración óptima para uso anticoagulante es de 1.5 mg por mL de sangre. La capacitación para aprender la técnica de punción cardiaca fue dirigida por el Dr. Humberto Astiazarán García en las instalaciones de la Universidad de Sonora.

## **Análisis del extracto de fresa rico en polifenoles**

### **Proximal**

La determinación de humedad, ceniza, grasa y proteína se realizó de acuerdo con los métodos oficiales de análisis descritos por la AOAC internacional (AOAC, 2019). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. y los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Los análisis proximales se realizaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. Campus Hermosillo, en colaboración con el M.C. Orlando Tortoledo Ortiz.

**Tabla 7.** Análisis proximal del extracto de fresa rico en polifenoles.

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Proteína	6.2
Humedad	12.0
Cenizas	3.7
Grasa	1.8
Carbohidratos*	76.3

\* Carbohidratos calculados por diferencia

## **Determinación de polifenoles totales y flavonoides**

El método Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) se utilizó para cuantificar el contenido total de polifenoles en el extracto de fresa. Los compuestos fenólicos se determinaron espectrofotométricamente a 750 nm utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, Cat No. F9252) y al ácido gálico (Sigma, Cat No. 5995-89-8) como estándar. Brevemente, las muestras del EFRP, estándares y blancos fueron preparados y estuvieron presentes como soluciones. Un gramo del EFRP fue suspendido en 20 mL de metanol al 60%, 1 mL de la muestra se diluyó en metanol al 60% en una relación 1:10 v/v. En una microplaca se agregaron 30  $\mu$ L de la solución diluida, se añadieron 150  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 120  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5 g/100 mL). La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos antes de su lectura en el espectrofómetro para microplacas (ThermoFisher Scientific, Varioskan LUX). Se utilizó como blanco una solución libre de compuestos fenólicos (metanol al 60%). La curva de calibración se preparó a partir de una solución con 10 mg de ácido gálico/10 mL de metanol al 60%, se prepararon las diluciones con metanol al 60% para obtener las concentraciones de: 0.000, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 y 0.250 mg de ácido gálico/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se reportan como miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra.

Los flavonoides se determinaron siguiendo la técnica de Siddhuraju & Beckcer (2003). A 250  $\mu$ L de extracto metanólico de EFRP diluido, se añadieron 75  $\mu$ L  $\text{NaNO}_2$  (5 g/100 mL), se dejó reposar 5 minutos y se agregaron 75  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  (10:100). Después de agitar, se dejó reposar por 1 min, se añadieron 500  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  1 M y 600  $\mu$ L de agua destilada. La mezcla se leyó en el espectrofómetro (ThermoFisher Scientific, Varioskan LUX) a 415 nm. La curva de calibración se preparó a partir de una solución con 10 mg de catequina/10 mL de metanol al 60%, se prepararon las diluciones con metanol al 60% para obtener las concentraciones de: 0.000, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 y 0.250 mg de catequina/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como miligramos equivalentes de quercetina (EQ)/g de muestra.

## **Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de fresa**

Preparación de la muestra. Se colocó 1 g de EFRP en 20 mL de metanol acuoso (60:40 v/v), se mezclaron y homogenizaron. Posteriormente, el homogenizado fue sometido a sonicación por 30 min y centrifugado a 3000 g, 4°C por 15 min. La extracción metanólica se repitió dos veces para asegurar la máxima extracción de los compuestos (Chitindingu et al., 2006). Los extractos se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para la determinación de la capacidad antioxidante del EFRP se usó el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox), el cual se basa en la reducción de la coloración verde/azul (disminución de la absorción espectrofotométrica) producida por la reacción del radical catión ABTS•+ (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]) con el antioxidante presente en la muestra (Re et al., 1999). Para generar el radical catión ABTS•+ se pesaron 19.2 mg de ABTS•+ (Sigma, Cat No. 30931-67-0) y se disolvieron en 5 mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron 88 µL de una solución de persulfato de potasio 2.45 mM, la solución se homogenizó y se incubó durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 750 nm. El extracto metanólico del EFRP fue diluido con metanol al 60% (1:50 v/v), en tubos de vidrio se mezclaron 20 µL de la muestra diluida de EFRP, con 2 mL del radical catión ABTS•+, se homogenizaron y se dejó reaccionar durante 7 min. Alícuotas de 250 µL fueron agregados en una microplaca de 96 pozos y se leyeron a 750 nm en un lector de placas (ThermoFisher Scientific, Varioskan LUX). La curva de calibración se preparó a partir de una solución con 10 mg de Trolox/10 mL de metanol al 60%, se prepararon las diluciones con metanol al 60% para obtener las concentraciones de: 0.000, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 y 0.250 mg de Trolox/ml. El diferencial de absorbancia se transformó a porcentaje de inhibición y se calculó la actividad antioxidante en mg equivalente Trolox (ET)/mL mediante una curva de calibración de Trolox (análogo soluble de la vitamina E) (Pellegrini et al., 2003).

Para la evaluación de la actividad antioxidante del EFRP también se empleó el método del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), el cual se reduce en presencia de

antioxidantes manifestándose un cambio de color en la solución (Brand-Williams et al., 1995). Para la preparación del radical DPPH•, se disolvieron 2.5 mg de DPPH• (Sigma, Cat No. 1898-66-4) en 73.5 mL de metanol y se ajustó el radical hasta obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 516 nm. Después de preparar y ajustar el radical DPPH•, fue mezclado con la muestra del EFRP. En una placa de 96 pozos, se añadieron 20  $\mu$ L del extracto metanólico del EFRP diluido con metanol al 60% 1:50 v/v y 280  $\mu$ L del radical DPPH•. La placa se incubó 30 min en oscuridad y temperatura ambiente, posteriormente se leyó en un lector de placas (ThermoFisher Scientific, Varioskan LUX) a 516 nm (Brand-Williams et al., 1995). La curva de calibración se preparó a partir de una solución con 10 mg de Trolox/10 mL de metanol al 60%, se prepararon las diluciones con metanol al 60% para obtener las concentraciones de: 0.000, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100 y 0.250 mg de Trolox/ml. Los cambios en la absorbancia al inicio y final de la reacción fueron transformados a porcentaje de inhibición. Los resultados fueron expresados como la concentración de los extractos en la cual se inhibe el 50 % del radical DPPH• (EC50).

## **Determinación de polifenoles en plasma**

### **Preparación de las muestras**

El método de extracción de polifenoles en plasma se desarrolló y adaptó de metodologías previamente publicadas (Banaszewski et al., 2013, Pilařová et al., 2018). Brevemente, 150  $\mu$ L de una solución de ácido gálico (1  $\mu$ g/mL) se añadieron a 500  $\mu$ L de plasma, seguido de 1000  $\mu$ L de una solución acetonitrilo 99.9%/ácido fórmico 0.1%, se mezcló y dejó en incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 17,000 g, 4°C, 10 min, se separó el sobrenadante y se filtró usando un filtro Millex-LG con poros de 0.2  $\mu$ m de diámetro (Millipore). Las muestras se evaporaron hasta sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno (N<sub>2</sub>), las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso. Inmediatamente previo a los análisis cromatográficos, las muestras se reconstituyeron en 700  $\mu$ L de metanol al 70% y se filtraron con membrana de nylon de 0.22  $\mu$ m. Del estudio 2 se obtuvieron un total de 24 muestras de plasma (8 muestras por tratamiento). De cada

muestra se colectaron 250  $\mu$ L que fueron mezclados con otros 250  $\mu$ L de otra muestra del mismo tratamiento, para al finalizar obtener 4 muestras de 500  $\mu$ L por cada tratamiento (0, 18 y 24 y mg de EFRP), y analizar en total 12 muestras del estudio 2. La elección para la combinación de las muestras se realizó de manera aleatoria utilizando el software Excel.

### **Análisis HPLC/DAD y obtención de fracciones de corrida**

El análisis HPLC se realizó en un equipo 1260 agilent equipado con detector de arreglo de diodos UV y una columna Kinetex C18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula), usando como solventes; agua 95%/ácido fórmico 5% (A) y metanol grado HPLC (B) con una tasa de flujo de 1 ml/min. La elución por gradiente fue: 2% a 32% B en 30 min, de 32% a 40% B hasta 40 min, y de 40% a 100% B hasta 55 min. El barrido de longitud de onda fue desde los 250 hasta los 505 nm. Cabe mencionar que este paso permitió la identificación cualitativa de polifenoles en plasma, al comparar los tiempos de retención y los espectros de absorción con la literatura disponible, mientras que la cuantificación de los metabolitos de polifenoles se realizó por LC-QTOF-MS (ver abajo). Este análisis se realizó en colaboración con Dra. Maribel Ovando Martínez, en el laboratorio de biotecnología de lípidos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

### **Análisis cualitativo ESI- QTOF-MS de polifenoles en plasma**

Durante el análisis HPLC/DAD se colectaron 6 fracciones durante los intervalos de 3 - 5 min, 14.5 - 16.5 min, 37 - 40 min, 45 - 47 min, 45 - 58 min y 50 - 54 minutos para su posterior análisis por espectrometría de masas con ionización por electrospray acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (ESI- QTOF-MS). Para el análisis ESI- QTOF-MS con inyección de flujo directo, se usó el equipo (Varian 500 MS Spectrometer), los resultados se utilizaron para establecer el perfil de polifenoles de las muestras de plasma. Las fracciones obtenidas a partir del análisis HPLC/DAD fueron inyectados a un flujo de 10  $\mu$ L/min en condiciones de ionización positivas (ESI+) y negativas (ESI-) con voltaje de pulverización de iones de 6000 V, y una temperatura capilar de 350°C. Los datos fueron recolectados en modo de escaneo completo dentro

de los rangos de 70 a 2000  $m/z$  y MS<sub>2</sub>. La identificación de los compuestos se llevó a cabo usando bases de datos disponibles ([spectra.psc.riken.jp/](http://spectra.psc.riken.jp/) y [massbank.eu](http://massbank.eu)), así como reportes de estudios previos de compuestos fenólicos de fresa. Este análisis fue llevado a cabo en colaboración con Dra. Maribel Ovando Martinez, en el laboratorio de biotecnología de lípidos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

### **Análisis cuantitativo por LC-QTOF-MS de polifenoles en plasma**

El análisis se realizó con un equipo de cromatografía líquida, Agilent serie 1290 acoplado a un equipo Agilent 6540 UHD Cuadrupolo tiempo-de-vuelo (Q-tof) de masa precisa LC/MS. La separación de los metabolitos de los compuestos fenólicos extraídos del plasma se realizó con una columna Zorbax SD C18 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm x 50 mm, Agilent Technologies), a 30 ° C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% (solvente A) y acetonitrilo 99.9 %/ácido fórmico 0.1% (solvente B). Las condiciones de la elución por gradiente fueron las siguientes: 3% B (0 min a 1 min), 3% - 97% B (1 min a 10 min), 3% B (10 min a 15 min), con procesamiento posterior de 4 min. La velocidad de flujo y el volumen de inyección fueron 0.4 mL/min y 20  $\mu\text{L}$ , respectivamente. El análisis QTOF, operó en modo de ionización por electrospray negativa (ESI-) y positiva (ESI +), con un flujo de gas N<sub>2</sub> de 10 L/min, voltaje capilar de 4.000 V, valores de energía de colisión  $m/z$  100, 20 eV;  $m/z$  500, 30 eV;  $m/z$  1000, 35 eV; gas nebulizador a 30 Psi y una temperatura de gas de 300 ° C y 7 L/min y energía de fragmentación de 125 V. Las longitudes de onda de referencia de selección en DAD fueron 280 nm, 320 nm y 501 nm con un ancho de banda de 4.0 nm. Los datos de MS/MS se recopilaron en modo de exploración completa desde  $m/z$  100 - 1000. Los compuestos quercetina-3-glucurónido, luteolin-6-c-glucósido, isorhamnetin-3-o-glucósido, pelargonidin-3-o-glucósido, ácido p-cumarico y ácido ferúlico se cuantificaron usando estándares comerciales. La identificación provisional de los compuestos se basó en estudios previos que informaron el mismo tipo de compuestos fenólicos y el Análisis Cualitativo Agilent MassHunter (B.05.00), lo que permitió la identificación de compuestos específicos mediante una búsqueda por fórmula química. Otra base de datos disponible utilizada fue [spectra.psc.riken.jp/](http://spectra.psc.riken.jp/) y [massbank.eu](http://massbank.eu). Este



análisis se realizó en North Dakota State University, ND, USA, por las Dras. Alice Fujita y Senay Simsek. Las muestras fueron enviadas por paquetería en condiciones frías con geles.

### **Análisis estadístico**

Grupos de 8 o 10 ratones/tratamiento fueron evaluados durante todo el estudio. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar en variables con distribución normal y mediana (rango intercuartil [RIQ]) en variables no paramétricas. El efecto en los valores de glucosa e insulina postprandial se evaluó por medio de curvas de glucosa e insulina postprandial (0 – 120 min). Usando la regla trapezoidal (Allison et al., 1995), se calcularon los valores para área bajo la curva (AUC), e incremento del área bajo la curva (iAUC) en los tiempos 0 - 30, 0 - 60 y 0 - 120 min. Se evaluaron también los valores de concentración máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo máximo ( $T_{max}$ ) para alcanzar la  $C_{max}$ . Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para la comparación de grupos se usó la prueba t-Student para determinar cambios en la ganancia de peso corporal y el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con medidas repetidas para determinar los cambios en la concentración de glucosa postprandial (mg/dL), empleando como factor el tiempo. Para los cambios en AUC, iAUC y  $C_{max}$ , su uso el ANOVA de una vía. Se empleó la prueba *post hoc* Dunnett para evaluar los efectos del tratamiento del EFRP comparado con el control. Se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman para  $T_{max}$ . El valor de  $P < 0.05$  se consideró de significancia estadística.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

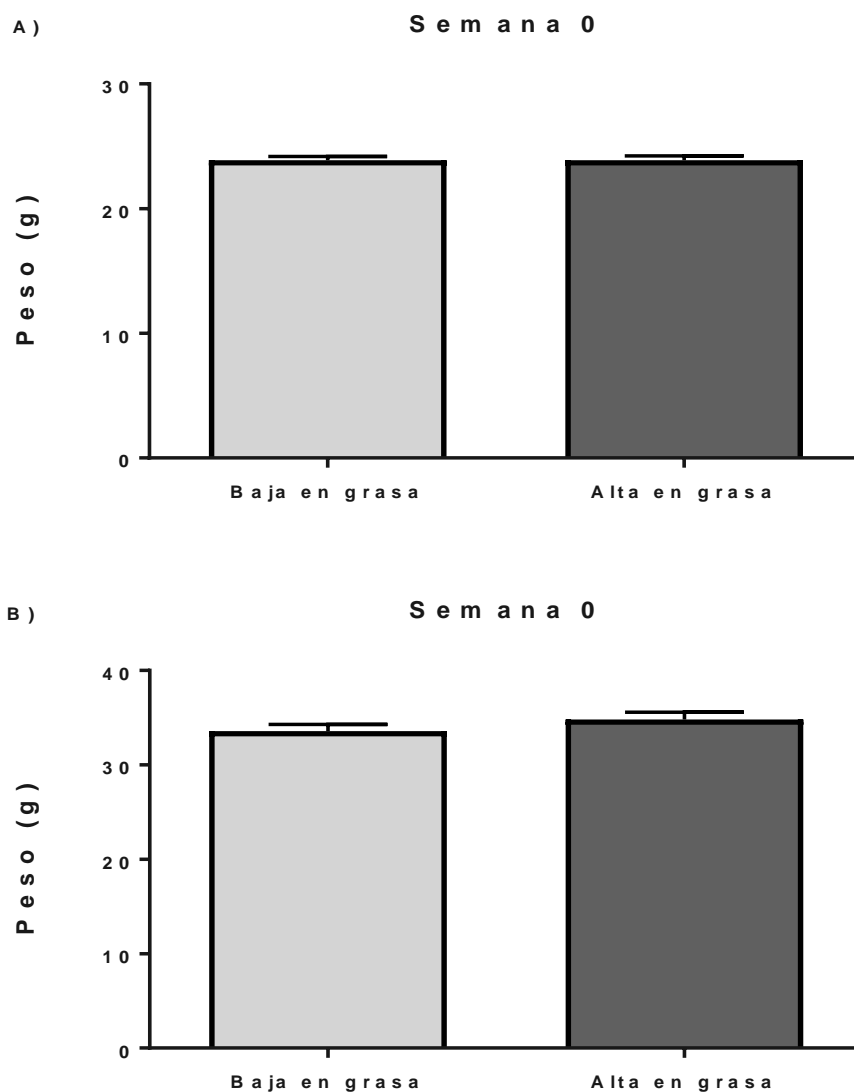
El presente estudio tuvo como objetivo evaluar si un extracto de fresa rico en polifenoles posee efectos hipoglucemiantes en ratones expuestos a dieta alta y baja en grasa. Los resultados muestran que la administración de 18 y 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles disminuyó la concentración de glucosa postprandial, desde el minuto 30 hasta las 2 horas posteriores a la administración del extracto, en una prueba de tolerancia oral a la glucosa, en los ratones alimentados con dieta alta en grasa

### Ganancia de peso corporal

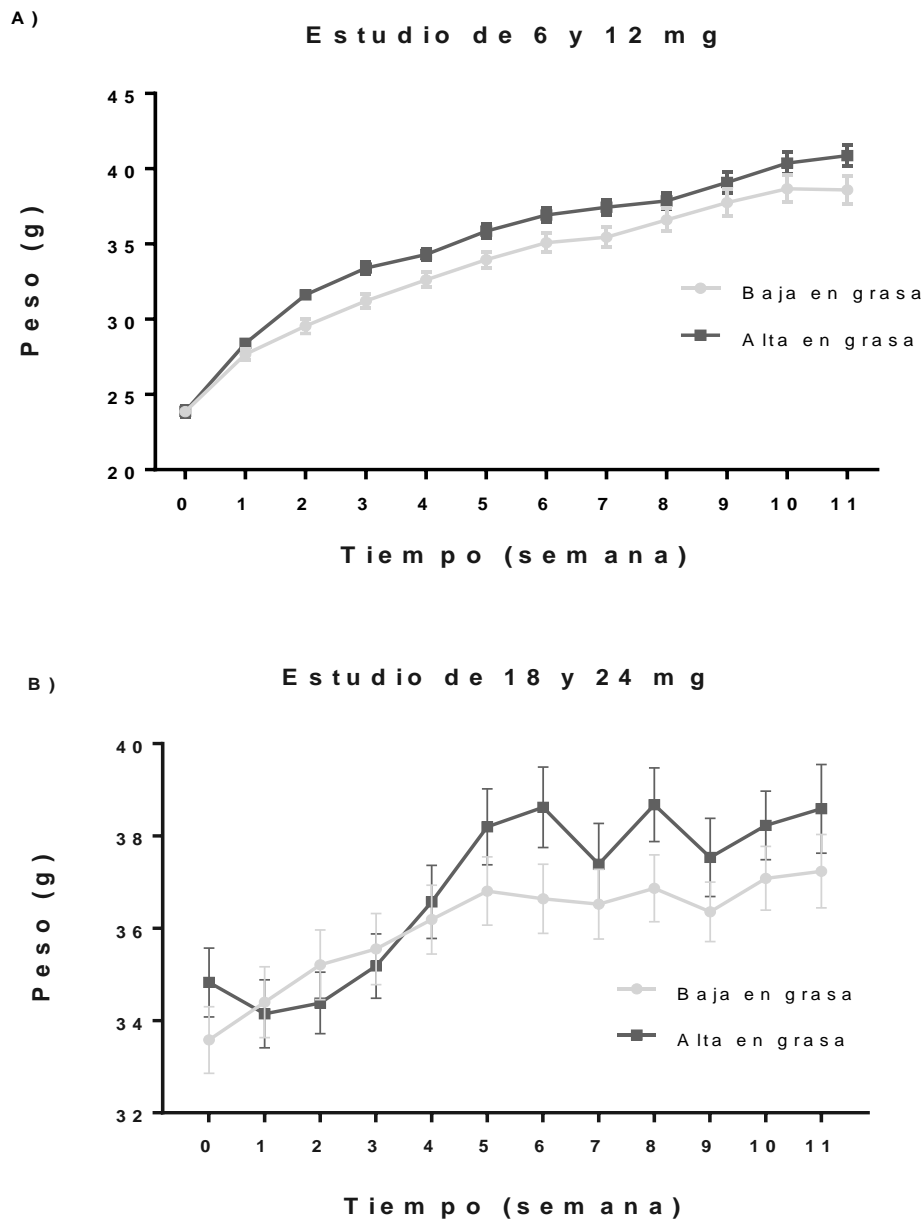
Durante once semanas, un total de 110 ratones macho de la cepa C57BL/6N fueron expuestos a dos tipos de dietas especiales: alta en grasa (AG) y baja en grasa (BG). Al inicio del protocolo con las dietas especiales, el peso de los ratones del estudio de 6 y 12 mg del EFRP no mostró diferencias significativas al comparar los grupos asignados a la dieta baja o alta en grasa (BG:  $23.8 \pm 0.2$  g, AG:  $23.8 \pm 0.3$  g,  $P = 0.96$ ), de manera similar, el peso de los ratones del estudio de 18 y 24 mg del EFRP tampoco mostró diferencias significativas al inicio del protocolo con dietas especiales (BG:  $34.8 \pm 0.7$  g, AG:  $33.5 \pm 0.7$  g,  $P = 0.23$ ) (**Figura 8**).

Durante las 11 semanas del protocolo con las dietas especiales se observó un mayor peso en los ratones de los grupos AG de ambos estudios (**Figura 9**). Al finalizar el protocolo de 11 semanas con las dietas especiales, la ganancia de peso fue mayor en los ratones expuestos a la dieta alta en grasa tanto en el estudio 1: 6 y 12 mg del EFRP (BG:  $14.7 \pm 0.9$  g, AG:  $17.0 \pm 0.3$  g,  $P = 0.020$ ), como en el estudio 2: 18 y 24 mg del EFRP (BG:  $3.5 \pm 0.3$  g, AG:  $4.7 \pm 0.1$  g,  $P = 0.0007$ ) (**Figura 10**). El modelo de ratón con obesidad inducida con dieta alta en grasa es distintivo en aumento de peso corporal, alteraciones en los niveles de glucosa en ayuno, e intolerancia a la glucosa como se pudo mostrar aquí y en estudios previos (Chuang et al., 2012, Haufe et al., 2016, Takacs et al., 2020). Como se esperaba, al finalizar el periodo de 11 semanas con dietas especiales los ratones en los grupos de dieta alta en grasa ganaron más peso que los ratones con dieta baja en grasa. Estos resultados están en concordancia

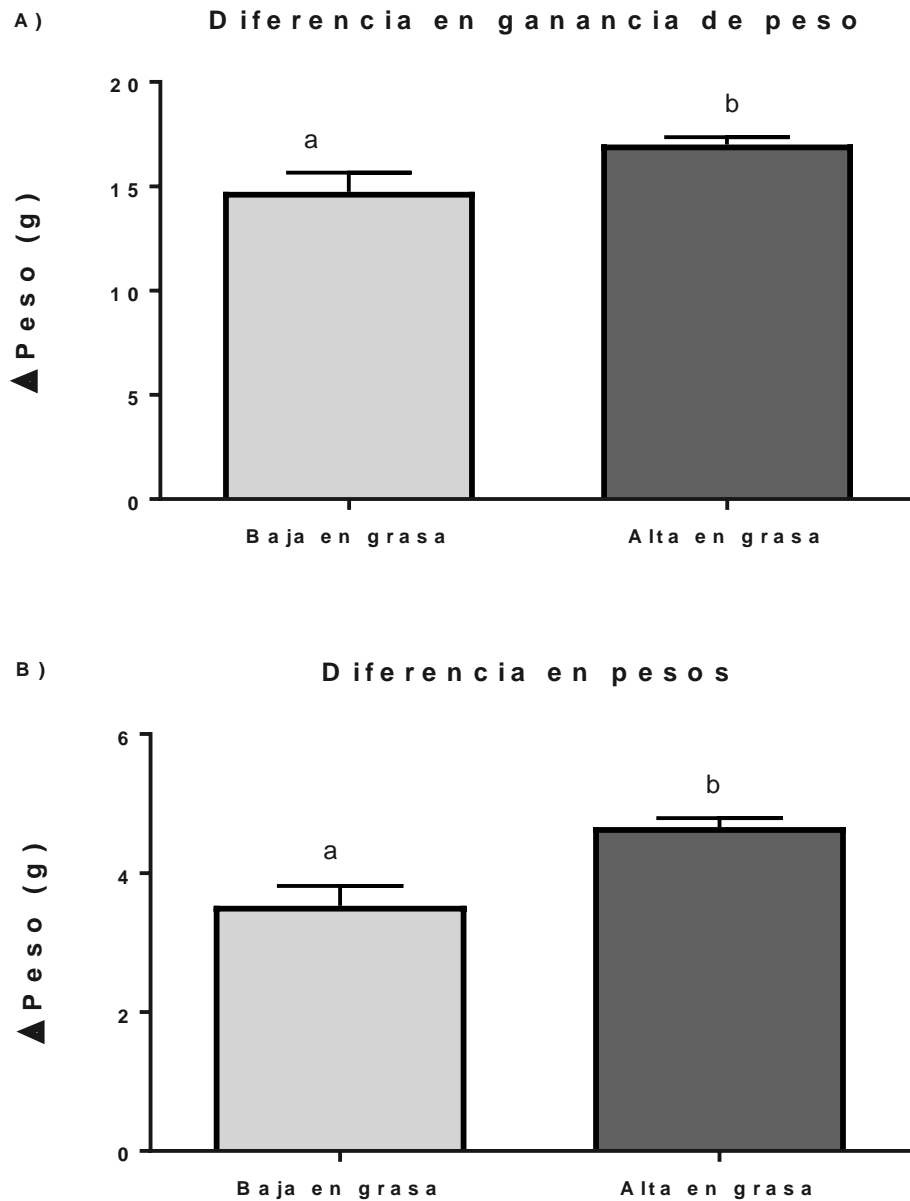
con los reportados por Overall et al. (2017) quienes mostraron que los ratones de la misma cepa (C57BL/6) expuestos a dieta alta en grasa ganaron más peso que aquellos con dieta baja en grasa.



**Figura 8.** Peso inicial de los ratones de la cepa C57BL/6N en los estudios 1 y 2. **A)** Comparación entre los grupos con dietas especiales en el estudio de 6 y 12 mg del extracto de fresa rico en polifenoles. **B)** Comparación entre los grupos con dietas especiales en el estudio de 18 y 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles. Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. Se utilizó la prueba t-student no pareada para determinar diferencias estadísticas.



**Figura 9.** Ganancia de peso corporal en el curso de las 11 semanas con dietas especiales. Las curvas en color gris representan el peso de los ratones en los grupos que recibieron la dieta baja en grasa. Las curvas en negro representan el peso de los ratones en los grupos que recibieron la dieta alta en grasa. **A)** Peso corporal de los ratones del estudio 1 de 6 y 12 mg del extracto de fresa. **B)** Peso corporal de los ratones del estudio 2 de 18 y 24 mg. Los datos son presentados como media  $\pm$  error estándar.



**Figura 10.** Diferencias en ganancia de peso corporal después de 11 semanas con las dietas especiales. **A)** Diferencia de peso entre los ratones alimentos con dieta baja o alta en grasa del estudio de 6 y 12 mg. **B)** Diferencia de peso entre los ratones alimentos con dieta baja o alta en grasa del estudio de 18 y 24 mg. Diferentes letras minúsculas significan diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos. Los datos son presentados como media  $\pm$  error estándar. Se utilizó la prueba t-student no pareada para determinar diferencias estadísticas.

## Consumo de alimento y calorías

Durante las 11 semanas con dietas especiales, se analizó el consumo de alimento y calorías. La ingesta de alimento en los ratones de la cepa C57BL/6N, del estudio 1 (6 y 12 mg EFRP), fue más alta en los grupos con dieta alta en grasa que en los ratones con dieta baja en grasa, AG: 4.9 g (RIQ: 4.1 - 5.6 g) y BG: 4.2 g (RIQ: 3.9 – 4.6) g, respectivamente ( $P < 0.0001$ ). Asimismo, el consumo de energía refleja el consumo de alimento, en el estudio 1, los ratones con dieta alta en grasa consumieron más energía que los ratones con dieta baja en grasa: AG: 25.0 kcal (RIQ: 21.3 – 28.9 kcal) y BG: 16.1 kcal (RIQ: 14.7 – 17.4 kcal), respectivamente ( $P < 0.0001$ ) (**Tabla 7**). Contrariamente al estudio 1, en el estudio 2 (18 y 24 mg EFRP), los ratones con dieta baja en grasa consumieron más alimento que aquellos con dieta alta en grasa, BG: 4.5 g (RIQ, 3.9 – 5.3 g) y AG: 3.8 g (RIQ, 3.1 – 4.2 g) , respectivamente ( $P < 0.0001$ ). Sin embargo, el consumo de energía, debido al aporte calórico por gramo de alimento, fue mayor en los ratones con dieta alta en grasa que en los ratones con dieta baja en grasa: AG: 19.7 kcal (RIQ, 15.9 – 21.5) y 16.9 kcal (RIQ, 14.6 – 20.0 kcal), respectivamente ( $P = 0.0017$ ) (**Tabla 7**). Se puede deducir que el aumento de peso significativamente mayor en los ratones con dieta alta en grasa comparados con los ratones con dieta baja en grasa se debe al incremento en el consumo de calorías proporcionados por gramo de dieta, AG: 5.1 kcal y BG: 3.8 kcal, respectivamente. Además, en el estudio 1 se observó mejor aceptabilidad por la dieta alta en grasa que por la dieta baja en grasa, mientras que en el estudio 2, los ratones con dieta baja en grasa consumieron más alimento por día que aquellos con dieta alta en grasa, no obstante, el consumo de calorías seguía siendo mayor en los ratones con dieta alta en grasa. Existen estudios que demuestran que los ratones con dieta alta en grasa suelen tener mejor aceptabilidad por la dieta que aquellos ratones con dieta baja en grasa (Wu et al., 2014).

La obesidad y la hiperglucemia postprandial se han reconocido como factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2, y el mejoramiento de las concentraciones de glucosa postprandial es un objetivo importante en la prevención de la enfermedad.

**Tabla 8.** Consumo diario de alimento y energía en ratones de la cepa C57BL/6N durante el protocolo de once semanas con dietas especiales.

<b>Estudio de 6 y 12 mg del EFRP</b>					
<b>Consumo</b>	Dieta baja en grasa		Dieta alta en grasa		P
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
Alimento (g)	4.2	3.9 – 4.6	4.9	4.1 - 5.6	< 0.0001
Energía (kcal)	16.1	14.7 – 17.4	25.0	21.3 – 28.9	< 0.0001
<b>Estudio de 18 y 24 mg del EFRP</b>					
Alimento (g)	4.5	3.9 – 5.3	3.8	3.1 – 4.2	< 0.0001
Energía (kcal)	16.9	14.6 – 20.0	19.7	15.9 – 21.5	0.0017

Todos los valores son presentados como medianas y rango intercuartil RIQ (Percentil 25 – Percetil 75). Las diferencias significativas del consumo de alimento y calorías fueron evaluadas con la prueba no paramétrica Mann-Whitney test.

Varios modelos *in vivo* de enfermedades han sido satisfactoriamente creados para el estudio de tratamientos relacionados con enfermedades metabólicas. Un modelo comúnmente utilizado, son los ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasa de la cepa C57BL/6, la cual se caracteriza por ganancia de peso rápida debido al incremento en la ingesta dietaria combinado con eficiencia metabólica disminuida (Nagy & Einwallner, 2018).

### Glucosa en ayuno

En el estudio de 6 y 12 mg del EFRP los ratones alimentados con dieta baja en grasa presentaron valores de glucosa en ayuno más elevados que aquellos alimentados con dieta alta en grasa, BG:  $214.2 \pm 7.5$  mg/dL y AG:  $168.1 \pm 8.4$  mg/dL, respectivamente ( $P = 0.0002$ ) (**Tabla 8**), la diferencia de medias fue de  $46.1 \pm 11.3$  mg/dL (95% IC, 23.38 - 68.81). Burcelin et al. (2002) demostraron que ratones de la cepa C57BL/6 después de ser alimentados con dieta alta en grasa por 12 semanas podían ser clasificados en 3 fenotipos, basados en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre: diabéticos obesos, diabéticos delgados y delgados no diabéticos. Ellos demostraron que los ratones delgados no diabéticos alimentados con dieta alta en grasa tenían niveles de glucosa en ayuno similares a los ratones alimentados con dieta baja en grasa. A través de una evaluación de recambio de glucosa (tasa de utilización de glucosa), se demostró que los ratones delgados no diabéticos tenían la capacidad de disminuir significativamente el nivel de glucosa en sangre comparado con el grupo de ratones que recibieron la dieta baja en grasa. No obstante, en los ratones obesos diabéticos la tasa de utilización de glucosa se redujo en un 60 % comparado con el grupo que recibió la dieta baja en grasa. En el estudio de 18 y 24 mg del EFRP, los ratones alimentados con dieta baja en grasa mostraron valores menores de glucosa en sangre en ayuno comparado con los ratones alimentados con dieta alta en grasa, BG:  $163.4 \pm 7.6$  mg/dL y AG:  $196 \pm 7.9$  mg/dL, respectivamente ( $P = 0.004$ ) (**Tabla 8**). La diferencia de medias en la glucosa en sangre en ayuno fue de  $32.6 \pm 11.1$  mg/dL (95% IC, 10.46 – 54.79).



**Tabla 9.** Glucosa en ayuno de los ratones de los estudios 1 y 2, después de once semanas con dietas especiales.

<b>Estudio de 6 y 12 mg del EFRP</b>			
	Dieta baja en grasa	Dieta alta en grasa	P
Glucosa en ayuno (mg/dL)	214.2 ± 7.5	168.1 ± 8.4	0.0002
<b>Estudio de 18 y 24 mg del EFRP</b>			
Glucosa en ayuno (mg/dL)	163.4 ± 7.6	196 ± 7.9	0.0040

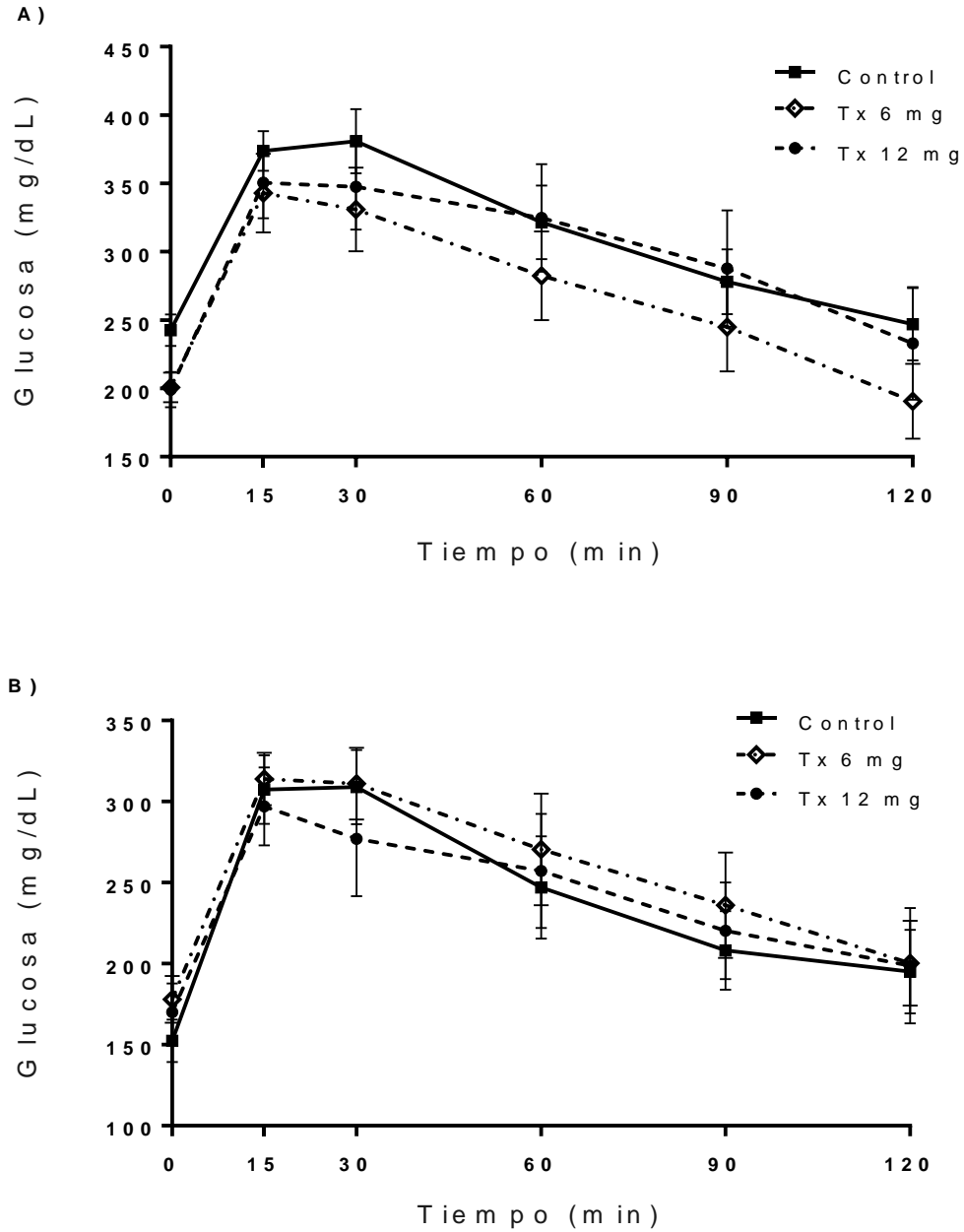
Todos los valores son presentados como medias ± error estándar. Se utilizó la prueba t-student no pareada para determinar diferencias estadísticas entre los grupos con dieta baja en grasa y alta en grasa para ambos estudios.

Una de las razones por las cuales se desarrolló este fenómeno se puede deber a que la cepa de ratón C57BL/6 es reconocida por ser más reactiva que otras cepas de ratones a la dieta alta en grasa y provocar cambios en la sensibilidad a la insulina (Nagy and Einwallner, 2018) .

## **Estudio 1: Efecto de las dosis de 6 y 12 mg del EFRP sobre la glucosa postprandial**

### **Prueba de tolerancia oral a la glucosa**

El aumento rápido de los casos de obesidad se ha acompañado por un incremento similar de casos de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Por ejemplo, aproximadamente el 90 % de las personas con diabetes tipo 2 presentan sobrepeso y cerca del 50 % son obesos, lo que sugiere una fuerte relación entre ambas condiciones patológicas. En algunos estudios se ha observado que los frutos rojos o las antocianinas de frutos rojos tienen la capacidad de disminuir la glucosa postprandial después de una PTOG (Rojo et al., 2012, Takacs et al., 2020). Nuestro grupo de trabajo evaluó las dosis de 6 y 12 mg de un extracto de fresa rico en polifenoles sobre la glucosa posprandial en ratones de la cepa C57BL/6N alimentados con dieta alta o baja en grasa, sin embargo, en el estudio 1 no se observó un efecto del EFRP sobre la glucosa postrandial (**Figura 11**). Resultados similares fueron reportados por Parelman et al. (2012), quienes demostraron que la suplementación con fresa en ratones de la cepa C57BL/6 con dieta alta o baja en grasa, disminuyó los niveles de glucosa en no ayuno, pero no mejoró la tolerancia a la glucosa durante una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa. Los posibles motivos por los cuales las dosis de 6 y 12 mg del EFRP no provocaron efectos sobre la glucosa postprandial se puede deber a las dosis de antocianinas aportadas por ambas dosis. El fabricante del extracto de fresa reportó que un gramo del extracto aporta alrededor de 8.27 mg de antocianinas, por lo que las dosis de 6 y 12 mg del EFRP aportaron aproximadamente 0.05 y 0.10 mg de antocianinas, respectivamente.

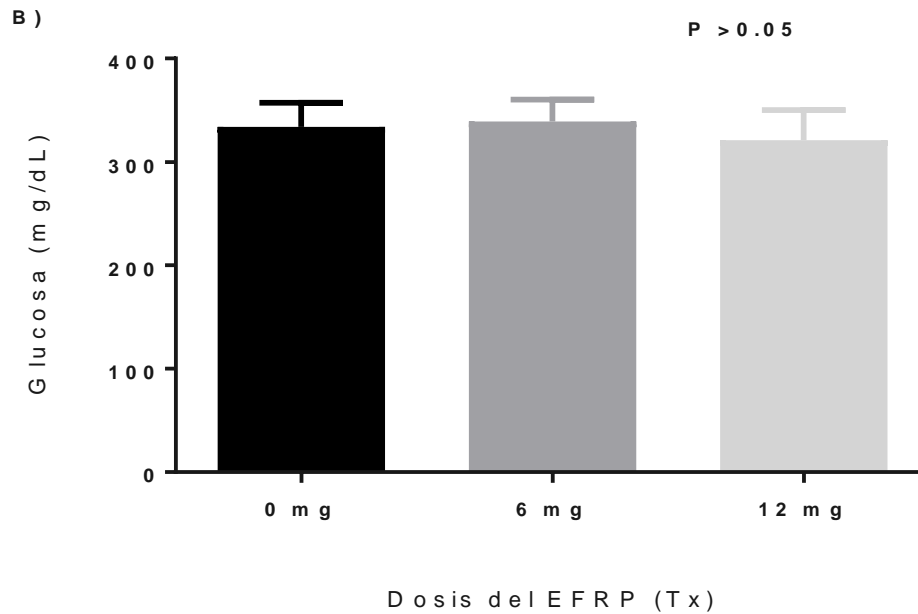
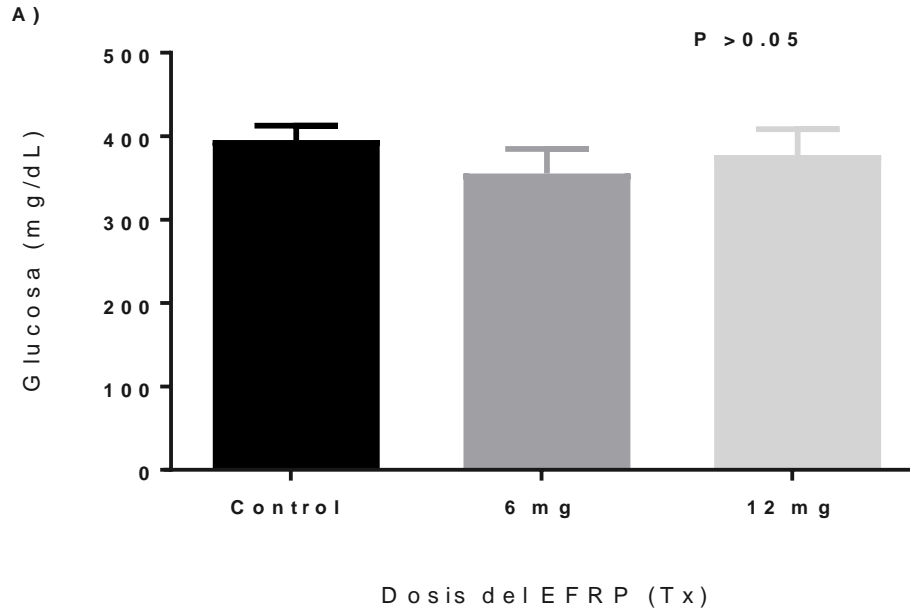


**Figura 11.** Efectos de las dosis de 0, 6 y 12 mg del extracto de fresa rico en polifenoles sobre la concentración de glucosa postprandial en ratones de la cepa C57BL/6N. **A)** dieta baja en grasa, **B)** dieta alta en grasa (n=10). Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. La prueba ANOVA de dos vías con medidas repetidas fue utilizada para determinar diferencias estadísticas.

En otro estudio (Chuang et al., 2012) publicaron los efectos hipoglucemiantes de un extracto de uva sobre ratones alimentados con dieta alta en grasa, no obstante, la dosis que administraron a los ratones aportó aproximadamente 2.77 mg de antocianinas, valor mucho mayor que lo empleado en el estudio 1.

### **Concentración máxima de glucosa postprandial**

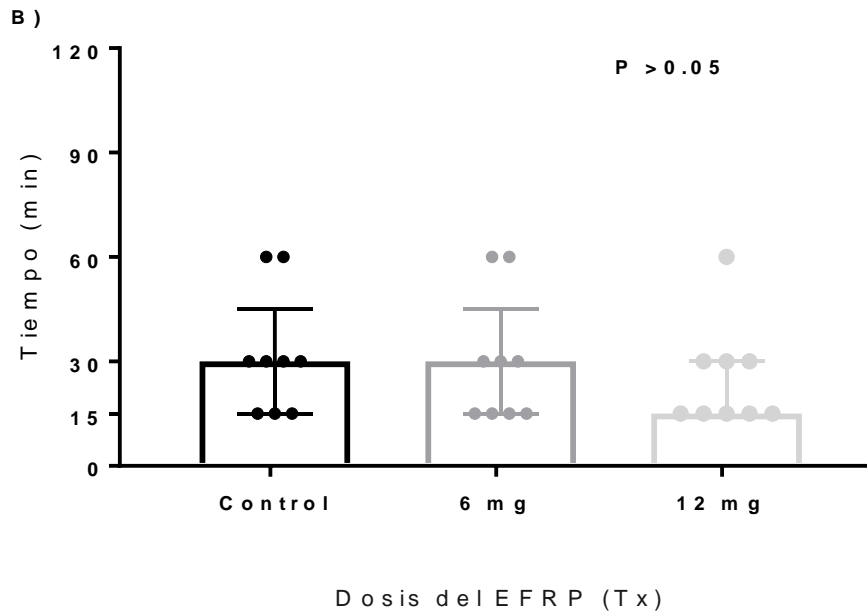
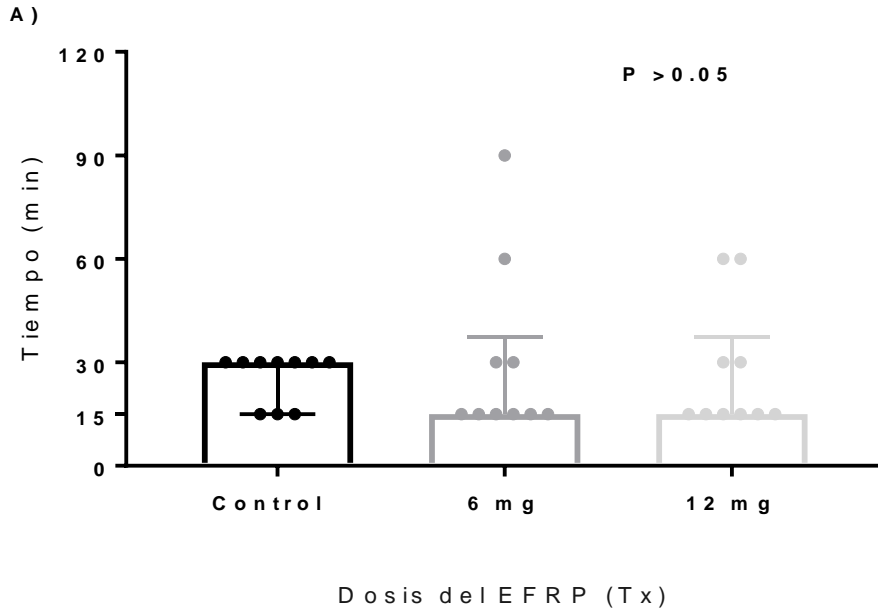
Se sabe que la hiperglucemia postprandial es una de las principales anormalidades de la homeostasis de la glucosa asociadas con diabetes tipo 2 y es marcadamente exacerbada en pacientes con diabetes con hiperglucemia en ayuno. La concentración máxima de glucosa posprandial ( $C_{max}$ ) indica el momento en que la glucosa postprandial se encuentra en su concentración más elevada en uno de los tiempos de medición. En una revisión de la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes, 2018) se menciona que el pico de glucosa en individuos sin diabetes llega alrededor de los 60 min después de un alimento, rara vez excede de 140 mg/dL, y regresa a niveles preprandiales dentro de 2-3 h. Estudios han demostrado que los frutos rojos o las antocianinas de frutos rojos pueden disminuir la concentración máxima de glucosa postprandial (Anhê et al., 2015, Castro-Acosta et al., 2016b, Chuang et al., 2012, Schell et al., 2017, Torronen et al., 2012). No obstante, en nuestro estudio, las dosis de 6 y 12 mg del EFRP no provocaron cambios en la concentración máxima de glucosa postprandial en ratones alimentados con dieta alta o baja en grasa (**Figura 12**). De manera similar, ensayos en humanos han resaltado que 600 mg de antocianinas de grosella negra administrados en bebidas no disminuyeron la concentración máxima de glucosa postprandial, pero si provocaron una disminución de glucosa postprandial en los primeros 30 min tras el consumo de un alimento rico en carbohidratos comparado con el grupo control que no recibió la bebida con las antocianinas (Castro-Acosta et al., 2016b). Aunque, otros estudios si demostraron que una comida que contenía una mezcla de fresa, arándano y grosella negra (150 g) en su composición provocó una reducción significativa de la concentración máxima de glucosa postprandial, así como, una clara diferencia en la forma de la curva de glucosa con disminución significativa en la fase temprana postprandial (15 min) (Torronen et al., 2012).



**Figura 12.**  $C_{max}$  de glucosa postprandial en ratones administrados con 0, 6 y 12 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. **A)** Ratones con dieta baja en grasa. **B)** Ratones con dieta alta en grasa. La prueba ANOVA de una vía fue utilizada para determinar diferencias estadísticas.

### **Tiempo máximo para alcanzar la $C_{\max}$ de glucosa postprandial**

Además de disminuir la concentración máxima de glucosa postprandial, otras estrategias terapéuticas se han enfocado en el retraso de la absorción de glucosa expresado a través del tiempo máximo ( $T_{\max}$ ) para alcanzar la concentración máxima de glucosa postprandial. Las dosis de 6 y 12 mg del extracto de fresa no provocaron cambios considerables en el tiempo máximo ( $T_{\max}$ ) para alcanzar la concentración máxima en los ratones que recibieron una dieta baja en grasa al compararlos con el grupo control que recibió la solución vehículo (agua). De manera similar, las mismas dosis no ocasionaron cambios estadísticamente sobre el  $T_{\max}$  significativos en ratones alimentados con dieta alta en grasa (**Figura 13**). El valor del  $T_{\max}$  indica la velocidad de absorción de glucosa a través del intestino y que, a su vez, se expresa en el aumento de la concentración de glucosa en plasma. Es decir, el tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima de glucosa postprandial, ese se representa como el tiempo máximo. El control de la hiperglucemia postprandial ha sido sugerido como una medida importante en la prevención y manejo de diabetes tipo 2. Algunos fármacos como la acarbosa, un inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa tiene la función de retrasar la liberación y así, la absorción de glucosa en intestino. A través de un estudio de relación estructura y actividad llevado a cabo por Xu et al. (2018) demostraron que las antocianinas, principalmente perlargonidinas, poseen efectos inhibitorios de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa similares a los efectos de la acarbosa. No obstante, los inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa tienen la limitación de que su función sólo se da sobre fuentes ricas en almidón, por lo que otras fuentes ricas en otros tipos de carbohidratos (p.ej. sacarosa o fructosa) no tiene efecto sobre ellas, además no evita la hiperglucemia cuando grandes cantidades de glucosa son liberados en el intestino delgado como monosacárido. Por otra parte, la inhibición de transportadores que controlan la absorción intestinal de glucosa podría conducir a la disminución del aumento de glucosa en plasma y subsecuentemente la secreción de insulina después de la ingesta de un alimento rico en carbohidratos, los enfoques terapéuticos sobre la inhibición de los transportadores de glucosa emergen como una opción para el tratamiento de personas con diabetes tipo 2 (Schulze et al., 2014).



**Figura 13.**  $T_{max}$  para alcanzar la  $C_{max}$  de glucosa postprandial en ratones expuestos a las dosis de 0 (Control), 6 y 12 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. **A)** Ratones con dieta baja en grasa. **B)** Ratones con dieta alta en grasa. Los datos son presentados son mediana y rango intercuartil. La prueba de Friedman fue utilizada para determinar diferencias estadísticas.

Un estudio demostró a través de ensayos en la línea celular Caco-2 y *ex vivo*, en tejido yeyunal de ratón, que la antocianina delfinidina afectaba la absorción de glucosa a través de la inhibición del transportador de glucosa acoplado a sodio 1 (SGLT1) (Hidalgo et al., 2017). Asimismo, un extracto de grosella negra demostró tener actividad inhibitoria sobre transportadores de glucosa SGLT1 y GLUT2 (Castro-Acosta et al., 2017). Así, en nuestro estudio se evaluó el tiempo máximo para alcanzar la concentración máxima de glucosa postprandial para tratar de acercarnos a posibles mecanismos involucrados en la reducción de la glucosa postprandial, tal como la inhibición de los transportadores de glucosa, sin embargo no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos de ratones que recibieron la dieta alta o baja en grasa al comparar al conjunto de ratones tratados con las dosis de 6 y 12 mg del EFRP, con el control que sólo recibió la solución vehículo.

#### **Área bajo la curva e incremento del área bajo la curva de glucosa postprandial**

Aunque las dosis de 6 mg y 12 mg del extracto no provocaron cambios estadísticamente significativos sobre la curva de la prueba de tolerancia oral a la glucosa y la concentración máxima de glucosa postprandial, se realizó el análisis de las áreas bajo de la curva (AUC) y el incremento del área bajo la curva (iAUC) en diferentes tiempos. No se observaron disminuciones significativas en ambos parámetros, en ninguno de los grupos (AG y BG) con ninguna de las dosis del EFRP (0, 6 y 12 mg) (**Tablas 9 y 10**). Sin embargo, la dosis más alta en este estudio (12 mg) mostró una tendencia hacia la disminución de los niveles de glucosa postprandial, reflejada en el iAUC 0 - 15 min y 0 - 30 min ( $P = 0.1456$  y  $0.1861$ , respectivamente), en ratones alimentados con dieta alta en grasas (**Tabla 10**). El iAUC se ha utilizado para describir adecuadamente la respuesta glucémica a los alimentos (Sakaguchi et al., 2016). Además, el AUC e iAUC, son índices de utilización completa de glucosa después de una carga de glucosa, y han sido ampliamente utilizado para calcular el índice glucémico de los alimentos y para evaluar la efectividad de fármacos para mitigar la hiperglucemia postprandial (Sakaguchi et al., 2015).



**Tabla 9.** AUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 6 y 12 mg de EFRP.

Tiempo (min)	Glucosa AUC (mg/min * dL)				
	Extracto de fresa				
	0 mg	6 mg	P <sub>1</sub>	12 mg	P <sub>2</sub>
Dieta baja en grasa					
0 - 15	4622 ± 97	4079 ± 288	0.1317	4122 ± 256	0.3025
0 - 30	5660 ± 274	5055 ± 442	0.1529	5235 ± 413	0.6853
0 - 60	10535 ± 739	9200 ± 916	0.1130	10085 ± 1043	0.9288
0 - 90	8991 ± 723	7908 ± 952	0.3017	9185 ± 1223	0.9876
0 - 120	7875 ± 738	6534 ± 880	0.2021	7809 ± 1236	0.9986
Dieta alta en grasa					
0 - 15	3448 ± 224	3688 ± 218	0.8039	3503 ± 303	0.9871
0 - 30	4622 ± 301	4688 ± 268	0.9891	4306 ± 421	0.8307
0 - 60	8340 ± 763	8725 ± 830	0.9476	8013 ± 1043	0.9719
0 - 90	6830 ± 832	7598 ± 996	0.8343	7163 ± 959	0.9692
0 - 120	6050 ± 731	6543 ± 877	0.9112	6287 ± 978	0.9822

Todos los valores son presentados como medias ± error estándar, n=10. Las significancias estadísticas en la concentración de AUC de glucosa postprandial fueron evaluados por ANOVA de una vía y comparación múltiple, *post hoc* (Dunnet-test). <sub>1</sub> es la comparación 0 mg vs 6mg y <sub>2</sub> 0 mg vs 12 mg.

**Tabla 10.** iAUC de la glucosa postprandial en el estudio de 0, 6 y 12 mg de EFRP.

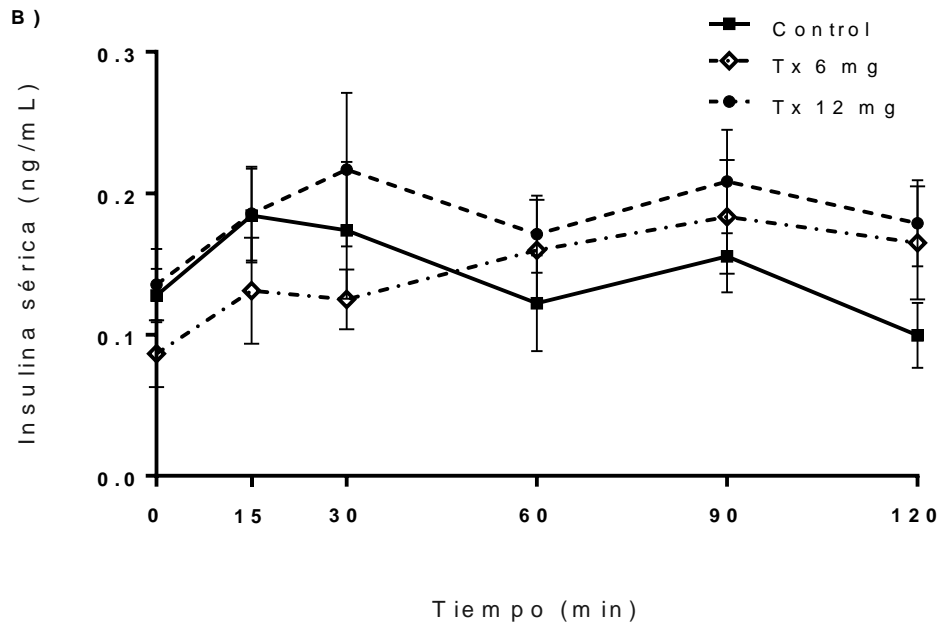
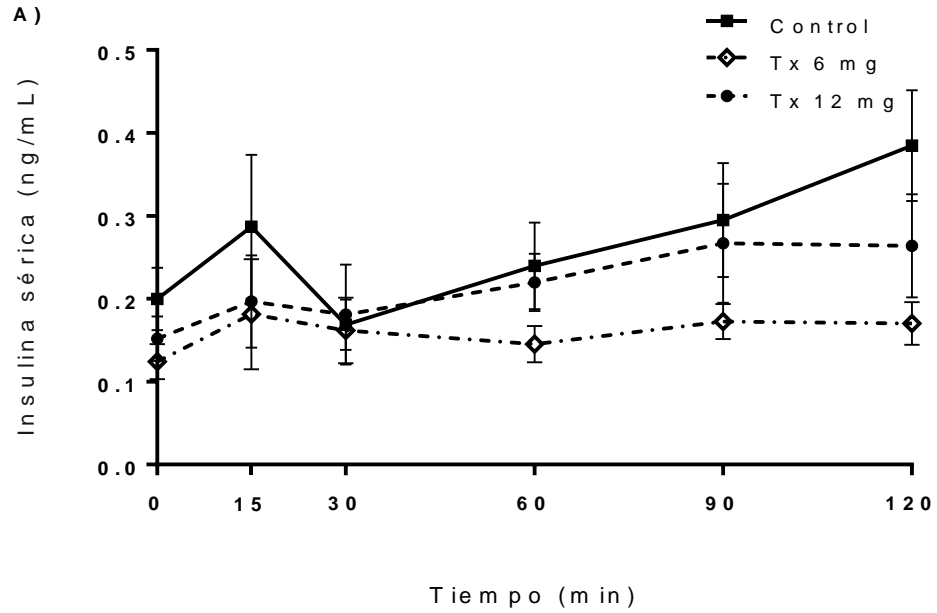
Tiempo (min)	Glucosa iAUC (mg/min * dL)				
	Extracto de fresa rico en polifenoles				
	0 mg	6 mg	P <sub>1</sub>	12 mg	P <sub>2</sub>
Dieta baja en grasa					
0 - 15	3004 ± 544	3110 ± 469	0.9517	3381 ± 537	0.8792
0 - 30	3004 ± 544	3110 ± 469	0.9517	3381 ± 537	0.8792
0 - 60	6260 ± 1383	6285 ± 1108	0.9995	7490 ± 1436	0.8113
0 - 90	3351 ± 2096	4091 ± 1556	0.8707	6576 ± 2399	0.5659
0 - 120	-1712 ± 2509	-454.5 ± 1934	0.8040	3174 ± 3245	0.4506
Dieta alta en grasa					
0 - 15	1162 ± 140	1020 ± 75	0.6476	953.3 ± 93	0.1456
0 - 30	3497 ± 346	3039 ± 161	0.5073	2709 ± 358	0.1861
0 - 60	7263 ± 718	6428 ± 540	0.6568	5623 ± 1163	0.5240
0 - 90	9520 ± 1192	8689 ± 1208	0.8641	7686 ± 1974	0.7550
0 - 120	10997 ± 1609	9896 ± 1771	0.8735	8873 ± 2864	0.8261

Todos los valores son presentados como medias ± error estándar, n=10. Las significancias estadísticas en la concentración de iAUC de glucosa postprandial fueron evaluadas por ANOVA de una vía y comparación múltiple, *post hoc* (Dunnet-test). <sup>1</sup>Es la comparación 0 mg vs 6 mg y <sup>2</sup>0 mg vs 12 mg.

Aunque las dosis de 6 y 12 mg del EFRP no provocaron cambios estadísticamente significativos en la PTOG,  $C_{max}$  y  $T_{max}$ , nuestros resultados muestran una inclinación hacia la baja en los valores del iAUC tempranos (0 - 15 y 0 - 30 min), comparados con la dieta baja en grasa. Estos resultados nos permitieron pensar en efectos prometedores al utilizar concentraciones más elevadas del extracto de fresa rico en polifenoles en el mismo modelo animal de obesidad inducida con dieta alta en grasa.

### **Insulina sérica**

Similar a la respuesta desarrollada en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, las dosis de 6 y 12 mg del EFRP no redujeron los niveles de insulina postprandial en ninguno de los puntos de tiempo en ratones con dieta alta en grasa ( $P=0.49$ ) o con dieta baja en grasa ( $P=0.09$ ) (**Figura 14**). No obstante, existen estudios que han demostrado la paridad de respuestas tanto en glucosa como en insulina postprandial. Anhê et al. (2015) demostraron que un extracto de cereza disminuyó tanto la glucosa como la insulina postprandial. En otro estudio también se demostró la disminución de la insulina postprandial provocado por una mezcla de frutos rojos y dichas respuestas fueron vinculadas con el aumento de la incretina GLP-1 en los grupos tratamiento.

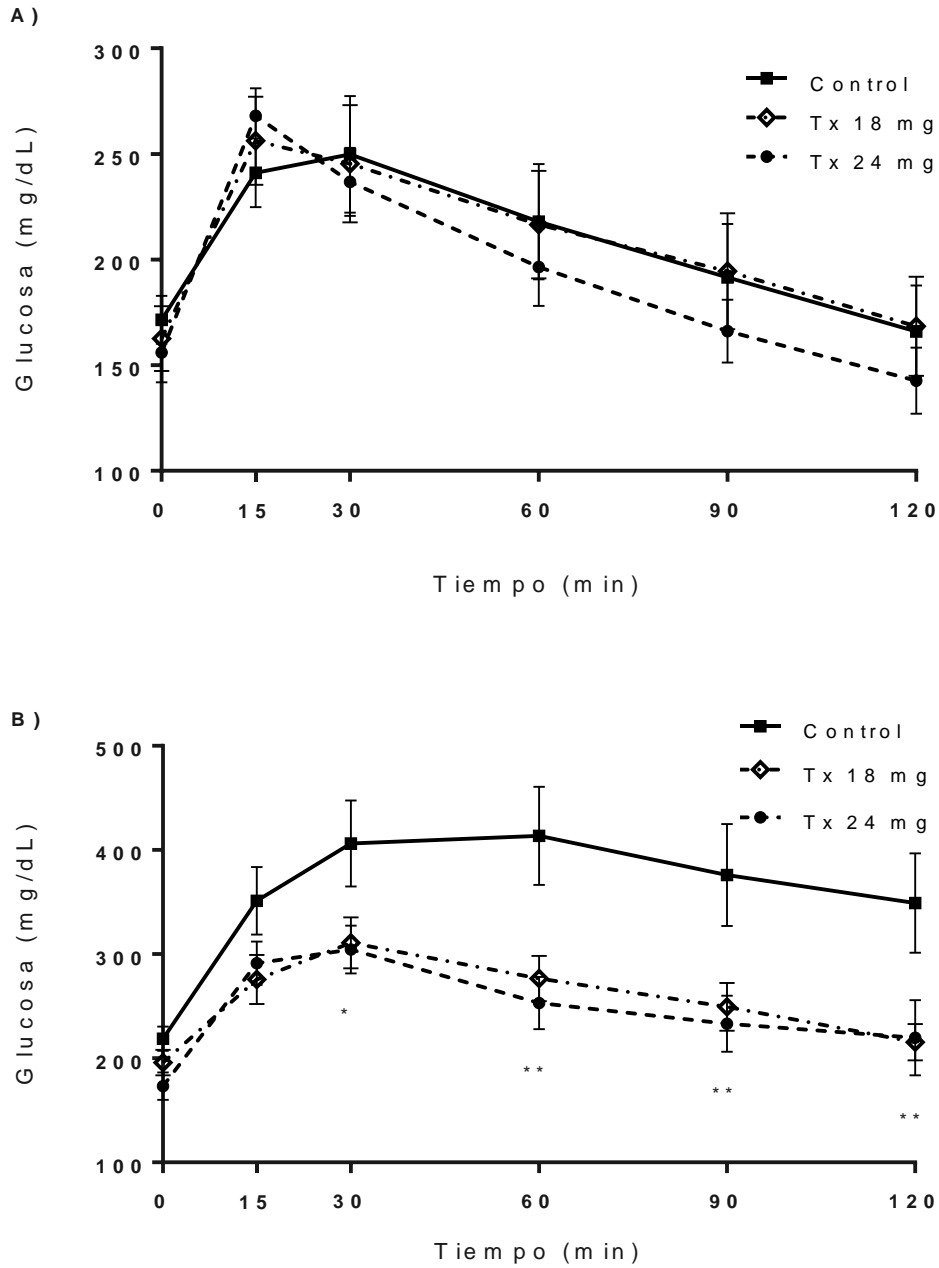


**Figura 14.** Concentraciones de insulina sérica postprandial. **A)** Ratones alimentados por 11 semanas con dieta baja en grasa. **B)** Ratones alimentados por 11 semanas con dieta alta en grasa. Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar,  $n=10$ .  $P > 0.05$

## **Estudio 2: Efecto de las dosis de 18 y 24 mg del EFRP sobre la glucosa postprandial**

### **Prueba de tolerancia oral a la glucosa**

Para nuestro conocimiento este es el primer estudio que demuestra efectos hipoglucemiantes de un extracto de fresa sobre ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasa tras una prueba de tolerancia oral a la glucosa. En los ratones alimentados con dieta alta en grasa, la coadministración de las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa con la solución con glucosa redujo significativamente la glucosa postprandial a partir en los puntos 30 ( $P < 0.05$ ), 60, 90 y 120 min ( $P < 0.01$ ) comparado con el grupo control (0 mg de EFRP) (**Figura 15 B**). Algunas investigaciones han demostrado que el consumo de frutos rojos, incluido fresa o extracto de fresa, reducen la concentración de glucosa postprandial en modelos animales, principalmente en ratones de la cepa C57BL/6 (Anhê et al., 2015, Haufe et al., 2016, Takacs et al., 2020). En nuestro estudio, los ratones del grupo BG y que recibieron las dosis de 18 o 24 mg del EFRP seguido de la carga oral de glucosa, no mostraron cambios significativos en la concentración de glucosa postprandial,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , e iAUC cuando fueron comparados con el grupo control (0 mg de EFRP) (**Figura 15 A**). Resultados similares fueron reportados por Parelman et al. (2012), quienes examinaron el efecto sobre la tolerancia a la glucosa en ratones de la cepa C57BL/6J alimentados con dieta baja y alta en grasa, de la administración crónica a un extracto de fresa, no se vieron cambios significativos en la glucosa postprandial después de una prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. El efecto de los frutos rojos o antocianinas de frutos rojos sobre la modulación de la respuesta glucémica es amplio. Como se mencionó anteriormente, los efectos van desde inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, involucradas en la digestión de carbohidratos, inhibición de transportadores de glucosa SGLT1, GLUT1, y SGLT2, estimulación de la secreción de incretinas GIP y GLP-1, liberación de insulina, aumento en la sensibilización a la insulina, entre otros (Akkarachiyasit et al., 2011, Castro-Acosta et al., 2016b, Hong et al., 2013, Manzano & Williamson, 2010, Torronen et al., 2012).



**Figura 15.** Efectos de las dosis de 0, 18 y 24 mg del extracto de fresa rico en polifenoles sobre la concentración de glucosa postprandial en ratones de la cepa C57BL/6N. (n= 8 por grupo). **A)** Dieta baja en grasa, **B)** Dieta alta en grasa. Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas con ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, comparación múltiple entre los grupos tratamiento y control (*post hoc* Dunnett). \* P < 0.05, \*\*P < 0.01.

### **Concentración máxima de glucosa postprandial**

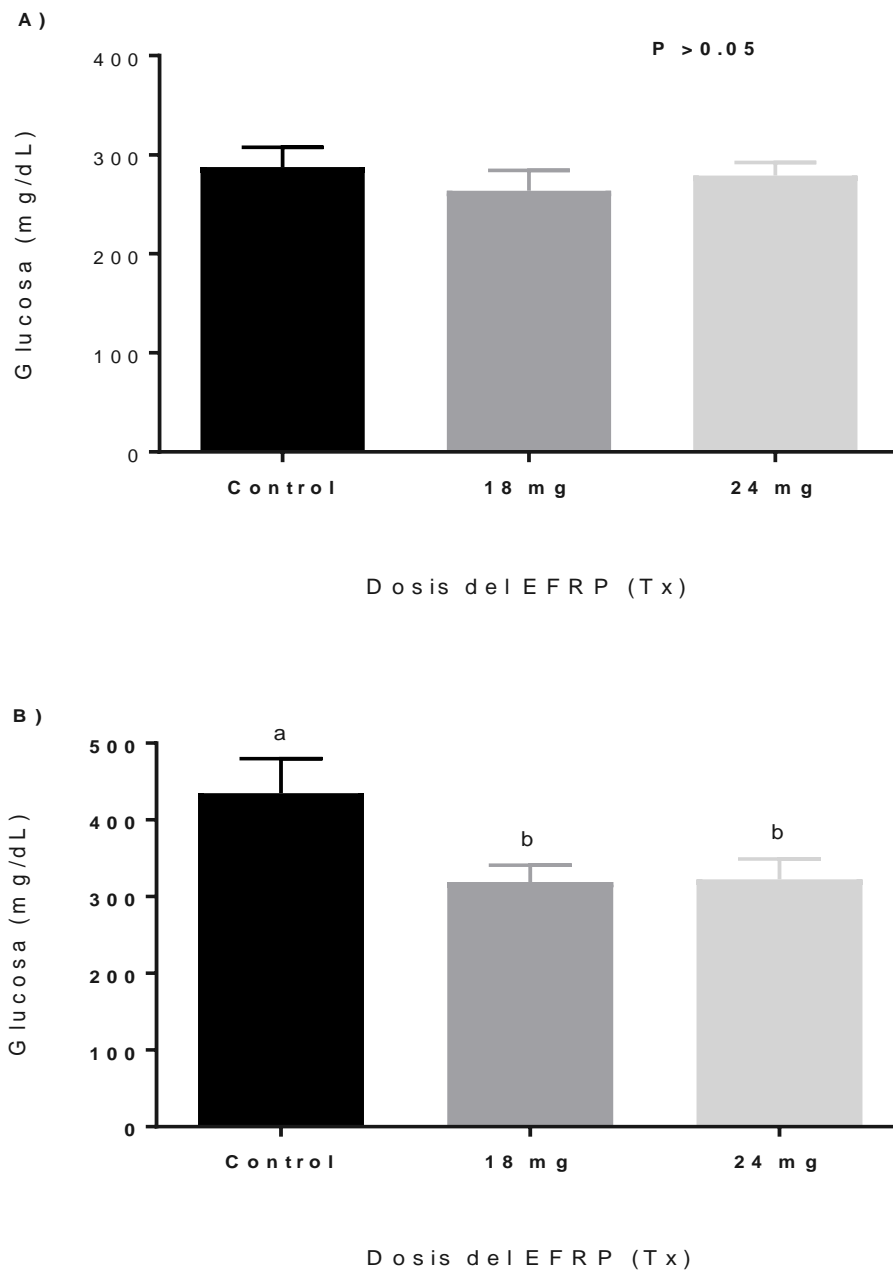
En ratones con dieta baja en grasa, las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa no provocaron cambios considerables en los picos de glucosa o concentración máxima de glucosa postprandial ( $C_{max}$ ) comparados con el grupo control que sólo recibió la solución vehículo (agua) (**Figura 16 A**). Sin embargo, los cambios provocados por las dosis de 18 y 24 mg de EFRP en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, en el grupo con dieta alta en grasa, se muestran reflejados en la concentración máxima de glucosa postprandial. La  $C_{max}$  de glucosa fue disminuida por el tratamiento con 18 mg ( $319.1 \pm 21.9$  mg/dL) y 24 mg ( $322.5 \pm 26.5$  mg/dL) del extracto de fresa, comparado con el grupo control que recibió 0 mg ( $434.6 \pm 45.2$  mg/dL) ( $P = 0.0333$ ), en ratones que recibieron dieta alta en grasa (**Figura 16 B**). En general, varios estudios sugieren que la fresa o sus extractos tienen efectos antidiabéticos debido a su contenido de antocianinas (Paquette et al., 2017, Prior et al., 2008, Takacs et al., 2020).

### **Tiempo máximo para alcanzar la $C_{max}$ de glucosa postprandial**

Las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa no provocaron cambios significativos en el tiempo máximo ( $T_{max}$ ) para alcanzar la concentración máxima en los ratones que recibieron una dieta baja en grasa al compararlos con el grupo control. De manera similar, las mismas dosis no ocasionaron cambios estadísticamente significativos sobre el  $T_{max}$  en ratones alimentados con dieta alta en grasa (**Figura 17**).

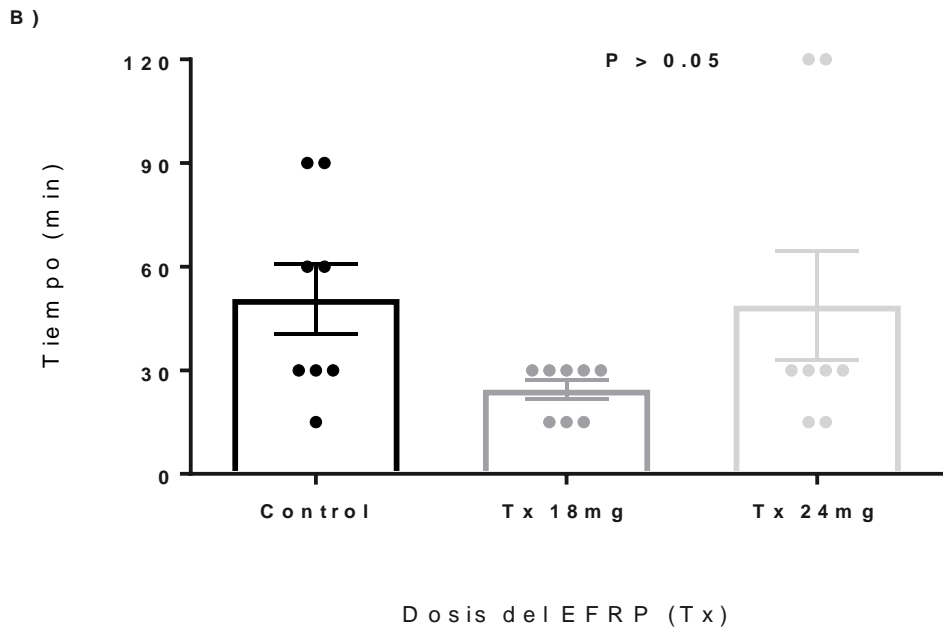
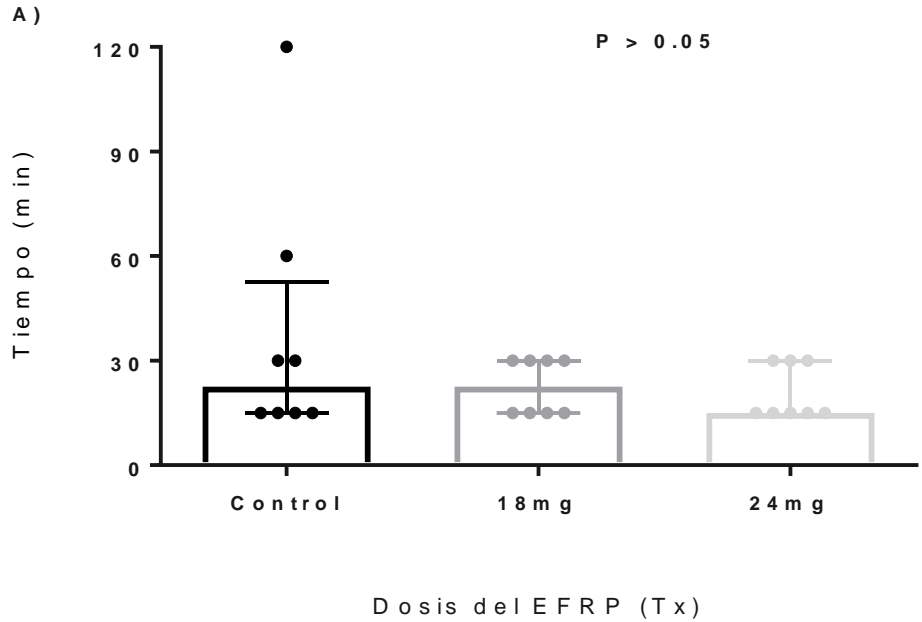
### **Área bajo la curva e incremento del área bajo la curva de glucosa postprandial**

Las dosis de 18 y 14 mg del extracto de fresa no provocaron cambios considerables en el área bajo la curva (AUC) o en los incrementos del área bajo la curva (iAUC), en el grupo con dieta baja en grasa (**Tablas 11 y 12**). No obstante, en el grupo de ratones que recibió la dieta alta en grasa, las dosis de 18 y 24 mg provocaron una disminución estadísticamente significativa del AUC los rangos de tiempo de 0 - 60 min, 0 - 90 min y 0 - 120 min ( $P < 0.05$ ) (**Tabla 11**). El iAUC también disminuyó significativamente en el grupo de ratones con dieta alta en grasa y administración de 18 mg del EFRP, en los rangos de tiempo de 0 - 60 min, 0 - 90 min y 0 - 120 min ( $P < 0.05$ ) al compararlo con el grupo control (**Tabla 12**).



**Figura 16.** Efecto de las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa sobre la concentración máxima de glucosa postprandial ( $C_{max}$ ). A) Dieta baja en grasa, B) Dieta alta en grasa. Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. Diferentes literales indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre grupos tratamiento comparado con grupo control (0 mg).  $C_{max}$  fue evaluado por ANOVA de una vía y comparación múltiple con prueba post hoc (Dunnet-test).





**Figura 17.**  $T_{max}$  para alcanzar la  $C_{max}$  de glucosa postprandial en ratones expuestos a las dosis de 18 y 24 mg del extracto de fresa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. **A)** Ratones con dieta baja en grasa. **B)** Ratones con dieta alta en grasa. Los datos son presentados como mediana y rango intercuartil. La prueba de Friedman fue utilizada para determinar diferencias estadísticas.  $P > 0.05$ .

**Tabla 10.** AUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 18 y 24 mg de EFRP.

Tiempo (min)	Glucosa AUC (mg/min * dL)				
	0 mg	Extracto de fresa			P <sub>2</sub>
		18 mg	P <sub>1</sub>	24 mg	
Dieta baja en grasa					
0 - 15	3095 ± 161	3142 ± 248	0.9799	3290 ± 169	0.7006
0 - 30	3682 ± 251	3762 ± 347	0.9707	3794 ± 230	0.9408
0 - 60	7016 ± 791	6855 ± 764	0.9807	6517 ± 505	0.8246
0 - 90	6143 ± 780	6092 ± 766	0.9980	5653 ± 474	0.8259
0 - 120	5363 ± 694	5331 ± 743	0.9991	4837 ± 446	0.7771
Dieta alta en grasa					
0 - 15	4275 ± 321	3535 ± 259	0.1273	3486 ± 243	0.1002
0 - 30	5680 ± 536	4399 ± 333	0.0675	4469 ± 317	0.0858
0 - 60	12296 ± 1318	8814 ± 679*	0.0302	8363 ± 685*	0.0144
0 - 90	11843 ± 1420	7894 ± 667*	0.0212	7294 ± 761**	0.0082
0 - 120	10875 ± 1447	6973 ± 602*	0.0296	6795 ± 934*	0.0229

Todos los valores son presentados como medias ± error estándar, n=8. Las significancias estadísticas en la concentración de AUC de glucosa postprandial fueron evaluados por ANOVA de una vía y comparación múltiple, *post hoc* (Dunnet-test). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. †Es la comparación 0 mg vs 6 mg y ‡0 mg vs 12 mg.

**Tabla 11.** iAUC de glucosa postprandial en el estudio de 0, 18 y 24 mg de EFRP.

Tiempo (min)	Glucosa iAUC (mg/min * dL)				
	Extracto de fresa				
	0 mg	18 mg	P <sub>1</sub>	24 mg	P <sub>2</sub>
Dieta baja en grasa					
0 - 15	522.2 ± 135	702.2 ± 115	0.5259	861.7 ± 129	0.1245
0 - 30	1631 ± 485	2025 ± 363	0.7364	2228 ± 386	0.4944
0 - 60	3503 ± 1469	4001 ± 867	0.9325	3888 ± 948	0.9567
0 - 90	4500 ± 2369	5214 ± 1296	0.9435	4684 ± 1466	0.9959
0 - 120	4718 ± 3112	5666 ± 1677	0.9423	4664 ± 1942	0.9998
Dieta alta en grasa					
0 - 15	991.9 ± 178	599.1 ± 117	0.0962	885 ± 100	0.8032
0 - 30	3389 ± 597	2062 ± 314	0.0706	2753 ± 302	0.4801
0 - 60	9119 ± 1714	5003 ± 706*	0.0388	5915 ± 809	0.1165
0 - 90	14395 ± 2954	7025 ± 1045*	0.0303	8007 ± 1470	0.0626
0 - 120	18704 ± 4248	8125 ± 1314*	0.0331	9601 ± 2391	0.0694

Todos los valores son presentados como medias ± error estándar, n=8. Las significancias estadísticas en la concentración de iAUC de glucosa postprandial fueron evaluados por ANOVA de una vía y comparación múltiple, *post hoc* (Dunnet-test). \*P<0.05. <sup>1</sup>Es la comparación 0 mg vs 6 mg y <sup>2</sup>0 mg vs 12 mg.

Mientras que el grupo de ratones con dieta alta en grasas que recibieron la dosis de 24 mg de EFRP no mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo control, sin embargo, se observa una tendencia a la disminución en los rangos de tiempo de 0 – 90, y 0 - 120 (P = 0.06) (**Tabla 12**).

La ausencia de respuesta por parte del EFRP sobre la glucosa postprandial en ratones que fueron alimentados con dieta baja en grasas puede deberse a la falta de desarrollo de resistencia a la insulina que aparentemente estaría presente en ratones alimentados con dieta alta en grasas, por lo que podemos suponer que el efecto del EFRP va dirigido sobre mecanismos involucrados en la mejora de la sensibilidad a la insulina. Posiblemente, el mecanismo involucrado en la disminución de la glucosa postprandial por parte del EFRP sobre ratones con dieta alta en grasas no va dirigido sobre la inhibición de los transportadores de glucosa SGLT1 y GLUT2 debido a que no se mostraron cambios en las concentraciones de glucosa postprandial en las dosis de 18 y 24 mg de EFRP en los grupos BG, lo que pueden indicar que el extracto no ejerce los efectos a nivel de absorción intestinal, y debido a que se usó como fuente de carbohidratos glucosa libre, se descarta el efecto inhibitorio del EFRP sobre las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Sin embargo otros mecanismos tales, como la reducción de demanda de insulina a través del mejoramiento de la sensibilidad a la insulina se han visto en estudios de suplementación con fresas o extractos de fresa en humanos con obesidad (Paquette et al., 2017, Park et al., 2016). Un estudio en ratones con obesidad demostró que el mejoramiento en la sensibilidad a la insulina está relacionado con la inflamación característica durante la obesidad, resistencia a la insulina, y DT2 (Daveri et al., 2018). Los ratones estuvieron con alimentación alta en grasas y con suplementación de antocianinas, el grupo control que no recibió las antocianinas incrementó el depósito de lípidos en el hígado y desarrolló inflamación a través de mecanismos de señales sensibles al estrés oxidativo IKK/NF- $\kappa$ B y JNK1/2, originados por superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Daveri et al., 2018). Ambas señales son inhibidores de las vías de señalización de la insulina. Por otra parte, los ratones que recibieron las antocianinas mostraron una expresión disminuida de las proteínas involucradas en la resistencia a la insulina, mientras que claramente mejoró la sensibilidad de la insulina

a través de una prueba de tolerancia a la insulina (Daveri et al., 2018). Además, se ha demostrado que las antocianinas pueden contribuir en la mejora de las desregulaciones del tejido adiposo provocado por el incremento de tamaño y que está asociado con inflamación crónica de bajo grado que conduce a la resistencia a la insulina. Un estudio *in vitro* en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 se demostró que las antocianinas inhibían el crecimiento inducido por ácido palmítico y, a su vez, promovió la disminución de factor de transcripción PPAR $\gamma$ , involucrado en la activación de vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Tales efectos provocaron el retorno de la señalización de la insulina y aumento de la expresión de GLUT1 (Muscara et al., 2019).

## **Extracto de fresa rico en polifenoles**

### **Fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante**

La determinación cuantitativa de fenoles totales llevado a cabo por el método Folin-Ciocalteu, arrojó un contenido estimado de 36.84 mg EqAG por gramo de EFRP, lo que permite conocer el contenido estimado de polifenoles totales administrados en las dosis de ambos estudios. Las dosis de 6, 12, 18 y 24 mg de EFRP administradas en los ratones de los estudios 1 y 2 proporcionaron: 0.22, 0.44, 0.66 y 0.88 polifenoles totales (estimados como mg EqAG), respectivamente. Mientras que el contenido estimado de flavonoides totales fue de 16.10 mg/g de EFRP (estimado como mg EqCatequina). Con este valor se calculó el aporte de flavonoides totales en las dosis de ambos estudios, correspondiendo a 0.09, 0.18, 0.27 y 0.36 mg de flavonoides totales en las dosis de 6, 12, 18 y 24 mg, respectivamente. En todos los análisis del extracto de fresa rico en polifenoles se encontraron contenidos de fenoles totales y flavonoides similares a los publicados en otros estudios de la misma variedad de fresa (*Nerina*) (Fredericks et al., 2013). Asimismo, la variedad *nerina* proporciona mayor cantidad de fenoles totales que la variedad *Fragaria x ananassa* por gramo de extracto, 22.85 – 27.51 mg/g de peso seco (Panico et al., 2009). La palabra Nerina viene de la palabra italiana “nero” que significa negro e “ina” que es usado como diminutivo, por lo que la fresa Nerina como su nombre lo dice, es una fresa “negrita” o bien de un tono rojo

oscuro, lo que justifica el alto contenido de flavonoides del tipo antocianinas, que son los compuestos responsables de la coloración de las fresas.

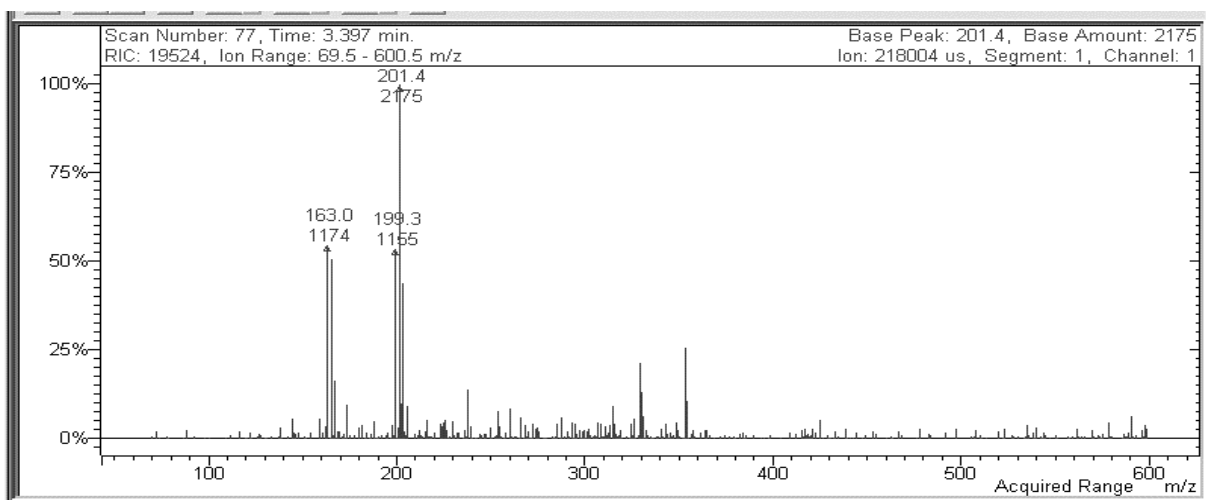
En cuanto a la capacidad antioxidante del EFRP, los resultados muestran que una o capacidad de inhibición del radical ABTS $\cdot+$  de  $30,869 \pm 5169 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ . Mientras que la actividad de estabilización del DPPH $\cdot$  fue de  $24,096 \pm 427 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ . Un estudio reportó que las fresas *fragaria x ananassa* tenían una capacidad antioxidante de ABTS $\cdot+$   $23,010 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$  peso seco, mientras que la fresa *nerina* desarrolló una actividad antioxidante de  $30,869 \pm 5169 \mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$  (Olsson et al., 2004). La coloración característica de la fresa Nerina también podría ser la razón por la que la capacidad antioxidante por ABTS $\cdot+$  del EFRP fue más elevada que la de las fresas de la variedad *fragaria x ananassa*.

## Determinación de polifenoles en plasma

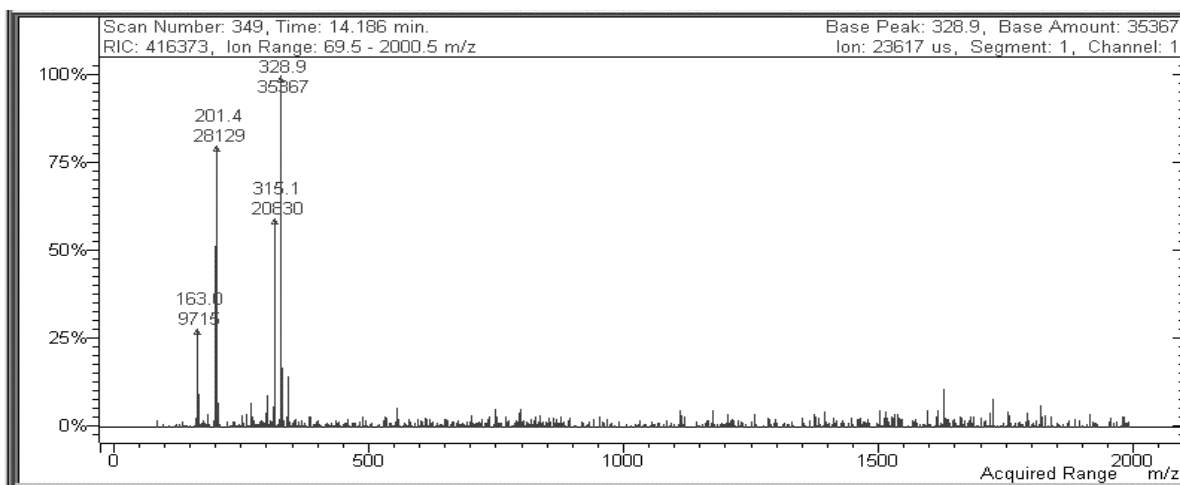
### Identificación de metabolitos presentes el plasma

Se detectaron dos señales en el análisis HPLC/DAD los cuales fueron vinculados con un ácido fenólico y un flavonoide debido a sus longitudes de onda. Las señales obtenidas a través del análisis ESI-MS-QTOF se usaron para determinar los posibles fenoles biodisponibles en plasma de ratón. La señal más alta la originó el ion con peso molecular  $201.4 \text{ g/mol}$ , mismo que no se pudo vincular con ninguna estructura fenólica, sin embargo, cuando esta se fragmentó, se originaron los iones hijos  $163 \text{ g/mol}$  y  $165 \text{ g/mol}$ , mismos que ya aparecían y que se muestran en la **Figura 18 A**. Ambos iones se vincularon al ácido sinápico y al ácido p-cumárico. Las estructuras químicas del ácido sinápico y ácido p-cumárico se diferencian entre sí, por dos grupos hidroxilos y el posicionamiento de dobles enlaces en el anillo aromático. Cabe destacar que el extracto de fresa contiene ácido p-cumárico en su composición. Por otro lado, se logró identificar una estructura perteneciente al grupo de los flavonoides con peso molecular  $315 \text{ g/mol}$ . A pesar de que el ion  $315 \text{ g/mol}$  es compartido por muchas estructuras fenólicas (p. ej. Isorhamnetina, isorhamnetina 3-O-glucósido, siringetina y, siringetina 3-glucósido), sólo la isorhamnetina-3-O-glucósido está presente en la fresa. Otra estructura vinculada, es la siringetina-3-O-glucósido con el ion  $329 \text{ g/mol}$ .

A)



B)



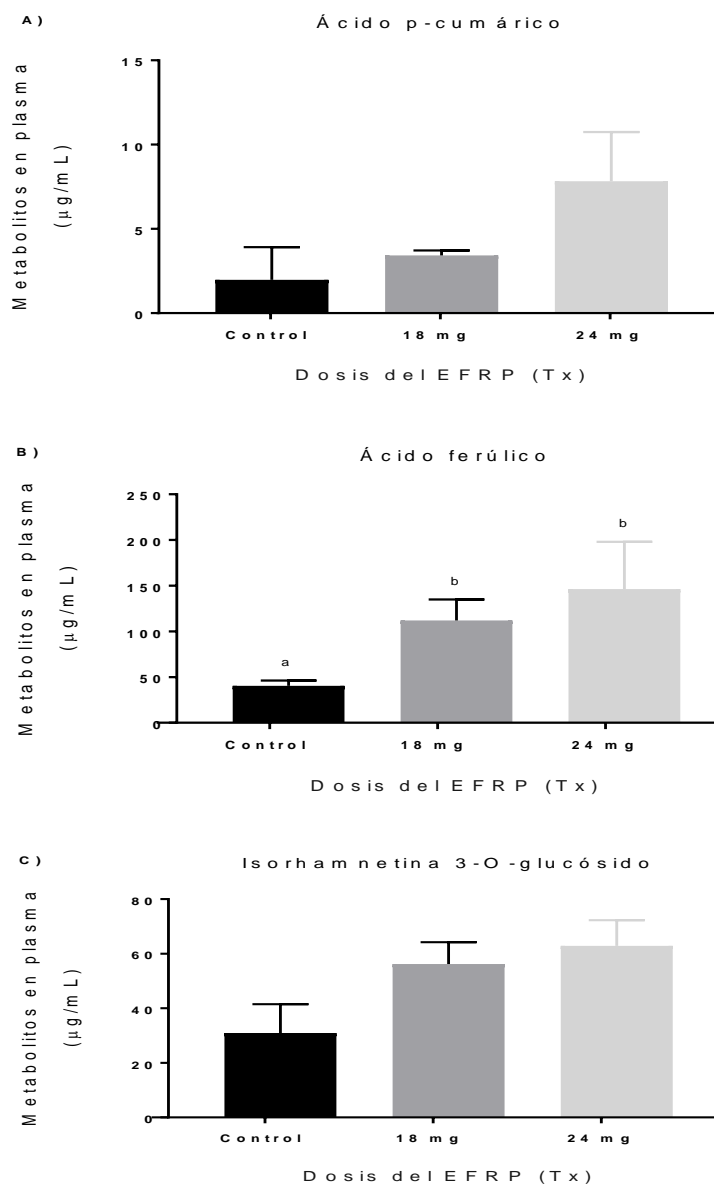
**Figura 18.** Metabolitos identificados en plasma de ratones alimentados con dieta alta en grasa y tratados con 0, 18 y 24 mg de EFRP. **A)** Los ácidos sinápico o p-cumárico y **B)** el flavonoide isorhamnetina-3-glucósido fueron identificados en el análisis ESI-TOF-MS.

Aunque cuando se fragmentaron, ambos iones 315 y 329 dieron lugar a un mismo ion hijo 168 g/mol (**Figura 18 B**). Esto puede ser entendible dado que la isorhamnetina-3-O-glucósido y la siringetina-3-O-glucósido poseen una estructura similar, diferenciándose únicamente por un grupo hidroxilo, posible resultado del metabolismo de fase I en los enterocitos (hidroxilación) (Perez-Jimenez et al., 2010).

### **Cuantificación de metabolitos presentes en plasma**

Para explorar los posibles mecanismos responsables de la disminución de glucosa postprandial en ratones AG del estudio 2, se evaluó la biodisponibilidad de metabolitos de flavonoides, especialmente antocianinas, procedentes del EFRP. Se observaron concentraciones mayores de ácido ferúlico en el plasma de los ratones tratados con 18 y 24 mg del EFRP, comparados con el control (0 mg) ( $P = 0.0132$ ). El ácido p-cumárico y la isorhamnetina se observaron en concentraciones más elevadas en el plasma de los ratones tratados 18 y 24 mg de EFRP, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P = 0.1851$  y  $P = 0.1965$ , respectivamente) (**Figura 19**). Los compuestos pelargonidina 3-glucósido e luteolin 6- glucósido no se detectaron en el plasma. Otros estudios han demostrado, en estudios clínicos, que el ácido ferúlico se encuentra aumentado en plasma, después de 2 h del consumo de 24 g de fresas (Sandhu et al., 2018). Además existen otros precursores del ácido ferúlico, tales como el ácido protocatecuico, el cual es uno de los principales metabolitos derivados de las antocianinas (Chistiakov et al., 2015) y uno de los principales ácidos fenólicos biodisponible a partir de la administración de fresas en humanos (Azzini et al., 2010). En cuanto a los posibles efectos del ácido ferúlico en la reducción de la glucosa postprandial, otros estudios han mostrado que la administración/consumo de 50 mg/kg de peso corporal posee la capacidad de reducir la glucosa postprandial, hemoglobina glucosilada, y aumentar los niveles de insulina en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina y que los posibles mecanismos incluyen la modulación de productos finales de glicación avanzada, disminución de sustancias prooxidantes, y disminución de citocinas proinflamatorias (Chowdhury et al., 2019).





**Figura 19.** Metabolitos cuantificados en plasma de ratones alimentados con dieta alta en grasa y tratados con 0, 18 y 24 mg de EFRP. **A)** Concentración de ácido p-cumárico en plasma. **B)** Concentración de ácido ferúlico en plasma. **C)** Concentración de isorhamnetina 3-O-glucósido. Los datos son presentados como medianas y rango intercuartil RIQ (Percentil 25 – Percetil 75) (n = 4). Diferentes literales indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre grupos tratamiento comparado con grupo control (0 mg). Los datos fueron analizados usando la prueba Kruskal-Wallis, post hoc Dunn.

El extracto de fresa rico en polifenoles, previamente caracterizado por el fabricante, permitió conocer desde el inicio del proyecto de investigación el contenido de antocianinas, así como algunos otros componentes fenólicos, la capacidad de solubilización en agua y el contenido nutrimental. Cabe destacar que la variedad *Nerina* del extracto de fresa utilizada en los bioensayos poseía mayor contenido de fenoles totales que otras variedades como *Fragaria x ananassa*. Las dosis del extracto de fresa utilizados en los bioensayos: 6, 12, 18 y 24 mg se encuentran dentro de cantidades fisiológicas para su uso en estudios clínicos, por lo que no se deberá descartar la extrapolación de las dosis para la realización de ensayos clínicos en humanos. Brevemente, sí extrapolamos la dosis más baja del extracto de fresa que demostró efectos hipoglucemiantes en los ratones (18 mg) a dosis en humanos, una persona promedio de 60 kg, necesitará una dosis estimada de 254 mg para simular la dosis administrada en los ratones sin desencadenar efectos adversos (Nair & Jacob, 2016). Los resultados presentados anteriormente resaltan los posibles efectos de las antocianinas sobre la respuesta hipoglucemiante, comprobado a través de la biodisponibilidad de metabolitos de las antocianinas del extracto de fresa presentes en plasma de ratón. No obstante, no podemos descartar el posible efecto aditivo o sinérgico con otros compuestos del extracto, tal como otros flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas o fibra presentes en el extracto de fresa. Finalmente, este estudio pre-clínico elaborado para demostrar los efectos de un extracto de fresa sobre la glucosa postprandial en ratones con condiciones propicias para desarrollar alteración en el metabolismo de la glucosa o en condiciones normales, servirá como antecedente para estudios clínicos posteriores dirigidos a coadyuvar en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

## CONCLUSIONES

- La administración de 12 mg del extracto de fresa rico en polifenoles mostró una tendencia hacia la disminución de la glucosa postprandial, en los primeros 30 min de la PTOG, en ratones expuestos a dieta alta en grasa.
- La administración de 6 y 12 mg del EFRP no provocó cambios en los niveles de insulina sérica postprandial.
- La administración de 18 y 24 mg del EFRP disminuyó la glucemia postprandial y la concentración máxima de glucosa (pico postprandial) en ratones expuestos a dieta alta en grasa.
- El contenido de compuestos fenólicos del extracto de fresa de la variedad *nerina* fue mayor que contenido de variedades; como *Fragaria x ananassa* reportada en estudios previos.
- Metabolitos de polifenoles del EFRP fueron encontrados en concentraciones considerablemente mayores en ratones que recibieron la dieta alta en grasa y las dosis de 18 y 24 mg comparados con el grupo control que recibió la dieta alta en grasa y la solución vehículo (0 mg).
- Investigaciones con mayor profundidad son necesarios para elucidar posibles mecanismos involucrados en la reducción de la glucosa postprandial.

## **RECOMENDACIONES**

Se proponen realizar estudios que ayuden a elucidar los posibles mecanismos involucrados en la disminución de la concentración de glucosa postprandial tales como, ensayos celulares para analizar el efecto del extracto sobre los transportadores de glucosa o el posible efecto incretina en células del intestino delgado. También ensayos enzimáticos para evaluar el efecto inhibitorio de los componentes del extracto sobre enzimas amilasas y glucosidasas. Además de realizar estudios en modelos animales que empleen como carga de glucosa, otras fuentes de carbohidratos con mayor similitud a una dieta común, tal como el almidón, y de esta manera analizar posibles efectos inhibitorios sobre enzimas digestivas involucradas en el desdoblamiento de carbohidratos. También, optar por utilizar un extracto purificado de antocianinas de fresa Nerina para eliminar efectos de otros componentes como fibra, vitamina C y demás componentes presentes en el extracto de fresa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKARACHIYASIT, S., YIBCHOK-ANUN, S., WACHARASINDHU, S. & ADISAKWATTANA, S. 2011. In vitro inhibitory effects of cyanidin-3-rutinoside on pancreatic alpha-amylase and its combined effect with acarbose. *Molecules*, 16, 2075-83.
- ALLISON, D. B., PAULTRE, F., MAGGIO, C., MEZZITIS, N. & PI-SUNYER, F. X. 1995. The use of areas under curves in diabetes research. *Diabetes Care*, 18, 245-50.
- AMERICAN DIABETES, A. 2018. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, 41, S13-S27.
- ANHÊ, F. F., ROY, D., PILON, G., DUDONNÉ, S., MATAMOROS, S., VARIN, T. V., GAROFALO, C., MOINE, Q., DESJARDINS, Y., LEVY, E. & MARETTE, A. 2015. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, 64, 872-83.
- AUNE, D., NORAT, T., LEITZMANN, M., TONSTAD, S. & VATTEN, L. J. 2015. Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*, 30, 529-42.
- AZZINI, E., VITAGLIONE, P., INTORRE, F., NAPOLITANO, A., DURAZZO, A., FODDAI, M. S., FUMAGALLI, A., CATASTA, G., ROSSI, L., VENNERIA, E., RAGUZZINI, A., PALOMBA, L., FOGLIANO, V. & MAIANI, G. 2010. Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. *Br J Nutr*, 104, 1165-73.
- BARCLAY, A. W., PETOCZ, P., MCMILLAN-PRICE, J., FLOOD, V. M., PRVAN, T., MITCHELL, P. & BRAND-MILLER, J. C. 2008. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk--a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr*, 87, 627-37.
- BASTIANETTO, S., MENARD, C. & QUIRION, R. 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*, 1852, 1195-201.
- BASU, A., WILKINSON, M., PENUGONDA, K., SIMMONS, B., BETTS, N. M. & LYONS, T. J. 2009. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J*, 8, 43.
- BELWAL, T., NABAVI, S. F., NABAVI, S. M. & HABTEMARIAM, S. 2017. Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine. *Nutrients*, 9.
- BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D. B., WASSWA-KINTU, S. I. & HOLDEN, J. M. 2013. USDA Develops a Database for Flavonoids to Assess Dietary Intakes. *Procedia Food Science*, 2, 81-86.
- BIRCSAK, K. M. & ALEKSUNES, L. M. 2015. Interaction of Isoflavones with the BCRP/ABCG2 Drug Transporter. *Curr Drug Metab*, 16, 124-40.
- BLAAK, E. E., ANTOINE, J. M., BENTON, D., BJORCK, I., BOZZETTO, L., BROUNS, F., DIAMANT, M., DYE, L., HULSHOF, T., HOLST, J. J., LAMPORT, D. J., LAVILLE, M., LAWTON, C. L., MEHEUST, A., NILSON, A., NORMAND, S., RIVELLESE, A. A., THEIS, S., TOREKOV, S. S. & VINOY, S. 2012. Impact of

- postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes Rev*, 13, 923-84.
- BLÜHER, M. 2009. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 117, 241-50.
- BODEN, G. 1996. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care*, 19, 394-5.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. & BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56, 317-33.
- BUCHWALD, H., ESTOK, R., FAHRBACH, K., BANEL, D., JENSEN, M. D., PORIES, W. J., BANTLE, J. P. & SLEDGE, I. 2009. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*, 122, 248-256.e5.
- BURCELIN, R., CRIVELLI, V., DACOSTA, A., ROY-TIRELLI, A. & THORENS, B. 2002. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E834-42.
- CASSIDY, A. 2018. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Mol Aspects Med*, 61, 76-82.
- CASSIDY, A., MUKAMAL, K. J., LIU, L., FRANZ, M., ELIASSEN, A. H. & RIMM, E. B. 2013. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation*, 127, 188-196.
- CASSIDY, A., O'REILLY, E. J., KAY, C., SAMPSON, L., FRANZ, M., FORMAN, J. P., CURHAN, G. & RIMM, E. B. 2011. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr*, 93, 338-47.
- CASTRO-ACOSTA, M. L., LENIHAN-GEELS, G. N., CORPE, C. P. & HALL, W. L. 2016a. Berries and anthocyanins: promising functional food ingredients with postprandial glycaemia-lowering effects. *Proc Nutr Soc*, 75, 342-55.
- CASTRO-ACOSTA, M. L., SMITH, L., MILLER, R. J., MCCARTHY, D. I., FARRIMOND, J. A. & HALL, W. L. 2016b. Drinks containing anthocyanin-rich blackcurrant extract decrease postprandial blood glucose, insulin and incretin concentrations. *J Nutr Biochem*, 38, 154-161.
- CASTRO-ACOSTA, M. L., STONE, S. G., MOK, J. E., MHAJAN, R. K., FU, C. I., LENIHAN-GEELS, G. N., CORPE, C. P. & HALL, W. L. 2017. Apple and blackcurrant polyphenol-rich drinks decrease postprandial glucose, insulin and incretin response to a high-carbohydrate meal in healthy men and women. *J Nutr Biochem*, 49, 53-62.
- COLLABORATORS, G. B. D. R. F. 2017. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*, 390, 1345-1422.
- CORREIA-DA-SILVA, M., SOUSA, E. & PINTO, M. M. 2014. Emerging sulfated flavonoids and other polyphenols as drugs: nature as an inspiration. *Med Res Rev*, 34, 223-79.

- CURTIS, P. J., VAN DER VELPEN, V., BERENDS, L., JENNINGS, A., FEELISCH, M., UMPLEBY, A. M., EVANS, M., FERNANDEZ, B. O., MEISS, M. S., MINNION, M., POTTER, J., MINIHANE, A. M., KAY, C. D., RIMM, E. B. & CASSIDY, A. 2019. Blueberries improve biomarkers of cardiometabolic function in participants with metabolic syndrome-results from a 6-month, double-blind, randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 109, 1535-1545.
- CZANK, C., CASSIDY, A., ZHANG, Q., MORRISON, D. J., PRESTON, T., KROON, P. A., BOTTING, N. P. & KAY, C. D. 2013. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *Am J Clin Nutr*, 97, 995-1003.
- CHISTIYAKOV, D. A., BOBRYSHV, Y. V., KOZAROV, E., SOBENIN, I. A. & OREKHOV, A. N. 2015. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. *Front Microbiol*, 6, 671.
- CHOI, K. H., LEE, H. A., PARK, M. H. & HAN, J. S. 2016. Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit Extract Containing Anthocyanins Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic C57BL/Ksj-db/db Mice. *J Med Food*, 19, 737-45.
- CHOWDHURY, S., GHOSH, S., DAS, A. K. & SIL, P. C. 2019. Ferulic Acid Protects Hyperglycemia-Induced Kidney Damage by Regulating Oxidative Insult, Inflammation and Autophagy. *Front Pharmacol*, 10, 27.
- CHUANG, C. C., SHEN, W., CHEN, H., XIE, G., JIA, W., CHUNG, S. & MCINTOSH, M. K. 2012. Differential effects of grape powder and its extract on glucose tolerance and chronic inflammation in high-fat-fed obese mice. *J Agric Food Chem*, 60, 12458-68.
- CHUN, O. K., CHUNG, S. J. & SONG, W. O. 2007. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr*, 137, 1244-52.
- CHUN, O. K., FLOEGEL, A., CHUNG, S. J., CHUNG, C. E., SONG, W. O. & KOO, S. I. 2010. Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in U.S. adults. *J Nutr*, 140, 317-24.
- DANDONA, P., ALJADA, A. & BANDYOPADHYAY, A. 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*, 25, 4-7.
- DAVERI, E., CREMONINI, E., MASTALLOUDIS, A., HESTER, S. N., WOOD, S. M., WATERHOUSE, A. L., ANDERSON, M., FRAGA, C. G. & OTEIZA, P. I. 2018. Cyanidin and delphinidin modulate inflammation and altered redox signaling improving insulin resistance in high fat-fed mice. *Redox Biol*, 18, 16-24.
- DE FERRARS, R. M., CASSIDY, A., CURTIS, P. & KAY, C. D. 2014. Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Mol Nutr Food Res*, 58, 490-502.
- DE MUNTER, J. S., HU, F. B., SPIEGELMAN, D., FRANZ, M. & VAN DAM, R. M. 2007. Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med*, 4, e261.
- DE PASCUAL-TERESA, S. & SANCHEZ-BALLESTA, M. T. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 281-299.
- DEFRONZO, R. A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*, 88, 787-835, ix.

- DING, M., FRANKE, A. A., ROSNER, B. A., GIOVANNUCCI, E., VAN DAM, R. M., TWOROGGER, S. S., HU, F. B. & SUN, Q. 2015. Urinary isoflavonoids and risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in US women. *Br J Nutr*, 114, 1694-701.
- DOF, D. O. D. L. N. 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus* [Online]. Available: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010) 2019].
- FARRELL, N. J., NORRIS, G. H., RYAN, J., PORTER, C. M., JIANG, C. & BLESSO, C. N. 2015. Black elderberry extract attenuates inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *Br J Nutr*, 114, 1123-31.
- FERNANDES, I., DE FREITAS, V., REIS, C. & MATEUS, N. 2012. A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food Funct*, 3, 508-16.
- FERNANDES, I., FARIA, A., CALHAU, C., DE FREITAS, V. & MATEUS, N. 2014. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.
- FINK, B. N., STECK, S. E., WOLFF, M. S., BRITTON, J. A., KABAT, G. C., GAUDET, M. M., ABRAHAMSON, P. E., BELL, P., SCHROEDER, J. C. & TEITELBAUM, S. L. 2007. Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on Long Island. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16, 2285-2292.
- FLESCHHUT, J., KRATZER, F., RECHKEMMER, G. & KULLING, S. E. 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr*, 45, 7-18.
- FRANZ, M. J., BOUCHER, J. L., RUTTEN-RAMOS, S. & VANWORMER, J. J. 2015. Lifestyle weight-loss intervention outcomes in overweight and obese adults with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Acad Nutr Diet*, 115, 1447-63.
- FREDERICKS, C. H., FANNING, K. J., GIDLEY, M. J., NETZEL, G., ZABARAS, D., HERRINGTON, M. & NETZEL, M. 2013. High-anthocyanin strawberries through cultivar selection. *J Sci Food Agric*, 93, 846-52.
- GALVAN-PORTILLO, M. V., WOLFF, M. S., TORRES-SANCHEZ, L. E., LOPEZ-CERVANTES, M. & LOPEZ-CARRILLO, L. 2007. Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women. *Salud Publica Mex*, 49, 126-31.
- GANNON, M. C., NUTTALL, F. Q., WESTPHAL, S. A., FANG, S. & ERCAN-FANG, N. 1998. Acute metabolic response to high-carbohydrate, high-starch meals compared with moderate-carbohydrate, low-starch meals in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 21, 1619-26.
- GONZALEZ, S., FERNANDEZ, M., CUERVO, A. & LASHERAS, C. 2014. Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population. *J Hum Nutr Diet*, 27, 176-83.
- GROSSO, G., STEPANIAK, U., MICEK, A., STEFLER, D., BOBAK, M. & PAJAK, A. 2017. Dietary polyphenols are inversely associated with metabolic syndrome in Polish adults of the HAPIEE study. *Eur J Nutr*, 56, 1409-1420.
- GUAL, P., LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. & TANTI, J. F. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87, 99-109.



- GUO, H., XIA, M., ZOU, T., LING, W., ZHONG, R. & ZHANG, W. 2012. Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *J Nutr Biochem*, 23, 349-60.
- GUO, X., YANG, B., TAN, J., JIANG, J. & LI, D. 2016. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*, 70, 1360-1367.
- HAASE, J., WEYER, U., IMMIG, K., KLÖTING, N., BLÜHER, M., EILERS, J., BECHMANN, I. & GERICKE, M. 2014. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia*, 57, 562-71.
- HAUFE, T. C., GILLEY, A. D., GOODRICH, K. M., RYAN, C. M., SMITHSON, A. T., HULVER, M. W., LIU, D. & NEILSON, A. P. 2016. Grape powder attenuates the negative effects of GLP-1 receptor antagonism by exendin-3 (9-39) in a normoglycemic mouse model. *Food Funct*, 7, 2692-705.
- HENQUIN, J. C., ISHIYAMA, N., NENQUIN, M., RAVIER, M. A. & JONAS, J. C. 2002. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S60-7.
- HERNANDEZ-RAMIREZ, R. U., GALVAN-PORTILLO, M. V., WARD, M. H., AGUDO, A., GONZALEZ, C. A., ONATE-OCANA, L. F., HERRERA-GOEPFERT, R., PALMA-COCA, O. & LOPEZ-CARRILLO, L. 2009. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *Int J Cancer*, 125, 1424-30.
- HIDALGO, J., TEUBER, S., MORERA, F. J., OJEDA, C., FLORES, C. A., HIDALGO, M. A., NUNEZ, L., VILLALOBOS, C. & BURGOS, R. A. 2017. Delphinidin Reduces Glucose Uptake in Mice Jejunal Tissue and Human Intestinal Cells Lines through FFA1/GPR40. *Int J Mol Sci*, 18.
- HOLMAN, N., YOUNG, B. & GADSBY, R. 2015. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med*, 32, 1119-20.
- HONG, S. H., HEO, J. I., KIM, J. H., KWON, S. O., YEO, K. M., BAKOWSKA-BARCZAK, A. M., KOLODZIEJCZYK, P., RYU, O. H., CHOI, M. K., KANG, Y. H., LIM, S. S., SUH, H. W., HUH, S. O. & LEE, J. Y. 2013. Antidiabetic and Beta cell-protection activities of purple corn anthocyanins. *Biomol Ther (Seoul)*, 21, 284-9.
- HOOPER, L., KROON, P. A., RIMM, E. B., COHN, J. S., HARVEY, I., LE CORNU, K. A., RYDER, J. J., HALL, W. L. & CASSIDY, A. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 88, 38-50.
- IDF 2017. Diabetes Atlas de la FID.
- IMAMURA, F., CONNOR, L., YE, Z., MURSU, J., HAYASHINO, Y., BHUPATHIRAJU, S. N. & FOROUHI, N. G. 2016. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *British Journal of Sports Medicine*, 50, 496.

- IVEY, K. L., JENSEN, M. K., HODGSON, J. M., ELIASSEN, A. H., CASSIDY, A. & RIMM, E. B. 2017. Association of flavonoid-rich foods and flavonoids with risk of all-cause mortality. *Br J Nutr*, 117, 1470-1477.
- JACQUES, P. F., CASSIDY, A., ROGERS, G., PETERSON, J. J., MEIGS, J. B. & DWYER, J. T. 2013. Higher dietary flavonol intake is associated with lower incidence of type 2 diabetes. *J Nutr*, 143, 1474-80.
- JAROSLAWSKA, J., JUSKIEWICZ, J., WROBLEWSKA, M., JURGONSKI, A., KROL, B. & ZDUNCZYK, Z. 2011. Polyphenol-rich strawberry pomace reduces serum and liver lipids and alters gastrointestinal metabolite formation in fructose-fed rats. *J Nutr*, 141, 1777-83.
- JAYAPRAKASAM, B., OLSON, L. K., SCHUTZKI, R. E., TAI, M. H. & NAIR, M. G. 2006. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *J Agric Food Chem*, 54, 243-8.
- JENKINS, D. J., WOLEVER, T. M., TAYLOR, R. H., BARKER, H., FIELDEN, H., BALDWIN, J. M., BOWLING, A. C., NEWMAN, H. C., JENKINS, A. L. & GOFF, D. V. 1981. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*, 34, 362-6.
- JENNINGS, A., WELCH, A. A., SPECTOR, T., MACGREGOR, A. & CASSIDY, A. 2014. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. *The Journal of nutrition*, 144, 202-208.
- JIA, X., CHEN, J., LIN, H. & HU, M. 2004. Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates. *J Pharmacol Exp Ther*, 310, 1103-13.
- KERN, P. A., RANGANATHAN, S., LI, C., WOOD, L. & RANGANATHAN, G. 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E745-51.
- KIM, Y., KEOGH, J. B. & CLIFTON, P. M. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8.
- KNEKT, P., KUMPULAINEN, J., JARVINEN, R., RISSANEN, H., HELIOVAARA, M., REUNANEN, A., HAKULINEN, T. & AROMAA, A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, 76, 560-8.
- KNOWLER, W. C., BARRETT-CONNOR, E., FOWLER, S. E., HAMMAN, R. F., LACHIN, J. M., WALKER, E. A. & NATHAN, D. M. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, 346, 393-403.
- KRGA, I. & MILENKOVIC, D. 2019. Anthocyanins: From Sources and Bioavailability to Cardiovascular-Health Benefits and Molecular Mechanisms of Action. *J Agric Food Chem*, 67, 1771-1783.
- KRGA, I., VIDOVIC, N., MILENKOVIC, D., KONIC-RISTIC, A., STOJANOVIC, F., MORAND, C. & GLIBETIC, M. 2018. Effects of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils. *Arch Biochem Biophys*, 645, 34-41.

- LEE, J. S., KIM, Y. R., PARK, J. M., KIM, Y. E., BAEK, N. I. & HONG, E. K. 2015. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruits protects pancreatic beta-cells against glucotoxicity-induced apoptosis. *Mol Med Rep*, 11, 2723-8.
- LI, A.-N., LI, S., ZHANG, Y.-J., XU, X.-R., CHEN, Y.-M. & LI, H.-B. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020-6047.
- LI, J., KANG, M. K., KIM, J. K., KIM, J. L., KANG, S. W., LIM, S. S. & KANG, Y. H. 2012. Purple corn anthocyanins retard diabetes-associated glomerulosclerosis in mesangial cells and db/db mice. *Eur J Nutr*, 51, 961-73.
- LILA, M. A., BURTON-FREEMAN, B., GRACE, M. & KALT, W. 2016. Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annu Rev Food Sci Technol*, 7, 375-93.
- LIN, C. S., KIMOKOTI, R. W., BROWN, L. S., KAYE, E. A., NUNN, M. E. & MILLEN, B. E. 2012. Methodology for adding glycemic index to the National Health and Nutrition Examination Survey nutrient database. *J Acad Nutr Diet*, 112, 1843-51.
- MADDUMA HEWAGE, S., PRASHAR, S., DEBNATH, S. C., O, K. & SLOW, Y. L. 2020. Inhibition of Inflammatory Cytokine Expression Prevents High-Fat Diet-Induced Kidney Injury: Role of Lingonberry Supplementation. *Front Med (Lausanne)*, 7, 80.
- MALIK, V. S., POPKIN, B. M., BRAY, G. A., DESPRES, J. P. & HU, F. B. 2010. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*, 121, 1356-64.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C. & JIMENEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727-47.
- MARETTE, A. 2002. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 377-83.
- MARRANZANO, M., RAY, S., GODOS, J. & GALVANO, F. 2018. Association between dietary flavonoids intake and obesity in a cohort of adults living in the Mediterranean area. *Int J Food Sci Nutr*, 69, 1020-1029.
- MCGHIE, T. K. & WALTON, M. C. 2007. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res*, 51, 702-13.
- MEDINA-REMON, A., CASAS, R., TRESSSERRA-RIMBAU, A., ROS, E., MARTINEZ-GONZALEZ, M. A., FITO, M., CORELLA, D., SALAS-SALVADO, J., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. & ESTRUCH, R. 2017. Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *Br J Clin Pharmacol*, 83, 114-128.
- MEDINA-REMON, A., TRESSERRA-RIMBAU, A., PONS, A., TUR, J. A., MARTORELL, M., ROS, E., BUIL-COSIALES, P., SACANELLA, E., COVAS, M. I., CORELLA, D., SALAS-SALVADO, J., GOMEZ-GRACIA, E., RUIZ-GUTIERREZ, V., ORTEGA-CALVO, M., GARCIA-VALDUEZA, M., AROS, F., SAEZ, G. T., SERRA-MAJEM, L., PINTO, X., VINYOLES, E., ESTRUCH, R. & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. 2015. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 25, 60-7.
- MENDONCA, R. D., CARVALHO, N. C., MARTIN-MORENO, J. M., PIMENTA, A. M., LOPES, A. C. S., GEA, A., MARTINEZ-GONZALEZ, M. A. & BES-RASTROLLO,

- M. 2019. Total polyphenol intake, polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease: The SUN cohort study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 29, 69-78.
- MIRANDA, A. M., STELUTI, J., FISBERG, R. M. & MARCHIONI, D. M. 2016. Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of Sao Paulo: a population-based study. *Br J Nutr*, 115, 1061-70.
- MURAKI, I., IMAMURA, F., MANSON, J. E., HU, F. B., WILLETT, W. C., VAN DAM, R. M. & SUN, Q. 2013. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *BMJ*, 347, f5001.
- MURSU, J., VIRTANEN, J. K., TUOMAINEN, T. P., NURMI, T. & VOUTILAINEN, S. 2014. Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr*, 99, 328-33.
- MUSCARA, C., MOLONIA, M. S., SPECIALE, A., BASHLLARI, R., CIMINO, F., OCCHIUTO, C., SAIJA, A. & CRISTANI, M. 2019. Anthocyanins ameliorate palmitate-induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res*, 33, 1888-1897.
- NAGY, C. & EINWALLNER, E. 2018. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). *J Vis Exp*.
- NAIR, A. B. & JACOB, S. 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*, 7, 27-31.
- NASCIMENTO-SOUZA, M. A., DE PAIVA, P. G., PEREZ-JIMENEZ, J., DO CARMO CASTRO FRANCESCHINI, S. & RIBEIRO, A. Q. 2018. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in elderly of Vicosa, Brazil: a population-based study. *Eur J Nutr*, 57, 617-627.
- OLSSON, M. E., EKVALL, J., GUSTAVSSON, K. E., NILSSON, J., PILLAI, D., SJÖHOLM, I., SVENSSON, U., AKESSON, B. & NYMAN, M. G. 2004. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem*, 52, 2490-8.
- OMDL, S. 2018. Informe mundial sobre la diabetes. *Dra. Margaret Chan Directora OMS*.
- OMS 2016. Global report on diabetes: World Health Organization. *Report No.: 9789241565257. WHO*.
- OMS, S. 2020. Obesity and overweight. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>.
- ORMAZABAL, V., NAIR, S., ELFEKY, O., AGUAYO, C. & SALOMON, C. 2018. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. 17, 122.
- PANICO, A., GARUFI, F., NITTO, S., MAURO, R., LONGHITANO, R. C., MAGRÌ, G., CATALFO, A., SERRENTINO, M. E. & DE GUIDI, G. 2009. Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharmaceutical Biology*, 47, 203-208.
- PAQUETTE, M., MEDINA LARQUE, A. S., WEISNAGEL, S. J., DESJARDINS, Y., MAROIS, J., PILON, G., DUDONNE, S., MARETTE, A. & JACQUES, H. 2017.

- Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *Br J Nutr*, 117, 519-531.
- PARELMAN, M. A., STORMS, D. H., KIRSCHKE, C. P., HUANG, L. & ZUNINO, S. J. 2012. Dietary strawberry powder reduces blood glucose concentrations in obese and lean C57BL/6 mice, and selectively lowers plasma C-reactive protein in lean mice. *Br J Nutr*, 108, 1789-99.
- PARK, E., EDIRISINGHE, I., WEI, H., VIJAYAKUMAR, L. P., BANASZEWSKI, K., CAPPOZZO, J. C. & BURTON-FREEMAN, B. 2016. A dose-response evaluation of freeze-dried strawberries independent of fiber content on metabolic indices in abdominally obese individuals with insulin resistance in a randomized, single-blinded, diet-controlled crossover trial. *Mol Nutr Food Res*, 60, 1099-109.
- PEREZ-JIMENEZ, J., NEVEU, V., VOS, F. & SCALBERT, A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem*, 58, 4959-69.
- PHOSAT, C., PANPRATHIP, P., CHUMPATHAT, N., PRANGTHIP, P., CHANTRATITA, N., SOONTHORNWORASIRI, N., PUDUANG, S. & KWANBUNJAN, K. 2017. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*, 17, 44.
- PRIOR, R. L., WU, X., GU, L., HAGER, T., HAGER, A., WILKES, S. & HOWARD, L. 2009. Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Mol Nutr Food Res*, 53, 1406-18.
- PRIOR, R. L., WU, X., GU, L., HAGER, T. J., HAGER, A. & HOWARD, L. R. 2008. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J Agric Food Chem*, 56, 647-53.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. & RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- ROJO, L. E., RIBNICKY, D., LOGENDRA, S., POULEV, A., ROJAS-SILVA, P., KUHN, P., DORN, R., GRACE, M. H., LILA, M. A. & RASKIN, I. 2012. In Vitro and in Vivo Anti-Diabetic Effects of Anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem*, 131, 387-396.
- ROOPCHAND, D. E., KUHN, P., ROJO, L. E., LILA, M. A. & RASKIN, I. 2013. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacol Res*, 68, 59-67.
- ROSSI, M. C., BASSETT, M. N. & SAMMAN, N. C. 2018. Dietary nutritional profile and phenolic compounds consumption in school children of highlands of Argentine Northwest. *Food Chem*, 238, 111-116.
- ROTHWELL, J. A., PEREZ-JIMENEZ, J., NEVEU, V., MEDINA-REMON, A., M'HIRI, N., GARCIA-LOBATO, P., MANACH, C., KNOX, C., EISNER, R., WISHART, D. S. & SCALBERT, A. 2013. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database (Oxford)*, 2013, bat070.

- ROY, M., SEN, S. & CHAKRABORTI, A. S. 2008. Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sci*, 82, 1102-10.
- RZEPECKA-STOJKO, A., STOJKO, J., KUREK-GORECKA, A., GORECKI, M., KABALA-DZIK, A., KUBINA, R., MOZDZIERZ, A. & BUSZMAN, E. 2015. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, 20, 21732-49.
- SAKAGUCHI, K., TAKEDA, K., MAEDA, M., OGAWA, W., SATO, T., OKADA, S., OHNISHI, Y., NAKAJIMA, H. & KASHIWAGI, A. 2016. Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. *Diabetol Int*, 7, 53-58.
- SALMERÓN, J., ASCHERIO, A., RIMM, E. B., COLDITZ, G. A., SPIEGELMAN, D., JENKINS, D. J., STAMPFER, M. J., WING, A. L. & WILLETT, W. C. 1997. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care*, 20, 545-50.
- SANDHU, A. K., MILLER, M. G., THANGTHAENG, N., SCOTT, T. M., SHUKITT-HALE, B., EDIRISINGHE, I. & BURTON-FREEMAN, B. 2018. Metabolic fate of strawberry polyphenols after chronic intake in healthy older adults. *Food Funct*, 9, 96-106.
- SCAZZOCCHIO, B., VARI, R., FILESI, C., D'ARCHIVIO, M., SANTANGELO, C., GIOVANNINI, C., IACOVELLI, A., SILECCHIA, G., LI VOLTI, G., GALVANO, F. & MASELLA, R. 2011. Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARgamma activity in human omental adipocytes. *Diabetes*, 60, 2234-44.
- SCHELL, J., BETTS, N. M., FOSTER, M., SCOFIELD, R. H. & BASU, A. 2017. Cranberries improve postprandial glucose excursions in type 2 diabetes. *Food Funct*, 8, 3083-3090.
- SCHULZE, C., BANGERT, A., KOTTRA, G., GEILLINGER, K. E., SCHWANCK, B., VOLLERT, H., BLASCHEK, W. & DANIEL, H. 2014. Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. *Mol Nutr Food Res*, 58, 1795-808.
- SEURING, T., ARCHANGELIDI, O. & SUHRCKE, M. 2015. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. *Pharmacoeconomics*, 33, 811-31.
- SHAH, A. D., LANGENBERG, C., RAPSOMANIKI, E., DENAXAS, S., PUJADES-RODRIGUEZ, M., GALE, C. P., DEANFIELD, J., SMEETH, L., TIMMIS, A. & HEMINGWAY, H. 2015. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3, 105-13.
- SHOELSON, S. E., LEE, J. & GOLDFINE, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116, 1793-1801.
- SHULMAN, G. I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 106, 171-176.
- SRINIVASAN, K. & RAMARAO, P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*, 125, 451-72.

- STUMVOLL, M., GOLDSTEIN, B. J. & VAN HAEFTEN, T. W. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365, 1333-1346.
- TAKACS, I., SZEKERES, A., TAKACS, A., RAKK, D., MEZES, M., POLYAK, A., LAKATOS, L., GYEMANT, G., CSUPOR, D., KOVACS, K. J. & FERENCZI, S. 2020. Wild Strawberry, Blackberry, and Blueberry Leaf Extracts Alleviate Starch-Induced Hyperglycemia in Prediabetic and Diabetic Mice. *Planta Med.*
- TALAVERA, S., FELGINES, C., TEXIER, O., BESSON, C., LAMAISON, J. L. & REMESY, C. 2003. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr*, 133, 4178-82.
- TANGNEY, C. C. & RASMUSSEN, H. E. 2013. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, 15, 324.
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B. & KAHN, C. R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 85-96.
- TIAN, L., TAN, Y., CHEN, G., WANG, G., SUN, J., OU, S., CHEN, W. & BAI, W. 2019. Metabolism of anthocyanins and consequent effects on the gut microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59, 982-991.
- TORRONEN, R., HELLSTROM, J., MATTILA, P. & KILPI, K. 2017. Postprandial glycaemic response to berry nectars containing inverted sucrose. *J Nutr Sci*, 6, e4.
- TORRONEN, R., SARKKINEN, E., NISKANEN, T., TAPOLA, N., KILPI, K. & NISKANEN, L. 2012. Postprandial glucose, insulin and glucagon-like peptide 1 responses to sucrose ingested with berries in healthy subjects. *Br J Nutr*, 107, 1445-51.
- TSUDA, T., HORIO, F., UCHIDA, K., AOKI, H. & OSAWA, T. 2003. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr*, 133, 2125-30.
- TUOMILEHTO, J., LINDSTROM, J., ERIKSSON, J. G., VALLE, T. T., HAMALAINEN, H., ILANNE-PARIKKA, P., KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S., LAAKSO, M., LOUHERANTA, A., RASTAS, M., SALMINEN, V., UUSITUPA, M. & FINNISH DIABETES PREVENTION STUDY, G. 2001. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, 344, 1343-50.
- VAUZOUR, D., RODRIGUEZ-MATEOS, A., CORONA, G., ORUNA-CONCHA, M. J. & SPENCER, J. P. 2010. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2, 1106-31.
- VITALE, M., MASULLI, M., RIVELLESE, A. A., BONORA, E., CAPPELLINI, F., NICOLUCCI, A., SQUATRITO, S., ANTENUCCI, D., BARREA, A., BIANCHI, C., BIANCHINI, F., FONTANA, L., FORNENGO, P., GIORGINO, F., GNASSO, A., MANNUCCI, E., MAZZOTTI, A., NAPPO, R., PALENA, A. P., PATA, P., PERRIELLO, G., POTENZIANI, S., RADIN, R., RICCI, L., ROMEO, F., SANTINI, C., SCARPONI, M., SERRA, R., TIMI, A., TURCO, A. A., VEDOVATO, M., ZAVARONI, D., GRIONI, S., RICCARDI, G., VACCARO, O. & GROUP, T. I. S. 2018. Dietary intake and major food sources of polyphenols in people with type 2 diabetes: The TOSCA.IT Study. *Eur J Nutr*, 57, 679-688.
- VITALE, M., VACCARO, O., MASULLI, M., BONORA, E., DEL PRATO, S., GIORDA, C. B., NICOLUCCI, A., SQUATRITO, S., AUCIELLO, S., BABINI, A. C., BANI,

- L., BUZZETTI, R., CANNARSA, E., CIGNARELLI, M., CIGOLINI, M., CLEMENTE, G., COCOZZA, S., CORSI, L., D'ANGELO, F., DALL'AGLIO, E., DI CIANNI, G., FONTANA, L., GREGORI, G., GRIONI, S., GIORDANO, C., IANNARELLI, R., IOVINE, C., LAPOLLA, A., LAURO, D., LAVIOLA, L., MAZZUCHELLI, C., SIGNORINI, S., TONUTTI, L., TREVISAN, R., ZAMBONI, C., RICCARDI, G., RIVELLESE, A. A. & GROUP, T. I. S. 2017. Polyphenol intake and cardiovascular risk factors in a population with type 2 diabetes: The TOSCA.IT study. *Clin Nutr*, 36, 1686-1692.
- WANG, L., SUN, R., ZHANG, Q., LUO, Q., ZENG, S., LI, X., GONG, X., LI, Y., LU, L., HU, M. & LIU, Z. 2019. An update on polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 15, 151-165.
- WEDICK, N. M., PAN, A., CASSIDY, A., RIMM, E. B., SAMPSON, L., ROSNER, B., WILLETT, W., HU, F. B., SUN, Q. & VAN DAM, R. M. 2012. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr*, 95, 925-33.
- WEICKERT, M. O., MOHLIG, M., KOEBNICK, C., HOLST, J. J., NAMSOLLECK, P., RISTOW, M., OSTERHOFF, M., ROCHLITZ, H., RUDOVICH, N., SPRANGER, J. & PFEIFFER, A. F. 2005. Impact of cereal fibre on glucose-regulating factors. *Diabetologia*, 48, 2343-53.
- WEICKERT, M. O., MÖHLIG, M., SCHÖFL, C., ARAFAT, A. M., OTTO, B., VIEHOFF, H., KOEBNICK, C., KOHL, A., SPRANGER, J. & PFEIFFER, A. F. 2006. Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care*, 29, 775-80.
- WILLETT, W., MANSON, J. & LIU, S. 2002. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 76, 274s-80s.
- WILLIAMSON, G., DAY, A. J., PLUMB, G. W. & COUTEAU, D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans*, 28, 16-22.
- WINZELL, M. S. & AHREN, B. 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 3, S215-9.
- WISNUWARDANI, R. W., DE HENAUW, S., ANDROUTSOS, O., FORSNER, M., GOTTRAND, F., HUYBRECHTS, I., KNAZE, V., KERSTING, M., LE DONNE, C., MARCOS, A., MOLNAR, D., ROTHWELL, J. A., SCALBERT, A., SJOSTROM, M., WIDHALM, K., MORENO, L. A. & MICHELS, N. 2018. Estimated dietary intake of polyphenols in European adolescents: the HELENA study. *Eur J Nutr*.
- WITKOWSKA, A. M., ZUJKO, M. E., WASKIEWICZ, A., TERLIKOWSKA, K. M. & PIOTROWSKI, W. 2015. Comparison of Various Databases for Estimation of Dietary Polyphenol Intake in the Population of Polish Adults. *Nutrients*, 7, 9299-308.
- WOLEVER, T. M., NGUYEN, P. M., CHIASSON, J. L., HUNT, J. A., JOSSE, R. G., PALMASON, C., RODGER, N. W., ROSS, S. A., RYAN, E. A. & TAN, M. H. 1994. Determinants of diet glycemic index calculated retrospectively from diet records of 342 individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 59, 1265-9.



- WU, T., GUO, X., ZHANG, M., YANG, L., LIU, R. & YIN, J. 2017. Anthocyanins in black rice, soybean and purple corn increase fecal butyric acid and prevent liver inflammation in high fat diet-induced obese mice. *Food Funct*, 8, 3178-3186.
- WU, T., TANG, Q., YU, Z., GAO, Z., HU, H., CHEN, W., ZHENG, X. & YU, T. 2014. Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice. *Int J Food Sci Nutr*, 65, 351-9.
- WU, T., YU, Z., TANG, Q., SONG, H., GAO, Z., CHEN, W. & ZHENG, X. 2013. Honeysuckle anthocyanin supplementation prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct*, 4, 1654-61.
- WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E. & PRIOR, R. L. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem*, 54, 4069-75.
- WU, X., PITTMAN, H. E., 3RD & PRIOR, R. L. 2004. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J Nutr*, 134, 2603-10.
- XU, Y., XIE, L., XIE, J., LIU, Y. & CHEN, W. 2018. Pelargonidin-3-O-rutinoside as a novel alpha-glucosidase inhibitor for improving postprandial hyperglycemia. *Chem Commun (Camb)*, 55, 39-42.
- ZAMORA-ROS, R., BIESSY, C., ROTHWELL, J. A., MONGE, A., LAJOUS, M., SCALBERT, A., LOPEZ-RIDAURA, R. & ROMIEU, I. 2018. Dietary polyphenol intake and their major food sources in the Mexican Teachers' Cohort. *Br J Nutr*, 120, 353-360.
- ZAMORA-ROS, R., FOROUHI, N. G., SHARP, S. J., GONZÁLEZ, C. A., BUIJSSE, B., GUEVARA, M., VAN DER SCHOUW, Y. T., AMIANO, P., BOEING, H., BREDSORFF, L., CLAVEL-CHAPELON, F., FAGHERAZZI, G., FESKENS, E. J., FRANKS, P. W., GRIONI, S., KATZKE, V., KEY, T. J., KHAW, K. T., KÜHN, T., MASALA, G., MATTIELLO, A., MOLINA-MONTES, E., NILSSON, P. M., OVERVAD, K., PERQUIER, F., QUIRÓS, J. R., ROMIEU, I., SACERDOTE, C., SCALBERT, A., SCHULZE, M., SLIMANI, N., SPIJKERMAN, A. M., TJONNELAND, A., TORMO, M. J., TUMINO, R., VAN DER, A. D., LANGENBERG, C., RIBOLI, E. & WAREHAM, N. J. 2013a. The association between dietary flavonoid and lignan intakes and incident type 2 diabetes in European populations: the EPIC-InterAct study. *Diabetes Care*, 36, 3961-70.
- ZAMORA-ROS, R., JIMENEZ, C., CLERIES, R., AGUDO, A., SANCHEZ, M. J., SANCHEZ-CANTALEJO, E., MOLINA-MONTES, E., NAVARRO, C., CHIRLAQUE, M. D., MARIA HUERTA, J., AMIANO, P., REDONDO, M. L., BARRICARTE, A. & GONZALEZ, C. A. 2013b. Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in a Spanish cohort. *Epidemiology*, 24, 726-33.
- ZAMORA-ROS, R., KNAZE, V., LUJAN-BARROSO, L., ROMIEU, I., SCALBERT, A., SLIMANI, N., HJARTAKER, A., ENGESET, D., SKEIE, G., OVERVAD, K., BREDSORFF, L., TJONNELAND, A., HALKJAER, J., KEY, T. J., KHAW, K. T., MULLIGAN, A. A., WINKVIST, A., JOHANSSON, I., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., PEETERS, P. H., WALLSTROM, P., ERICSON, U., PALA, V., DE MAGISTRIS, M. S., POLIDORO, S., TUMINO, R., TRICHOPOULOU, A., DILIS, V., KATSOULIS, M., HUERTA, J. M., MARTINEZ, V., SANCHEZ, M. J.,

- ARDANAZ, E., AMIANO, P., TEUCHER, B., GROTE, V., BENDINELLI, B., BOEING, H., FORSTER, J., TOUILLAUD, M., PERQUIER, F., FAGHERAZZI, G., GALLO, V., RIBOLI, E. & GONZALEZ, C. A. 2013c. Differences in dietary intakes, food sources and determinants of total flavonoids between Mediterranean and non-Mediterranean countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr*, 109, 1498-507.
- ZAMORA-ROS, R., KNAZE, V., ROTHWELL, J. A., HEMON, B., MOSKAL, A., OVERVAD, K., TJONNELAND, A., KYRO, C., FAGHERAZZI, G., BOUTRON-RUAULT, M. C., TOUILLAUD, M., KATZKE, V., KUHN, T., BOEING, H., FORSTER, J., TRICHOPOULOU, A., VALANOU, E., PEPPA, E., PALLI, D., AGNOLI, C., RICCERI, F., TUMINO, R., DE MAGISTRIS, M. S., PEETERS, P. H., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., ENGESET, D., SKEIE, G., HJARTAKER, A., MENENDEZ, V., AGUDO, A., MOLINA-MONTES, E., HUERTA, J. M., BARRICARTE, A., AMIANO, P., SONESTEDT, E., NILSSON, L. M., LANDBERG, R., KEY, T. J., KHAW, K. T., WAREHAM, N. J., LU, Y., SLIMANI, N., ROMIEU, I., RIBOLI, E. & SCALBERT, A. 2016. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr*, 55, 1359-75.
- ZAMORA-ROS, R., TOUILLAUD, M., ROTHWELL, J. A., ROMIEU, I. & SCALBERT, A. 2014. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr*, 100, 11-26.
- ZATTERALE, F., LONGO, M., NADERI, J., RACITI, G. A., DESIDERIO, A., MIELE, C. & BEGUINOT, F. 2019. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*, 10, 1607.
- ZHANG, J. & LIU, F. 2014. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life*, 66, 485-95.
- ZHANG, X., DONG, D., WANG, H., MA, Z., WANG, Y. & WU, B. 2015. Stable knock-down of efflux transporters leads to reduced glucuronidation in UGT1A1-overexpressing HeLa cells: the evidence for glucuronidation-transport interplay. *Mol Pharm*, 12, 1268-78.
- ZHENG, Y., LEY, S. H. & HU, F. B. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, 14, 88-98.
- ZHU, Y., LING, W., GUO, H., SONG, F., YE, Q., ZOU, T., LI, D., ZHANG, Y., LI, G., XIAO, Y., LIU, F., LI, Z., SHI, Z. & YANG, Y. 2013. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23, 843-9.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1

## Mobilidad Nacional



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

### UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud

21 de junio de 2019  
Oficio No. 24/2191

Attn': Jesús Guadalupe Espinoza Alderete

Universidad Autónoma de Sinaloa

P r e s e n t e

Estimado L.N. Espinoza,

Por este medio se le comunica que ha sido aceptado para realizar una estancia de Investigación en el Posgrado en Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora, el cual se encuentra dentro del Padrón de Posgrados de Calidad de CONACyT. La estancia la realizará bajo la tutela de la Dra. Verónica López Teros.

La aceptación comprende una estancia de 3 meses con fecha de inicio el 10 de septiembre de 2019 y finalización el 09 de diciembre del mismo año. Usted estará trabajando bajo mi supervisión en un proyecto cuyo objetivo será la Identificación de los metabolitos plasmáticos después de dos horas de la administración de un extracto de fresa rico en polifenoles en un modelo murino de obesidad inducida con dieta. Para lograr el objetivo anterior recibirá entrenamiento y estandarización en la determinación de polifenoles plasmáticos por HPLC-DAD.

ATENTAMENTE

"El saber de mis hijos hará mi grandeza"

  
Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras  
Coordinador del Programa



  
Dra. Verónica López Teros  
Profesor-Investigador

C.c.p. Archivo

Blvd. Luis Donald Colosio entre Reforma y Francisco Salazar. Col. Centro. C.P. 83000. Hermosillo, Son.  
Tel./Fax: (662) 259 22 69, Ext. 8269. E-mail: pcs@dependencias.uson.mx

## ANEXO 2

# Cartel presentado en Congreso Internacional de Polifenoles y Salud, Diciembre 2019. Kobe, Japón.



### Acute effect of strawberry polyphenol-rich extract on postprandial glycemia in a murine model of diet-induced obesity

PE-79

Jesus G. Espinoza-Alderete<sup>1</sup>, Paola Galindo-Vidales<sup>1</sup>, Yubel K. Alarcon-Rodriguez<sup>1</sup>, Maryant E. Angulo-Leyva<sup>1</sup>, Marcela de J. Vergara-Jimenez<sup>1</sup>, Francisco Cabrera-Chavez<sup>1</sup>, Veronica Lopez-Teros<sup>2</sup>, Monica L. Castro-Acosta<sup>1</sup>. Corresponding autor: mconica@uas.edu.mx  
<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, UAS, Mexico, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, UNISON, Mexico.



#### INTRODUCTION

Berries polyphenols have shown to reduce blood glucose levels after a meal by inhibiting carbohydrate digestion, glucose absorption and increasing insulin sensitivity and secretion<sup>1,2</sup>. Strawberry is a rich source of polyphenols which might trigger hypoglycemic properties *in vivo*<sup>3</sup>. Murine models of high-fat diet-induced obesity using C57BL/6N provide insights about treatment of pathologies related to hyperglycemia applying dietary supplement rich in polyphenols<sup>4</sup>.

#### OBJECTIVE

To assess the effect of a strawberry polyphenol-rich extract (SBE) on postprandial blood glucose levels in a murine model of diet-induced obesity.

#### METHODOLOGY

Male C57BL/6N mice were randomized into two groups to be fed a high fat diet (HFD) or a low fat diet (LFD) during 11 weeks. After the feeding trial, six subgroups were organized to administer 0, 18 or 24 mg of the strawberry extract (SBE) dissolved in water (equivalent to 0, 0.15 and 0.20 mg of anthocyanins) (Figure 1). An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed (Figure 2).

**Group (Diet)**      **Sub-group (SBE dose)**

**Low-fat diet**      **High-fat diet**

10% lipids, 72% carbohydrates and 18% proteins.      62% lipids, 20% carbohydrates and 18% proteins.

n = 24      n = 24

→ 0 mg      → 0 mg

→ 18 mg      → 18 mg

→ 24 mg      → 24 mg

Figure 1. Groups for feeding trial and OGTT

① 6 h fast

② SBE administration

③ Glucose solution (20%) administration

④ Blood glucose measurements

15 30 60 90 120 min

Figure 2. Oral glucose tolerance test.

#### RESULTS

Weight gain was higher in the HFD group compared to the LFD group (P<0.001) (Figure 3). Basal blood glucose was higher in the HFD groups than LFD group (P<0.05) (Figure 4). Administering the SBE before the glucose load showed significant effects on the rise of blood glucose concentration in LFD and HFD groups (Figure 5A). The administration of 18 and 24 mg of SBE before the glucose load showed a significant decrease in blood glucose on the HFD group (P<0.01) (Figure 5B).

#### RESULTS

There was a decrease of iAUC in the HFD group (P<0.05) (Table 1). Peak concentration (C<sub>max</sub>) in blood glucose was reduced by SBE treatment in mice on the HFD group (P<0.05) and no significant change in C<sub>max</sub> was shown in mice fed a low-fat diet (Figure 6).

Figure 3. Body weight gain in male C57BL/6N mice. (A) Body weight during 11-week feeding trial. (B) Mice fed a HFD gained more weight (4.6 ± 0.1 g) than mice fed a LFD (3.53 ± 0.2 g) \*\*P<0.001.

Figure 4. Basal blood glucose after 11-week feeding trial. HFD group: 196 ± 7.9 mg/dL and LFD group: 163.4 ± 7.6 mg/dL. \*\*P<0.01.

Figure 5. Glucose concentrations in blood by time point, data is showed as mean ± SEM. Mice fed (A) low-fat diet or (B) high-fat diet. Repeated measures two-way ANOVA model \*P<0.05, \*\*P<0.01.

Time (min)	Strawberry extract			P-value
	0 mg	18 mg	24 mg	
0-30	9955 ± 841.8	7934 ± 580.3	7955 ± 551.2	0.0716
0-60	22252 ± 2112	16748 ± 1223*	16317 ± 1182*	0.0242
0-90	34094 ± 3473	24642 ± 1861*	23611 ± 1844*	0.0138
0-120	44969 ± 4835	31615 ± 2424*	30406 ± 2630*	0.0127

All values are presented as means ± SEM. \*P<0.05.

Figure 6. C<sub>max</sub> of postprandial blood glucose. (A) Low-fat diet. (B) High-fat diet. 18 mg (319.1 ± 21.9 mg/dL), 24 mg (322.5 ± 26.5 mg/dL), 0 mg (434.6 ± 45.2 mg/dL). One-way ANOVA without repeated measures, \*P<0.05.

#### CONCLUSION

Administration of 18 and 24 mg of a polyphenol-rich strawberry extract (containing 0.15 and 0.20 mg anthocyanins, respectively) before a glucose load reduced the postprandial blood glucose concentration in obese mice; this inhibitory effect was slightly greater following administration of 24 mg of the strawberry extract. Deeper analysis is necessary to elucidate the mechanism involved in the postprandial glucose decrease. Future HPLC-DAD analyses of polyphenols in mice plasma may help to a better understanding of results.

1. Castro-Acosta, M.L., et al. 2016. *J Nutr Biochem*. 38: p. 154-161.      4. Wimsell, M.S. and B. Alrawi. 2004. *Diabetes*. 53: p. 9215-9.

2. Torronsa, R., et al. 2012. *Br J Nutr*. 107(10): p. 1445-51.

3. Piao, R.L., et al. 2009. *J Agric Food Chem*. 56(2): p. 647-52.

This project was funded by **prodep**

107

# ANEXO 3

## Cartel presentado en Congreso Internacional de Polifenoles y Salud, Diciembre 2019. Kobe, Japón.

### A polyphenol-rich strawberry extract have no effect on postprandial glycemia in a murine model of diet-induced obesity

Paola Galindo-Vidales<sup>1</sup>, Jesus Espinoza-Alderete<sup>1</sup>, Lorena Serrano-Corral<sup>1</sup>, Alma Felix-Haras<sup>1</sup>, Marcela de Jesus Vargara-Jimenez<sup>1</sup>, Francisco Cabrera-Chavez<sup>1</sup>, Veronica Lopez-Teros<sup>2</sup>, Monica Castro-Acosta<sup>1</sup>, Corresponding author: cmonica@uas.edu.mx  
<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, UAS, Mexico, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, UNISON, Mexico.

**Background**  
 Obesity is the primary cause of T2D, visceral fat and adipocytokine secretion are likely to determine insulin resistance and eventually  $\beta$ -cell failure. Elevated postprandial glycaemia has been implicated in the development of T2D and represents a risk factor that can easily be targeted by dietary modifications<sup>1</sup>. Berries' polyphenols have shown to reduce blood glucose levels after a meal by inhibiting carbohydrate digestion, glucose absorption and increasing insulin sensitivity and secretion<sup>2,3</sup>. Strategies to control chronic postprandial hyperglycemia by optimizing the functionality of foods would strengthen efforts to reduce the risk for T2D. The objective was to assess the effect of a polyphenol-rich strawberry extract on postprandial blood glucose levels in a murine model of diet-induced obesity.

**Methodology**

**Results**  
 Weight gain was higher in the HFD group compared to the LFD group ( $P < 0.05$ ) (Fig 3). Basal blood glucose was  $168 \pm 8.5$  and  $214 \pm 7.6$  mg/dL, for the HFD and LFD groups, respectively ( $P < 0.001$ ) (Fig 4). The SBE administration before the glucose load showed significant effects on the rise of blood glucose concentration in LFD and HFD mice ( $P < 0.0001$ ) (Fig 5), but there was no significant effects on the glucose tolerance test at iAUC 0-30, 0-60, 0-90 or 0-120 min (Fig 6). However, the administration of 12 mg of the strawberry extract before the glucose load showed a downward trend of iAUC on the first 30 min in the HFD group (Table 1). Peak concentration ( $C_{max}$ ) and  $T_{max}$  showed no significant changes after administration of the strawberry extract in both groups.

**Table 1** Incremental area under the curve (iAUC) for blood glucose in the high-fat diet group

Glucose comparison	Treatment comparison	Mean difference	95% CI*	P-value*
0 – 15 min	0 mg – 6 mg	142	-326, 610	0.6476
	0 mg – 12 mg	208	-75, 492	0.1458
0 – 30 min	0 mg – 6 mg	457	-720, 1635	0.5073
	0 mg – 12 mg	787	-384, 1959	0.1861

\*Confidence interval and P-value adjusted by Dunnett's procedure for multiple comparisons against a control group.

**Conclusion:** Administration of 12 mg of a polyphenol-rich strawberry extract (containing 0.10 mg anthocyanins) before a glucose load showed a trend to decrease the postprandial blood glucose concentration in obese mice. Further analyses are necessary to evaluate if increasing the dose of the polyphenol-rich strawberry extract have an inhibitory effect on postprandial glycaemia.

1. Shank, E. E., Anton, J. M., Benton, D., Brink, J., Buzzella, L., et al. (2012). *Obes Rev*, 13, 823-84.  
 2. Castro-Acosta, M.L., Smith, L., Miller, R.J., McCarthy, D.J., Finnegan, J.A., Hall, W.L. (2018). *J Nutr Biochem*, 58, 154-61.  
 3. Tordani, R., Sarikhan, E., Nakanan, T., Topik, N., Kiji, K. & Nakanan, L. (2012) *B J Nutr* 107, 144S-51.

This project was funded by CODIC