



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Rafael Burgos A.  
**INSTITUTO:** Farmacología y Morfofisiología  
**FACULTAD:** Ciencias Veterinarias

## **“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* EN UN MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico.

**PAULA FRANCISCA NÚÑEZ ZURITA**

VALDIVIA-CHILE

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Rafael Burgos por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto. A mis profesores informantes, Dr. Guido Ruiz y QF. Claudia Oróstegui por haber aceptado ser parte de mi comisión evaluadora. A todas las personas que forman parte del Instituto de Farmacología y Morfofisiología, por su amabilidad y muy buena disposición, especialmente a Stefanie Teuber por haber estado siempre presente en la parte experimental de mi tesis, ayudándome y guiándome, por su paciencia y buena disposición.

A Dios, por su fidelidad y amor incondicional. Por haberme cuidado y sostenido en los momentos más críticos. Agradezco a mis amigos Pablo, Nicole y Sergio, gracias por estar siempre presente durante tantos años. A toda la gente de Relaciones Públicas y de la Red de Egresados, jefes, jefas y staff de laborantes. Lejos, fueron los tres años más lindos y enriquecedores de mi estadía en la Universidad, en donde aprendí lo que realmente es el trabajo en equipo, son un tremendo equipo. ¡Sigán así!

Mérito especial a mis padres, Marcia y Carlos, por esforzarse siempre para darme lo mejor. Gracias por amarme, entenderme y estar siempre a mi lado apoyándome. A mi hermano Leonardo, quién estaría orgulloso de este gran logro.

Esta tesis fue financiada por el Proyecto INNOVA CORFO 12IDL2-16254.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
1. RESUMEN.....	1
Abstract .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1. Diabetes mellitus .....	3
2.2. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 .....	5
2.2.1. Fármacos que estimulan la secreción de insulina o secretagogos de insulina. ....	6
2.2.2. Fármacos sensibilizadores de insulina .....	7
2.2.3. Inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa .....	10
2.3. Antocianinas .....	10
2.4. <i>Aristotelia chilensis</i> .....	12
2.5. Modelo murino de diabetes tipo 2 inducido por dieta hipercalórica .....	14
2.6. Distinción de la problemática .....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1. Materiales .....	17
3.1.1. Material biológico .....	17
3.1.2. Reactivos químicos .....	17
3.1.3. Equipos .....	18
3.2. Métodos .....	19
3.2.1. Inducción de diabetes mellitus tipo 2 mediante una dieta hipercalórica ....	19
3.2.2. Preparación y tratamiento experimental con extracto de <i>A. chilensis</i> .....	19
3.2.3. Sacrificio de los animales .....	21
3.2.4. Obtención de cortes histológicos de hígado .....	21
3.2.5. Procesamiento de muestras sanguíneas y análisis de muestras plasmáticas.....	22
3.2.6. Análisis de los cortes histológicos de hígado .....	26
3.2.7. Análisis estadístico .....	27

4. RESULTADOS .....	28
4.1. Desarrollo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 mediante dieta hipercalórica....	28
4.2. Determinación del efecto antidiabético del extracto de <i>A. chilensis</i> .....	30
4.2.1. Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> sobre los niveles de glicemia en ayunas.....	31
4.2.2. Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> sobre los niveles de insulina en ayunas.....	32
4.2.3. Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos.....	33
4.2.4. Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> sobre los niveles de colesterol total plasmático.....	34
4.2.5. Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> sobre los porcentajes de infiltraciones grasas características de hígado graso no alcohólico.....	35
5. DISCUSIÓN.....	37
6. CONCLUSIONES.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
8. ANEXOS.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> El catión flavilio.....	11
<b>Figura 2.</b> Inducción de obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia e hígado graso no alcohólico mediante dieta hipercalórica.....	29
<b>Figura 3.</b> Niveles de glicemia en ayunas finalizado el tratamiento experimental con los activos.....	31
<b>Figura 4.</b> Niveles plasmáticos de insulina en ayunas post tratamiento con los activos.....	32
<b>Figura 5.</b> Niveles de triglicéridos plasmáticos luego de 14 días consecutivos de tratamiento experimental con <i>A. chilensis</i> , metformina y vehículo.....	33
<b>Figura 6.</b> Niveles de colesterol total plasmático post tratamiento con los activos.....	34
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de área de infiltración de grasa hepática luego de 14 días consecutivos de tratamiento experimental con <i>A. chilensis</i> , metformina o vehículo.....	35
<b>Figura 8.</b> Niveles de incretina GLP-1 activa (7-36) post tratamiento con los activos.....	53
<b>Figura 9.</b> Niveles basales de glicemia e insulina de los animales alimentados con dieta control baja en grasa y dieta alta en grasa, antes y después del tratamiento experimental.....	55
<b>Figura 10.</b> Efecto del extracto de <i>A. chilensis</i> 5mg/kg y metformina 300 mg/kg sobre las infiltraciones grasas características de hígado graso no alcohólico.....	56

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Estructuras de las antocianidinas más comunes en la naturaleza.....	11
<b>Tabla 2.</b> Pesos de los ratones alimentados con dieta control baja en grasa (SD) y dieta alta en grasa (HFD), al inicio de la dieta (semana 0) y finalizadas las 12 semanas (n=8 para SD, n=32 para HFD).....	30
<b>Tabla 3.</b> Composición pellet dieta control baja en grasa (SD) D12450J.....	51
<b>Tabla 4.</b> Composición pellet dieta alta en grasa (HFD) D12492.....	52
<b>Tabla 5.</b> Niveles de incretina GLP-1 activa finalizados los 14 días de tratamiento experimental con los activos.....	54
<b>Tabla 6.</b> Niveles de glicemia en ayunas, insulina e ayunas, triglicéridos plasmáticos y colesterol total plasmático finalizados los 14 días de tratamiento experimental con los activos.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

GLP-1: Péptido similar a glucagón tipo 1

ADICH: Asociación de Diabéticos de Chile

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

DPP-4: Enzima dipeptidil peptidasa tipo 4

K<sub>ATP</sub>: Canales de potasio dependientes de ATP

SUR: Receptor de sulfonilureas

HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina glicosilada

AMPK: Proteína quinasa dependiente de AMP

UKPDS: Estudio prospectivo de diabetes de Reino Unido

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

PPAR- $\gamma$ : Receptor activador de la proliferación de peroxisomas tipo gamma

TZDs: Tiazolidinedionas

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral tipo alfa

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1

IL-6: Interleuquina 6

HDL: Lipoproteína de alta densidad

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4

STZ: Estreptozotocina

SGLT-1: Transportador de glucosa dependiente de sodio tipo 1

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

TG: Triglicéridos

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

TMB: tetrametilbencidina

B6: Ratones de la cepa C57BL/6J

PKC $\epsilon$ : Proteína quinasa épsilon

C3G: Cianidina 3-glucósido

LDL: Lipoproteína de baja densidad

## 1. RESUMEN

*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz es un árbol perenne que crece principalmente en la zona centro-sur de Chile y Argentina. Sus frutos son considerados una fuente rica en antocianinas, a las cuales se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, analgésicas, cardioprotectoras, antioxidantes y últimamente, antidiabéticas, sobretodo en el control glicémico basal y posprandial.

Para evaluar el efecto antidiabético del extracto de maqui, primero se indujo obesidad, diabetes tipo 2 y sus comorbilidades alimentando a ratones machos de la cepa C57BL/6J con dieta alta en grasa (60% kcal grasa) durante 12 semanas. Luego, se trataron estos animales obesos y diabéticos con extracto de maqui 5 mg/kg, metformina 300 mg/kg (como control positivo) o vehículo vía sonda intragástrica rígida (vía oral) durante 14 días consecutivos. Finalmente, se analizaron las muestras plasmáticas obtenidas post tratamiento para determinar los niveles en ayunas de glicemia, insulina, GLP-1 activo, triglicéridos y colesterol total plasmáticos, además se analizaron los cortes histológicos obtenidos luego del sacrificio de los animales para determinar los porcentajes de infiltración grasa. Como resultado se obtuvo que maqui en la dosis de 5 mg/kg produjo una tendencia a disminuir los niveles de glicemia, insulina, triglicéridos y colesterol total plasmático, mas esta disminución no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, produjo una reducción significativa en los porcentajes de infiltración grasa hepática siendo este efecto similar a lo observado con metformina 300 mg/kg. Por lo tanto, se concluye que el extracto de maqui en la dosis de 5 mg/kg produce una mejoría en la esteatosis hepática característica de hígado graso no alcohólico.

## ABSTRACT

*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz is a tree that grows in Central Zone and Southern of Chile and Argentina. Its berries are considered one of the richest sources of anthocyanins, which are the main responsables of its antiinflammatory, analgesic, cardioprotective, antioxidant and antidiabetic properties.

To evaluate the antidiabetic effect of maqui berry extract, specifically its hypoglycemic effect, first obesity, type 2 diabetes and its comorbidities were induced by feeding male C57BL/6J mice with a high fat diet (which consist of 60% kcal fat) during 12 weeks. After, obese and diabetic mice were treated with maqui berry extract 5 mg/kg, metformin 300 mg/kg (as a positive control) or vehicle through oral gavage for 14 consecutive days. Finally, plasmatic samples collected post treatment were analized to determinate fasting levels of glucose, insulin, active GLP-1, triglycerides and total cholesterol, also histological liver samples obtained in animal sacrifice were analized to determinate liver fat percentages.

**Outcomes:** maqui berry extract 5 mg/kg produces a trend towards to decrease fasting levels of glucose, insulin, triglycerides and total cholesterol but this decrease was not statistically significant. However, it decreased significantly the fatty liver in obese and diabetic mice, being this effect similar to the group treated with metformin 300 mg/kg.

**Conclusion:** maqui berry extract 5 mg/kg reliefs significatively hepatic steatosis.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Diabetes Mellitus

Hasta el año 2010, 347 millones de personas padecían diabetes (1). En el año 2012, fue la causante de 1,5 millones de muertes y se estima que para el año 2030, se convierta en la séptima causa de muerte a nivel mundial (2). En la última década, ha sido la principal causa de falla renal, ceguera y amputación no traumática de extremidades (3).

La prevalencia global de diabetes en el año 2014 fue de aproximadamente un 9% en adultos mayores de 18 años (2). En Chile, se estima una prevalencia de un 4,2% de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud realizada el 2003 y de 7,5% de acuerdo a la Asociación de Diabéticos de Chile (ADICH). La Encuesta Nacional de Salud del año 2003 indicó que la prevalencia era mayor después de los 44 años de edad, alcanzando un 12,2% en el grupo etario de 45 a 64 años y un 15,8% en el grupo de los 65 años en adelante. Se estima que en el año 2007, hubo cerca de 1500 defunciones por causa de la diabetes mellitus tipo 2, de las cuales el 89,3% correspondían a mayores de 60 años (4).

La diabetes mellitus es un grupo de trastornos metabólicos crónicos caracterizados por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, producidos ya sea por falta de insulina o por una disminución de la sensibilidad de los tejidos a esta hormona (5, 6). Clínicamente se manifiesta con hiperglicemia. Si bien existen varios tipos de diabetes mellitus, principalmente se clasifica en dos tipos: diabetes mellitus tipo 1, antes llamada insulino dependiente, y diabetes mellitus tipo 2 o no insulino dependiente (5). La hiperglicemia es la responsable de los síntomas característicos de esta enfermedad, entre los que se encuentran polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso inexplicada, debilidad, visión borrosa, susceptibilidad a infecciones, y de las complicaciones microvasculares y macrovasculares de esta patología (5, 7).

La diabetes mellitus tipo 1 es el tipo de diabetes más común en niños y adolescentes. Es la responsable del 5-10% de los casos de diabetes. Suele instalarse de forma brusca en sólo unos días o semanas (5). Se caracteriza por una destrucción de las células beta pancreáticas, la cual deja una deficiencia insulínica absoluta, causada por infecciones virales, trastornos autoinmunes (5) o de causa idiopática (8). Entre las complicaciones de este tipo de

diabetes se encuentran la acidosis metabólica, producida por un aumento en la utilización de las grasas y la liberación de cetoácidos, tales como el ácido acetoacético y el ácido beta-hidroxi-butírico hacia el plasma. Esto último, más la deshidratación que ocurre con esta enfermedad debido a un exceso de diuresis, provocan una acidosis intensa que conlleva un coma diabético e inminente muerte del paciente (5). Por ello, la acidosis metabólica es considerada una urgencia médica (9).

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por una disminución en la sensibilidad a la acción de insulina en los tejidos periféricos, especialmente músculo esquelético, hígado y tejido adiposo - fenómeno conocido como resistencia a insulina - y por una ausencia relativa de insulina (6). Es la responsable del 90% de los casos de diabetes y suele presentarse después de los 30 años, sobretodo en personas entre 50 y 60 años. A diferencia de la diabetes tipo 1, se desarrolla de forma gradual. El principal factor de riesgo para desarrollar resistencia a insulina y, en consecuencia, diabetes tipo 2, es la obesidad. Sin embargo no todos los pacientes diabéticos son obesos (5). En la insulinoresistencia, una manera de compensar la hiperglicemia producto de la disminución de la sensibilidad a la insulina es mediante un aumento en la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas, generándose una hiperinsulinemia. Pueden pasar años en los cuales esta hiperinsulinemia compensatoria mantiene los niveles de glicemia normales – o normoglicemia – sin embargo, conforme avanza la enfermedad, llega una instancia en la cual la producción de insulina en las células beta pancreáticas disminuye, llevando a un estado permanente de hiperglicemia. Este último evento, marca el inicio de la diabetes tipo 2 como tal (5, 7). Además de la alteración de la captación de glucosa en tejidos estimulados por insulina, el exceso de producción de glucosa por el hígado así como la secreción inadecuada de glucagón contribuyen a la hiperglicemia en esta enfermedad (7).

Como se mencionó anteriormente, en la diabetes tipo 2 además de una alteración en el metabolismo de glucosa también se produce una alteración en el metabolismo proteico y lipídico. Producto de la disminución en la sensibilidad de los tejidos a las acciones de insulina, hay un aumento en la lipólisis en el tejido adiposo ya que insulina no ejerce sus efectos antilipolíticos y por ende, se produce un aumento de flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado. Esto último provoca un aumento de la producción de triglicéridos a nivel

hepático los cuales son secretados como VLDL, provocando un aumento de los niveles de triglicéridos plasmáticos (10). Además, el aumento de flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado produce la acumulación de éstos como triglicéridos (11). Por este motivo, los pacientes diabéticos además de tener niveles elevados de glicemia también presentan dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia) e hígado graso no alcohólico (10, 11).

Como tratamiento, para la diabetes mellitus tipo 1 se usa exclusivamente insulina, mientras que para la diabetes tipo 2 se usan principalmente fármacos orales de diversas familias. El objetivo del tratamiento es controlar los síntomas de hiperglicemia (9), limitar complicaciones microvasculares y macrovasculares (12), reducir la mortalidad y mejorar la calidad de vida del paciente (6).

## **2.2. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2**

Respecto al tratamiento farmacológico de la diabetes tipo 2, se utilizan principalmente fármacos orales, sin embargo es primordial el seguimiento de un tratamiento no farmacológico consistente en cambios de la dieta y ejercicio físico regular además del uso de medicamentos para el control glicémico (4).

Seis clases de agentes orales existen en la actualidad para el tratamiento de esta patología: sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidinedionas o glitazonas, inhibidores de alfa- glucosidasa e inhibidores de la enzima DPP-4. Estos fármacos también pueden clasificarse de acuerdo al mecanismo por el cual disminuyen la glicemia plasmática: secretagogos de insulina, en donde se encuentran las sulfonilureas, meglitinidas e inhibidores de DPP-4, y sensibilizadores de insulina, como las biguanidas y tiazolidinedionas (6). Los inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa disminuyen la hiperglicemia mediante otro mecanismo que se comentará posteriormente (6).

### 2.2.1. Fármacos que estimulan la secreción de insulina o secretagogos de insulina.

- Sulfonilureas

Las sulfonilureas son un grupo de fármacos hipoglicemiantes que aumentan la secreción de insulina mediante la unión de éstos a un receptor específico ubicado en las células beta pancreáticas, el receptor de sulfonilureas (SUR; receptor fisiológico se define como una macromolécula que media la comunicación celular). Al unirse el fármaco a este receptor, ejerce un bloqueo en los canales  $K_{ATP}$ , inhibiendo así su actividad lo que conlleva la depolarización de la membrana plasmática. Esta depolarización abre canales de Ca dependientes de voltaje, ingresa  $Ca^{2+}$  al interior de la célula, lo que finalmente produce la liberación de insulina hacia el torrente sanguíneo (6, 9). Se clasifican en sulfonilureas de primera y segunda generación. Entre las de primera generación se encuentran la acetohexamida, clorpropramida, tolazamida y tolbutamida; la glimepirida, glipizida y glibenclamida pertenecen a las de segunda generación, considerándose éstas más potentes que las de primera generación (6). Tanto las sulfonilureas de primera como las de segunda generación son igualmente efectivas en disminuir la hiperglicemia y las complicaciones microvasculares cuando son administradas en dosis equipotentes (6). Las sulfonilureas producen una disminución de  $HbA_{1c}$  y de los niveles de glicemia en ayunas, entre un 1,5-2% y 60-70 mg/dl, respectivamente (6). El efecto adverso más común en los pacientes tratados con estos fármacos es la hipoglicemia (9). Un 5% de los pacientes experimentan hiponatremia con clorpropramida y tolbutamida, debido a un aumento de la secreción de la hormona antidiurética. Los pacientes de edad avanzada y que usan diuréticos tiazídicos en forma concomitante tienen mayor riesgo de experimentar hiponatremia (6). Además, el aumento de peso entre 1 y 3 kg es común (12). Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia hepática o renal (12).

- Meglitinidas

Las meglitinidas repaglinida y nateglinida, actúan como secretagogos de insulina de corta acción. Tienen un mecanismo de acción similar al de las sulfonilureas, sin embargo no se unen al receptor de sulfonilureas, sino a un sitio adyacente a éste (6). Por otro lado, a diferencia de las sulfonilureas, la presencia de glucosa es necesaria para estimular la

secreción de insulina (6), además de producir una secreción rápida pero menos duradera de la hormona (12). No asociadas a otros fármacos antidiabéticos, ambas meglitinidas disminuyen significativamente la glicemia posprandial y los niveles de HbA<sub>1c</sub> (6). Se deben administrar antes de consumir alimentos (9). En cuanto a los efectos adversos, el más común es la hipoglicemia, siendo ésta menor que la producida por las sulfonilureas. Pacientes bajo tratamiento con repaglinida podrían experimentar un aumento de peso entre 2-3 kg (6). Deben administrarse con precaución en pacientes con insuficiencia hepática debido a que son metabolizadas a nivel hepático (6).

- Inhibidores de la enzima DPP-4

Los dos fármacos más usados de esta clase de antidiabéticos son la sitagliptina y vildagliptina. Al inhibir competitivamente la enzima DPP-4, encargada de degradar a la incretina GLP-1, prolongan la vida media de ésta, produciendo un aumento en la secreción de insulina dependiente de glucosa y la disminución de los niveles posprandiales de glucagón (6, 12). Sitagliptina y vildagliptina disminuyen la actividad de la enzima DPP-4 en aproximadamente un 95% durante 12 horas (12). En cuanto a su eficacia, como disminuyen la HbA<sub>1c</sub> en aproximadamente un 1% y contribuyen al control glicémico posprandial y en ayunas (12). Generalmente son bien toleradas. No producen efectos adversos gastrointestinales ni aumento de peso corporal a diferencia de otros agentes antidiabéticos. Pueden producir hipoglicemia leve en tasas similares a metformina (6). Se deben administrar con cuidado en pacientes con función renal disminuida (12).

### **2.2.2. Fármacos sensibilizadores de insulina**

- Biguanidas

La metformina, fármaco hipoglicemiante con una experiencia clínica de más de 45 años en los Estados Unidos para el tratamiento de la diabetes tipo 2, es el único activo perteneciente a la familia de las biguanidas (6). Sus principales acciones son aumentar la sensibilidad a insulina en el tejido hepático y muscular estriado, ya que fomenta la captación

y almacenamiento de glucosa en tejidos sensibles a insulina (6), además de suprimir la gluconeogénesis hepática (12). Estas acciones se deben a que aumenta la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMP o AMPK. La AMPK activada, además estimula la beta oxidación de ácidos grasos y disminuye la lipogénesis (12). Eficaz tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes antidiabéticos (12), reduce significativamente la HbA<sub>1c</sub> (en un 1,5-2,0%) y la glucosa en ayunas (60-80 mg/dl) (6). Además de ayudar en el control glicémico, la metformina ayuda a disminuir los triglicéridos plasmáticos y colesterol LDL, aumentar el colesterol HDL, así como producir una modesta reducción del peso corporal (de 2 a 3 kg) (6). Los efectos antihiperlipemiantes recién mencionados se atribuyen también a la activación de AMPK. De acuerdo al United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), metformina disminuye significativamente la mortalidad, riesgo de accidente cerebrovascular y riesgo de infarto al miocardio en comparación con tratamiento intensivo con insulina o sulfonilureas (6). Estos antecedentes, la convierten en el único antidiabético capaz de disminuir el riesgo total de mortalidad. Por ello, se recomienda incluirla en la terapia antidiabética de todos los pacientes con diabetes tipo 2, siempre y cuando sea tolerada y no contraindicada (6). Además de disminuir la mortalidad por eventos cardiovasculares, metformina retrasa la progresión a diabetes tipo 2 en pacientes con intolerancia a la glucosa (12).

Alrededor de un 30% de los pacientes que inician terapia con metformina experimentan problemas gastrointestinales tales como molestias estomacales, náuseas, diarrea, anorexia y sensación de llenado estomacal, siendo estas últimas las causantes de la pérdida de peso producida por este fármaco (6). Estos efectos pueden disminuirse titulando la dosis de metformina, además de administrarla junto con los alimentos (12). Otros efectos adversos de menor incidencia son sabor metálico en la boca, interferencia con la absorción de la vitamina B12 y raramente, acidosis láctica (6). Debido a que tiene poco efecto en disminuir la glucosa en condiciones de normoglicemia, rara vez produce hipoglicemia (12). Metformina está contraindicada en pacientes con función renal disminuida, hepatopatía grave, neumopatía grave, insuficiencia cardíaca descompensada y alcoholismo (6, 12).

- Tiazolidinedionas o glitazonas

Las tiazolidinedionas, también conocidas como glitazonas, son otra clase de fármacos antidiabéticos pertenecientes a los sensibilizadores de insulina. Actualmente hay dos aprobadas por la FDA para el tratamiento de la diabetes tipo 2: pioglitazona y rosiglitazona (6). Las tiazolidinedionas se unen al receptor activador de la proliferación de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), un receptor hormonal de tipo nuclear localizado principalmente en células adiposas, vasculares, cardíacas, hepáticas y musculares esqueléticas, que juega un rol en la regulación de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y lípidos (12). Al activar PPAR- $\gamma$ , las TZDs incrementan la sensibilidad a las acciones de insulina, específicamente favorecen la captación y almacenamiento de glucosa en tejidos muscular, hepático y adiposo, y disminuyen la gluconeogénesis hepática (12). Además, ejercen un efecto beneficioso en marcadores proinflamatorios tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 y PAI-1, y un aumento en la secreción de adiponectina por los adipocitos, lo que se traduce en un mejoramiento en la función endotelial e inflamación (6). Las tiazolidinedionas producen una lenta mejoría en el control glicémico, observándose sus efectos luego de 4 meses de tratamiento (6). Al sexto mes de tratamiento, producen una disminución de HbA<sub>1c</sub> en aproximadamente un 1,5%, de la glicemia en ayunas en 60-70 mg/dl en la dosis máxima. Sin embargo, la eficacia como hipoglicemiante depende de la suficiente insulinemia endógena o exógena. Pioglitazona, además ejerce una disminución en los niveles de triglicéridos plasmáticos en un 10-20% y ambos fármacos aumentan el colesterol HDL en aproximadamente 3-9 mg /dl (6). Si bien las tiazolidinedionas producen una mejoría en el control glicémico, sus beneficios en las complicaciones macrovasculares son controversiales dado que se ha visto un incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares (infarto agudo al miocardio) en pacientes que están bajo tratamiento con rosiglitazona (12). Los efectos adversos más comunes son el aumento de peso corporal dosis-dependiente (entre 2 y 4 kg durante el primer año de tratamiento) y edema. Entre los otros efectos adversos reportados se encuentran disminución en el hematocrito, aumento de riesgo de fracturas en mujeres postmenopáusicas (12). Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia cardíaca clase III y IV e insuficiencia hepática (6, 12).

### **2.2.3. Inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa**

Los fármacos pertenecientes a este grupo, acarbosa y miglitol, inhiben competitivamente la enzima alfa- glucosidasa, maltasa, isomaltasa, amilasa y sacarasa en el intestino delgado, postergando y reduciendo la degradación y absorción intestinal de la sacarosa y carbohidratos complejos (disacáridos, almidón, dextrinas) (6, 12). De esta forma, evitan el aumento súbito de los niveles de glicemia posprandiales. Otro efecto que producen es el aumento de la liberación de la incretina GLP-1 circulante (12).

Ya que disminuyen la glicemia posprandial entre 40-50 mg/dl, pero ejerce poca acción en los niveles basales de glicemia, se recomiendan a pacientes con niveles casi normales de glicemia en ayunas pero elevados de glicemia posprandial (6).

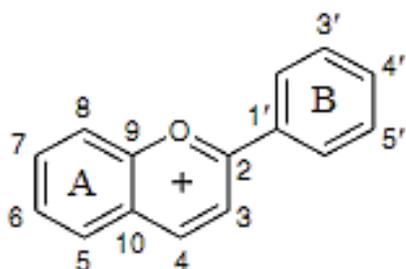
Los efectos adversos más comunes son los gastrointestinales tales como flatulencia, molestias abdominales, malabsorción y diarrea, siendo éstos dependientes de la dosis. No causan hipoglicemia al ser usados como monoterapia, sino en combinación con otros agentes hipoglicemiantes (12). Contraindicados en pacientes con insuficiencia renal etapa 4 (12) y síndrome de intestino irritable (6).

### **2.3. Antocianinas**

Las antocianinas son pigmentos polifenólicos solubles en agua y solventes polares, pertenecientes al grupo de los flavonoides, encargadas de una gran diversidad de colores que van desde el naranja, rosado, rojo hasta el azul de muchas flores, vegetales, frutas y hojas de plantas vasculares (13, 14). Desde un punto de vista químico, son glucósidos derivados del catión 2-fenilbenzopirilio, comúnmente conocido como catión flavilio (13). Su estructura básica consiste de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterocíclico que lleva un oxígeno (C) y unido este último a otro anillo aromático (B) mediante un enlace C-C (15). Sus agliconas, es decir la molécula de antocianina sin el azúcar unido a su estructura, se denominan antocianidinas (13). Las moléculas de azúcar más comúnmente unidas a las antocianidinas son la glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa, pudiendo estar como mono o disacáridos en la estructura (16). Hasta la fecha, han sido aisladas y caracterizadas más de 500 antocianinas y más de 30 antocianidinas, siendo las más comunes en la naturaleza solo

seis antocianidinas: pelargonidina (Pg), cianidina (Cn), peonidina (Pn), delphinidina (Dp), petunidina (Pt) y malvidina (Mv) (13). Cianidina-3-glucósido es la antocianina más común en la naturaleza (14).

Se diferencian unas de otras básicamente por el número y posición del grupo metoxilo u oxhidrilo que forma parte de su estructura, la naturaleza y número de moléculas de azúcar unidos a su estructura además de la posición de esta unión, los carboxilatos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar y la posición de esos enlaces (14).



**Figura 1.** El catión flavilio (13).

**Tabla 1.** Estructuras de las antocianidinas más comunes en la naturaleza (13).

<i>Antocianidinas comunes</i>	Patrón de sustitución						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Cianidina (Ci)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe

Las antocianinas son consideradas moléculas con propiedades fisicoquímicas características, extremadamente inestables y susceptibles a sufrir degradación (15). Dentro de los factores que influyen en la estabilidad de estas moléculas se encuentran la presencia de oxígeno, luz, solventes, enzimas, iones metálicos, temperatura de almacenamiento y pH (15), siendo esta última la causante del cambio reversible de color (17). Son estables a un pH entre 1 y 4: a pH 1 la estructura predominante es el catión flavilio, encargado de dar las tonalidades rojas y púrpuras, entre pH 2 y 4 predominan las bases quinonoidales encargadas

de otorgar las tonalidades azuladas. A un pH mayor que 7, generalmente se encuentran degradadas (15). Estos flavonoides cumplen muchas funciones, la más visible es su habilidad para impartir colores a las plantas en las cuales se encuentran presentes; juegan un rol importante en la atracción de animales para la polinización y dispersión de semillas, además de proteger a las plantas del ataque de patógenos, pestes y contra la luz UV (13). Además de cumplir importantes funciones en las plantas, las antocianinas han demostrado poseer una serie de efectos biológicos entre las que destacan sus efectos antiinflamatorios (18, 19), cardioprotectores (18), antitumorales (20) y su gran poder antioxidante (21). La actividad biológica que más destaca es su poderosa capacidad atrapadora de radicales libres, o efecto antioxidante, la cual juega un rol fundamental en la prevención y mantención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer, entre otras (22, 15).

Una de las principales fuentes de antocianinas son los *berries* (23). Debido a que en su composición química poseen estos flavonoides, presentan gran parte de los efectos recién mencionados. Últimamente se han reportado efectos beneficiosos para la diabetes tipo 2 de las antocianinas contenidas en estos frutos (16). Se han realizado una serie de estudios que han sugerido que las antocianinas ejercen un control glicémico mediante los siguientes mecanismos: protegiendo a las células beta pancreáticas de la toxicidad inducida por glucosa y el estrés oxidativo, actuando como agente antiapoptótico (24), disminuyendo la digestión y absorción de carbohidratos mediante la inhibición de las enzimas alfa-glucosidasa, maltasa, amilasa y sacarasa (25, 26), suprimiendo la producción y liberación de glucosa del hígado; mejorando la captación de glucosa en músculo esquelético, aumentando la actividad de los transportadores GLUT-4 (27, 24, 28), mejorando la función secretora de las células beta pancreáticas (29). Si bien las antocianinas ejercen todas las acciones recién nombradas, poco se sabe de su farmacocinética. Sin embargo, se conoce que son rápidamente absorbidas y eliminadas, alcanzando bajas concentraciones a nivel sistémico luego de su ingesta (23).

#### **2.4. *Aristotelia chilensis***

*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz, comúnmente conocida en Chile y Argentina como maqui, es un árbol perenne autóctono de los bosques subantárticos de Chile y Argentina. Crece y se desarrolla preferentemente en climas mediterráneos semiáridos,

templados húmedos, en quebradas, faldeos de cerros y límites de bosques desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 2500 m.s.n.m., alcanzando hasta 4-5 metros de altura. Se distribuye desde la Región de Coquimbo hasta la de Aysén (de Illapel a Coyhaique). Florece desde octubre hasta principios de noviembre, madurando sus frutos entre diciembre y enero (30).

Tradicionalmente, los indígenas mapuches, han utilizado tanto el fruto como las hojas con fines medicinales; los frutos internamente como tónico, antidiarreico, desinflamante, cicatrizante, digestivo, expectorante, diurético y purgante mientras que las hojas se han utilizado como infusión para el dolor de garganta (31).

Se han reportado varios efectos beneficiosos para la salud de *A. chilensis*, destacándose principalmente su actividad antiinflamatoria (32, 33, 34), gastroprotectora (32), analgésica (33), antiaterogénica y cardioprotectora (35), anticancerígena (34) y su gran poder antioxidante (35, 33, 36). Estas propiedades se le atribuyen mayoritariamente a los compuestos polifenólicos, específicamente las antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides que forman parte de *A. chilensis* (36, 35, 32, 37). Al igual que otros *berries*, *A. chilensis* posee antocianinas dentro de su composición, encargadas de otorgarles el característico color violeta oscuro a sus frutos (38). Sus frutos son considerados entre los que tienen la mayor concentración de antocianinas en comparación con otros *berries* comestibles (39, 40). En los frutos de *A. chilensis* se han aislado y caracterizado 8 antocianinas: delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido, delfinidina-3,5-diglucósido, cianidina-3-sambubiósido-5-glucósido, cianidina-3,5-diglucósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiósido y cianidina-3-glucósido, siendo delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido la más abundante (38).

Sumándose a los efectos biológicos del maqui, durante la última década se ha estado investigando la posible actividad antidiabética de sus frutos. Sin embargo, hasta la fecha hay escasas investigaciones que traten exclusivamente de los efectos antidiabéticos in vitro o in vivo de las antocianinas presentes en el fruto o jugo de *A. chilensis*. Rojo y colaboradores (2012), evaluaron la actividad antidiabética de un extracto estandarizado rico en antocianinas y de la antocianina delfinidina-3-sambubiósido-5-glucósido (D3S5G) en cultivos celulares, específicamente hepatomas celulares H4II y células musculares esqueléticas L6, y en un

modelo murino de diabetes tipo 2. Como resultado obtuvieron que la formulación rica en antocianinas y D3S5G redujeron significativamente la glucosa en ayunas en los ratones obesos diabéticos, sugiriendo además un efecto hipoglicemiante dosis-dependiente. Estos resultados fueron comparados a los producidos por el hipoglicemiante metformina. En hepatomas celulares H4II, el extracto rico en antocianinas disminuyó significativamente la producción hepática de glucosa y en células musculares esqueléticas L6 aumentó significativamente la captación de glucosa (41). Otro estudio llevado a cabo en el país, por Jara y colaboradores (2012), demostró que el tratamiento durante 4 meses con un extracto estandarizado de maqui con un alto contenido en delfinidinas en ratas con diabetes inducida con inyección de estreptozotocina (STZ), disminuyó significativamente los niveles basales de glucosa sanguínea y mejoró la tolerancia a glucosa. Además, delfinidina pura inhibió el transporte de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1) en yeyuno de ratón (42).

## **2.5. Modelo murino de diabetes tipo 2 inducido por dieta alta en grasa**

El modelo murino de diabetes tipo 2 inducido por dieta hipercalórica fue descrito por primera vez por Surwit y colaboradores en el año 1988, el cual indicaba que alimentado ratones machos de la cepa C57BL/6J con una dieta alta en grasa consistente en un pellet con un contenido graso de 36% kcal durante 24 semanas, éstos desarrollaban obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas, considerándose estas características como fenotipo diabético (43). En la actualidad, se sigue usando éste como modelo murino estándar de diabetes tipo 2 con algunas modificaciones, por ejemplo, en lugar de utilizar un alimento con un contenido graso de 36% kcal, se usa uno con un contenido graso de 60% kcal proveniente de grasas saturadas (manteca de cerdo). Este aumento en porcentaje de grasa permite acortar el período de inducción además de generar mayor obesidad (44, 45). En este modelo, los ratones generalmente desarrollan hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas luego de 4 semanas de dieta alta en grasa (45). De preferencia se usa la cepa C57BL/6J porque posee una mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas si reciben dieta hipercalórica en contraste con otras cepas como A/J y C57BL/KsJ que se consideran resistentes (46). A diferencia de la enfermedad desarrollada en humanos, en estos animales no se produce una disfunción en las células beta pancreáticas – evento que

marca el inicio de la diabetes tipo 2- sin embargo, se considera un modelo de diabetes tipo 2 porque comparte las principales características con la enfermedad desarrollada en humanos (47).

Entre las ventajas de este modelo es que simula bastante bien todas las alteraciones metabólicas desarrolladas en personas que llevan este tipo de alimentación (45). Por otra parte, dado a que uno de los principales factores de riesgo para desarrollar insulinoresistencia y diabetes tipo 2 es la obesidad en individuos genéticamente predispuestos, este modelo con ratones de la cepa B6 imita ambas condiciones (46).

Además de inducir obesidad y diabetes tipo 2, la dieta hipercalórica induce dislipidemia (48, 49, 50), hiperleptinemia (49), resistencia a leptina (51) e hígado graso no alcohólico (52, 50).

## **2.6. Distinción de la problemática**

Actualmente, existen varias opciones terapéuticas para el tratamiento de los pacientes diabéticos tipo 2, sin embargo, la mayoría de los fármacos utilizados para esta patología poseen una serie de efectos adversos, lo cual incide en la calidad de vida y en el cumplimiento de la terapia por parte del paciente, y por ende, contribuye a que éste no obtenga el éxito terapéutico y se corra el riesgo de tener un paciente descompensado o que sufra un deterioro en su estado de salud debido al avance de su enfermedad. Dentro de los fármacos de primera línea utilizados en Chile para el tratamiento de la diabetes tipo 2 se encuentran los agentes antidiabéticos metformina y sulfonilureas, prescribiéndose este último en reemplazo a la metformina en caso de intolerancia o contraindicación del fármaco. Estos agentes se utilizan debido a su mayor potencia como hipoglicemiantes, demostrada costo-efectividad y mayor experiencia clínica (4). Sin embargo, los efectos adversos a nivel metabólico, neurológico y sobretodo gastrointestinal, constituyen una amenaza a la calidad de vida de estos pacientes. Lo mismo ocurre con los otros agentes antidiabéticos tales como meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa e inhibidores de la enzima DPP-4 en cuanto a la presencia de efectos adversos que influyen en la calidad de vida de los pacientes diabéticos (6, 12). La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que tengan una

menor incidencia de efectos adversos y contraindicaciones, que funcionen en reemplazo o como coadyuvante al tratamiento antidiabético, es necesaria para mejorar la adherencia del paciente para lograr el éxito terapéutico además de mejorar su calidad de vida.

El fruto del maqui ha sido utilizado durante muchos años debido a sus ya comentadas propiedades biológicas, y hasta el momento no han sido reportados efectos adversos ni tóxicos. Si se corrobora el efecto antidiabético de este fruto, constituiría una buena alternativa para ser utilizado como coadyuvante al tratamiento de la diabetes tipo 2, teniendo como principal ventaja la ausencia de efectos adversos y efectos antioxidantes y cardioprotectores.

### **Hipótesis**

El extracto estandarizado de *A. chilensis* (Molina) Stuntz mejora la condición diabética en un modelo murino de diabetes tipo 2 inducido por dieta alta en grasa.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto antidiabético del extracto estandarizado de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 2 inducido por dieta alta en grasa.

### **Objetivos específicos**

1. Inducir obesidad, diabetes tipo 2 y sus comorbilidades mediante dieta alta en grasa.
2. Evaluar el efecto del extracto estandarizado de *A. chilensis* sobre los niveles sanguíneos en ayunas de glucosa, insulina, incretina GLP-1 activa, triglicéridos, colesterol total plasmático y sobre porcentajes de área de esteatosis hepática administrado oralmente a ratones diabéticos.
3. Comparar el efecto del extracto estandarizado de *A. chilensis* con el de metformina sobre los niveles sanguíneos en ayunas de glucosa, insulina, incretina GLP-1 activa, triglicéridos, colesterol total plasmático y sobre porcentajes de área de esteatosis hepática administrado oralmente a ratones diabéticos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material biológico

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad, provenientes de bioterio del Instituto de Farmacología y Morfofisiología de Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. Estos animales fueron mantenidos en una sala con un ciclo artificial de luz/oscuridad de 12 horas, bajo condiciones estandarizadas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad, además de libre acceso a agua y alimento.

##### 3.1.2. Reactivos químicos

De **Maqui New Life (Santiago, Chile)** se obtuvo el extracto estandarizado en polvo de *Aristotelia chilensis* (35% antocianinas totales y un mínimo de 25% de delfinidinas).

De **Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos)** se obtuvo metformina (1,1-dimetilbiguanida clorhidrato).

De **DragPharma (Santiago, Chile)** se obtuvo ketamina al 10%.

De **CentroVet (Santiago, Chile)** se obtuvo xilazina al 2%.

De **Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, Estados Unidos)** se obtuvieron: High sensitivity GLP-1 active ELISA kit, inhibidor de la enzima DPP-4, etilendiamino tetraacetato (EDTA), paraformaldehído, ácido clorhídrico, borato de sodio, hematoxilina, eosina.

De **ALPCO (Salem, NH, Estados Unidos)** se obtuvo Mouse ultrasensitive insulin ELISA kit.

De **Wiener Lab (Rosario, Santa Fe, Argentina)** se obtuvieron los siguientes reactivos: Glicemia enzimática AA líquida, TG color GPO/PAP AA, Colestat enzimático AA líquido, Standatrol SE 2 niveles, Calibrador A plus.

De **Research Diets Inc.** (New Brunswick, NJ, Estados Unidos) se obtuvieron: pellet D12492 y pellet D12450J.

De **LabDiet** (Saint Louis, MO, Estados Unidos) se obtuvo: pellet Prolab RMH 3000.

### **3.1.3. Equipos**

Los equipos utilizados fueron: Centrífuga Hettich Mikro 220, Centrífuga Eppendorf 5702, pHmetro Hanna pH21, Agitador magnético Merck, Balanza analítica Shimadzu AUW220D, Balanza granataria Soehnle, VarioSkán (Thermo Scientific), Orbital Shaker O3 (Stuart Scientific), Microscopio Olympus BX-51, sonda intragástrica rígida.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Inducción de diabetes mellitus tipo 2 mediante una dieta hipercalórica**

Previamente a ser divididos en grupos de dieta control o dieta alta en grasa, los animales permanecieron en un período de aclimatación en el bioterio de una semana, período en el cual recibieron una dieta normal consistente en el pellet RMH 3000. Luego, los ratones fueron divididos en dos grupos, uno alimentado con dieta control baja en grasa, pellet D12450J con un contenido de 10% kcal grasa (Anexo 1 tabla 3), y otro grupo alimentado con dieta alta en grasa, pellet D12492 (Anexo 1, tabla 4) con un contenido de 60% kcal de grasa. Los animales que recibieron dieta control se mantuvieron separados de los animales alimentados con dieta alta en grasa. Ambas dietas tuvieron una duración de 12 semanas, registrándose los pesos de cada animal una vez por semana utilizando una balanza granataria. Para confirmar que los ratones alimentados con dieta hipercalórica desarrollaron un fenotipo diabético, caracterizado por hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas, al inicio de la semana 13 se obtuvieron muestras sanguíneas de la punta de la cola, aproximadamente 100  $\mu$ L en tubo con EDTA, para determinar los niveles de glicemia e insulina en ayunas. Para ello, los animales permanecieron en ayunas la noche anterior a la extracción de la muestra.

### **3.2.2. Preparación y tratamiento experimental con extracto de *A. chilensis***

Para evaluar el efecto antidiabético del extracto de *A. chilensis*, al término de las 12 semanas de inducción de diabetes tipo 2, a partir de la semana 13, luego de obtener las muestras sanguíneas para confirmar el fenotipo diabético de los animales, se inició el tratamiento experimental con extracto de *A. chilensis* durante 14 días seguidos. Este tratamiento se administró todos los días, aproximadamente a la misma hora (11 am.) mediante sonda intragástrica rígida como una disolución.

El tratamiento experimental se administró de la siguiente manera:

- a. Los animales alimentados con dieta alta en grasa o ratones diabéticos (n=32) se dividieron en 3 grupos experimentales de 8 ratones cada uno: un grupo recibió

extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; otro grupo metformina 300 mg/kg; y al último grupo se le administró vehículo el cual consistía en agua destilada a pH 4.00, dejándose éste último como el control diabético. La dosis de extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg, se obtuvo de estudios preliminares llevados a cabo en el laboratorio del Instituto de Farmacología y Morfofisiología, en donde se trataron a ratones de la cepa B6 obesos y diabéticos con distintas dosis de extracto de *A. chilensis*, en donde la dosis de 5 mg/kg fue la más efectiva en disminuir la glicemia plasmática.

- b. Al grupo alimentado con dieta control baja en grasa se le administró agua destilada a pH 4.00 por la misma vía. Este grupo se dejó como control no diabético (control sano).

Los grupos de tratamiento experimental quedaron conformados de la siguiente forma:

Grupo HFD + EM: grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg (n=8),

Grupo HFD + MET: grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con metformina 300 mg/kg. Este grupo se usó como control positivo (n=8),

Control diabético o Vehículo (HFD+V): grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con vehículo que consistía en agua destilada a pH 4.00 (n=8),

Control no diabético (SD+V): grupo de ratones no diabéticos tratados con vehículo que consistía en agua destilada a pH 4.00 (n=8).

Previa a la administración, las dosis de los activos se preparaban diariamente acorde a los pesos que registraban los animales ese día. Posteriormente a hacer el cálculo de la dosis de cada activo, se procedía a pesar el reactivo en polvo en una balanza analítica, utilizando para ello un eppendorf rotulado. Como vehículo de disolución de los activos, se utilizó agua destilada a pH 4.00, la cual era preparada con agua destilada y ajustada a pH 4.00 utilizando un pHmetro y gotas de HCl 10N. Al momento de administrar el tratamiento, se agregaba al

reactivo previamente pesado en un eppendorf aproximadamente 200  $\mu$ L de vehículo para crear una disolución.

Durante estas dos semanas de tratamiento, los animales siguieron con sus respectivas dietas.

### **3.2.3. Sacrificio de los animales**

Finalizadas las dos semanas de tratamiento con los activos, al inicio de la semana 15, los animales permanecieron toda la noche en ayunas y a la mañana siguiente se obtuvieron muestras sanguíneas mediante punción del seno retro-orbital, aproximadamente 250  $\mu$ L en un tubo con EDTA, siendo los animales previamente anestesiados con una combinación de ketamina y xilazina (3:1) vía intraperitoneal, calculándose las dosis de los anestésicos de acuerdo al peso que registraban los animales el día del sacrificio. Luego de la recolección de muestras sanguíneas, se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical.

Cabe destacar que durante la recolección de las muestras sanguíneas, se agregaron 5  $\mu$ L de inhibidor de la enzima DPP-4 a cada una de las muestras, para evitar la degradación de la incretina GLP-1.

### **3.2.4. Obtención de cortes histológicos de hígado**

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se extrajeron los hígados de cada uno de ellos, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4% e incluídas en parafina. Para realizar los cortes histológicos, las muestras fijadas en parafina fueron cortadas en piezas de 5  $\mu$ m utilizándose un micrótomo y adheridas a un portaobjetos. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina de la siguiente manera: se agregó xilol para remover la parafina de las muestras y se hidrataron los tejidos con agua. A continuación, se sometieron a hematoxilina, se lavaron con agua, se agregó borato de sodio al 1% para acelerar el proceso de tinción, se lavó nuevamente con agua y finalmente se agregó eosina.

### 3.2.5. Procesamiento de muestras sanguíneas y análisis de muestras plasmáticas

Las muestras sanguíneas obtenidas tanto antes como después del tratamiento experimental con los activos fueron centrifugadas inmediatamente después de ser recolectadas a 2000g durante 10 min a 4°C para obtención de plasma sanguíneo. A continuación, las muestras plasmáticas fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis. Los parámetros bioquímicos determinados en las muestras plasmáticas fueron los siguientes: niveles de glucosa en ayunas, insulina en ayunas, incretina GLP-1 activa (7-36), triglicéridos y colesterol total.

#### 3.2.5.1. Determinación de los niveles de glucosa plasmática

Se midieron los niveles de glucosa en ayunas de las muestras plasmáticas obtenidas antes y después del tratamiento experimental con los activos mediante el método enzimático-colorimétrico GOD/POD. Para ello, se utilizó el kit de glicemia enzimática AA líquida (Wiener lab) en una microplaca de 96 pocillos. Este método se basa en que la glucosa presente en las muestras plasmáticas es oxidada a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno formado reacciona en presencia de la enzima peroxidasa (POD) con 4-aminofenazona (4-AP) y fenol para formar una quinonaimina roja (cromógeno), la cual es determinada a una longitud de onda de 505 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de glucosa de las muestras.

#### Reacción



## Procedimiento

200  $\mu\text{L}$  de reactivo A (solución de glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF), buffer fosfatos pH 7,0 y 4-hidroxibenzoato) se agregaron en cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. A continuación, se procedió a agregar 2  $\mu\text{L}$  de plasma de cada ratón en cada uno de los pocillos. Al finalizar este paso, la microplaca se agitó, incubó a  $37,5^{\circ}\text{C}$  y posteriormente leyó en un lector de microplacas (VarioSkan Flash) a un  $\lambda = 505 \text{ nm}$ . Para conocer la concentración de cada muestra, se realizó una curva de calibración con diluciones del estándar de glicemia 1 g/L, y mediante regresión lineal se interpolaron las concentraciones de cada muestra plasmática.

### **3.2.5.2. Determinación de los niveles de colesterol total plasmático**

Para la determinación de los niveles de colesterol total en las muestras plasmáticas post tratamiento experimental con los activos, se llevó a cabo el método enzimático-colorimétrico CHOD/POD. Para ello se utilizó en kit colestat enzimático AA líquido (Wiener lab) en una microplaca de 96 pocillos. La enzima colesterol esterasa presente en la solución de reacción hidroliza los ésteres de colesterol presentes en las muestras plasmáticas para liberar colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol libre es oxidado por la enzima colesterol oxidasa para formar colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno. A continuación, la enzima peroxidasa cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y fenol para formar el complejo rosado 4-p-benzoquinona-monoimino-fenazona, el cual absorbe a la longitud de onda de 505 nm.

## Reacción



## Procedimiento

Se procede de manera similar al análisis de glicemia descrito anteriormente. A diferencia del análisis anterior, los 200 µL de reactivo A que se agregan a cada pocillo están compuestos de solución de colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF), fenol y colato de sodio.

### **3.2.5.3. Determinación de los niveles de triglicéridos plasmáticos**

Para determinar los niveles de triglicéridos plasmáticos de las muestras plasmáticas post tratamiento, se llevó a cabo el método enzimático-colorimétrico GPO/PAP con la ayuda del kit TG color GPO/PAP AA líquido (de Wiener lab.) en una microplaca de 96 pocillos.

El método GPO/PAP se basa en que los triglicéridos presentes en las muestras plasmáticas son hidrolizados por la enzima lipoprotein lipasa para liberar ácidos grasos y glicerol. Luego, la enzima glicerol kinasa que viene dentro del reactivo, convierte el glicerol en glicerol-1-P el cual es oxidado por la enzima glicerol fosfato oxidasa a dihidroxiacetonafostato y peróxido de hidrógeno. Finalmente, la peroxidasa cataliza la reacción enzimática de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con 4-AF y 4-clorofenol para formar 4-p-benzoquinona-monoimino-fenazona, la cual absorbe a 505 nm.

## Reacción



## Procedimiento

Se procede de manera similar al análisis de glicemia y colesterol descrito anteriormente. A diferencia del análisis anterior, los 200 µL de reactivo A que se agregan a

cada pocillo están compuestos de solución de colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF), fenol y colato de sodio.

#### **3.2.5.4. Determinación de los niveles de insulina en ayunas**

Los niveles de insulina plasmática en ayunas fueron determinados en las muestras obtenidas antes y después del tratamiento experimental con los activos, mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas tipo sándwich (ELISA) con la ayuda del kit Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA (ALPCO). Esta técnica se basa en que cada uno de los pocillos de una microplaca se recubre con un anticuerpo primario – o anticuerpo de captura – específico para un antígeno. Luego se aplica la muestra problema que posee el antígeno, en este caso insulina, el cual queda retenido en el pocillo por el anticuerpo de captura, se elimina el material no retenido mediante lavado y se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo de detección conjugado con una enzima, el cual se une al complejo antígeno-anticuerpo de captura previamente formado. Un sustrato que da un producto coloreado (sustrato cromogénico) es agregado y el producto coloreado formado es detectado mediante medición de absorbancia (53).

#### Procedimiento

Con la ayuda de una micropipeta, se agregaron en sus respectivos pocillos de una microplaca de 96 pocillos recubierto con anticuerpo de captura, 5  $\mu$ L de estándar, controles de calidad y muestras plasmáticas, teniendo la precaución de que la punta del tip de la micropipeta no toque el pocillo y que la muestra quede lo más central posible. A continuación, se agregaron 75  $\mu$ L de conjugado y se dejó incubar durante 2 horas en un microshaker a 700-900 rpm. Finalizada la incubación, se lavó completamente la microplaca con buffer de lavado 6 veces seguidas. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de TMB y nuevamente se dejó incubar durante 30 minutos. Finalmente se agregaron 100  $\mu$ L de solución stop y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

### **3.2.5.5. Determinación de los niveles de incretina GLP-1 activa (7-36)**

Se determinaron los niveles de incretina GLP-1 activa (7-36) en las muestras plasmáticas obtenidas post tratamiento con los activos. Para ello, al igual que insulina, se utilizó la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas tipo sándwich con la ayuda del kit High Sensitive GLP-1 Chemiluminiscent ELISA (Merck Millipore). El principio que rige este ensayo es similar al ensayo realizado para insulina, diferenciándose de este último solamente que el sustrato final es quimioluminiscente.

#### Procedimiento

Se pipetea 50  $\mu$ L de Solución Matriz a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos en donde se agregarán el blanco, estándares y controles de calidad. A continuación, se agregan 50  $\mu$ L de Buffer de Ensayo a cada pocillo en donde posteriormente se agregará el blanco y las muestras plasmáticas; luego se agregan 50  $\mu$ L de los estándares, controles de calidad y muestras plasmáticas en sus respectivos pocillos. Posteriormente, se agregan 20  $\mu$ L de Anticuerpo de Captura para GLP-1 en cada uno de los pocillos de la microplaca y se deja incubar durante 2 horas en un microshaker a 400-500 rpm. Finalizada la incubación, se lava completamente la microplaca con buffer de lavado 3 veces seguidas. Luego, se agregan 100  $\mu$ L de Anticuerpo de Detección a cada uno de los pocillos, se deja incubar durante 1 hora y terminada la incubación, se lava la microplaca 3 veces seguidas con buffer de lavado. A continuación, se agregan 100  $\mu$ L de Solución enzimática y se deja incubar durante 30 minutos. Terminada la incubación, se lava microplaca con buffer de lavado 6 veces seguidas. Finalmente, se agregan 100  $\mu$ L de Solución de Sustrato y se lee la absorbancia en un lector de microplacas (luminómetro) a una longitud de onda de 425 nm dentro de los siguientes 5 minutos de agregar el último reactivo.

### **3.2.6. Análisis de los cortes histológicos de hígado**

Los cortes histológicos de hígado fueron analizados con microscopía óptica (Microscopio Olympus BX-51) midiéndose los porcentajes de esteatosis característica de hígado graso no alcohólico en cada uno de ellos.

Se capturaron entre 5 y 7 imágenes al azar de venas centrales de lobulillos hepáticos en cada corte histológico con el software Q capture. Luego, se midieron las infiltraciones lipídicas micro y macrovasculares en cada una de estas fotos con un analizador de imágenes automatizado (Image J Software versión 1.48), el cual mide el porcentaje de área de esteatosis definido como la superficie de agujeros vacíos (vacuolas lipídicas) dentro del tejido hepático. Posteriormente, se calculó un promedio de los porcentajes de área de esteatosis de cada corte y estos promedios fueron ordenados por grupo experimental en el programa GraphPad Prism versión 6.0 para realizar el análisis estadístico.

### **3.2.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar significancia entre tres o más grupos en conjunto con el test de comparaciones múltiples de Tukey. Cuando las variables no tenían una distribución normal, los grupos experimentales fueron comparados usando el test de Kruskal-Wallis. El análisis entre dos grupos (pre tratamiento) se realizó mediante el test t-Student.

Para determinar el tipo de distribución de las variables, éstas se sometieron al test de normalidad de D'Agostino-Pearson, además del test de Bartlett para comprobar homogeneidad de varianzas. Diferencias con un valor  $p < 0,05$  fueron consideradas significativas. El software utilizado fue GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

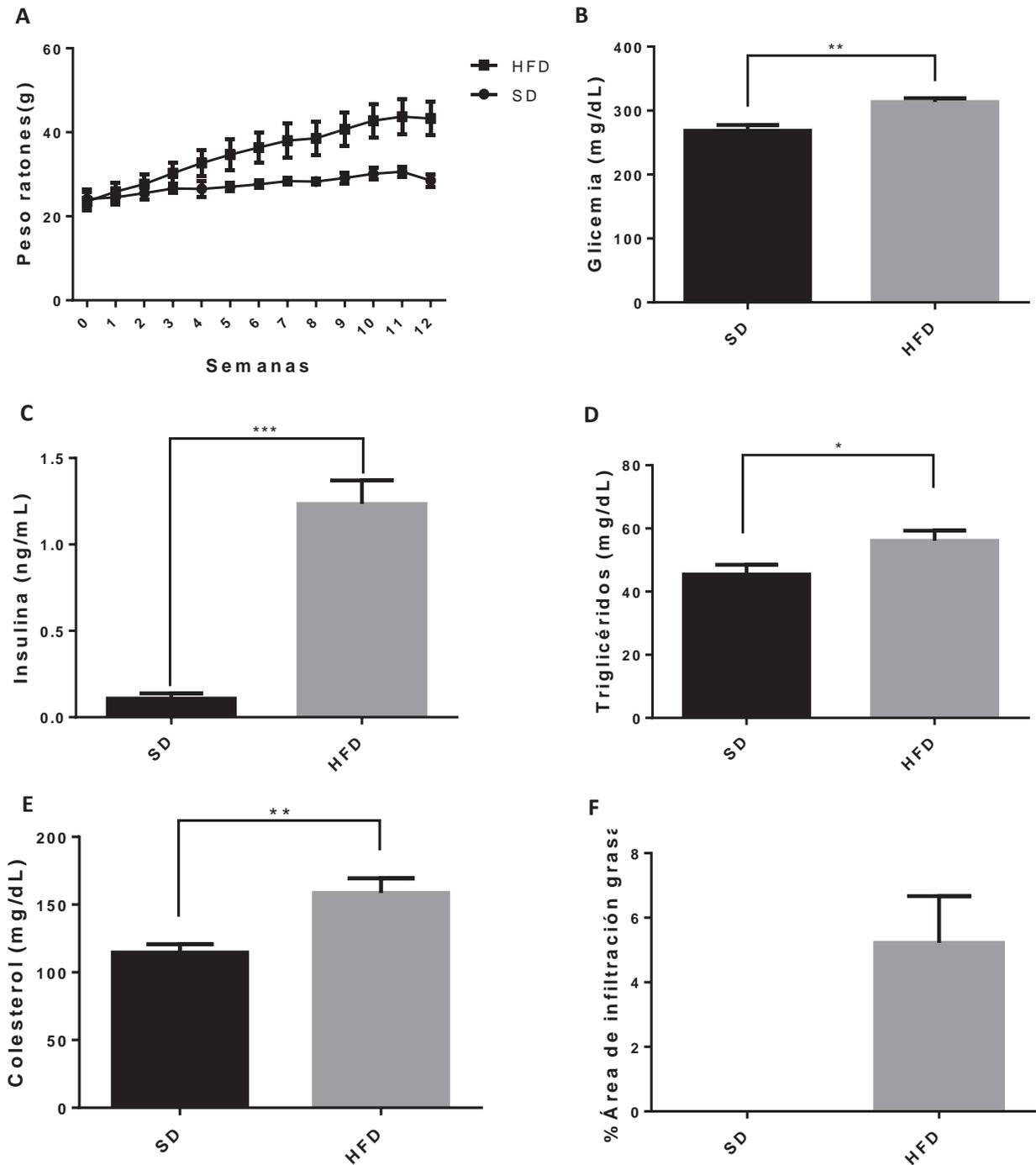
### 4.1. Desarrollo de obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y sus comorbilidades mediante dieta hipercalórica

Para corroborar si los ratones de la cepa C57BL/6J alimentados durante 12 semanas con dieta alta en grasa desarrollaron obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas, en primera instancia se registraron semanalmente los pesos tanto de los ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD) como los ratones alimentados con dieta estándar baja en grasa (SD) y graficó la curva de peso de ambos grupos. Como se aprecia en la **figura 2A**, durante las 12 semanas, los animales alimentados con dieta alta en grasa (HFD) aumentaron gradualmente de peso en comparación con los animales alimentados con dieta estándar baja en grasa (SD) cuyos pesos se mantuvieron relativamente constantes. Finalizadas las 12 semanas, el grupo alimentado con dieta alta en grasa aumentó significativamente de peso en comparación con el grupo de dieta control.

Para comprobar la presencia de hiperglicemia e hiperinsulinemia en los ratones alimentados con dieta alta en grasa, finalizadas las 12 semanas de dieta se obtuvieron muestras de plasma de ambos grupos (SD y HFD) y se midieron los niveles de glicemia e insulina en ayunas. En la **figura 2B**, se puede observar que los niveles de glicemia en ayunas de los ratones alimentados con una dieta alta en grasa fueron significativamente mayores que los animales alimentados con dieta estándar baja en grasa ( $p < 0,01$ ). En la **figura 2C**, se puede apreciar que hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de insulina en ayunas de los ratones alimentados con dieta alta en grasa en comparación con los ratones que recibieron dieta estándar baja en grasa ( $p < 0,001$ ).

Finalmente, para corroborar el desarrollo de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hígado graso no alcohólico en los animales que recibieron dieta hipercalórica, al término de las 14 semanas se obtuvieron muestras plasmáticas y cortes histológicos de hígado, determinándose los niveles basales de triglicéridos, colesterol total plasmáticos y porcentajes de esteatosis hepática, respectivamente. En las figuras **2D** y **2E**, se puede observar que finalizadas las 14 semanas de dieta hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de triglicéridos ( $p < 0,05$ ) y colesterol total plasmáticos ( $p < 0,01$ ) en los ratones

alimentados con dieta hipercalórica en comparación con los animales alimentados con dieta baja en grasa. En la figura 2F, se puede apreciar que en los ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD) hubo un aumento en el porcentaje de área de infiltración de grasa hepática, mientras que en el grupo alimentado con dieta control baja en grasa (SD) no desarrolló esteatosis hepática finalizadas las 14 semanas de dieta.



**Figura 2. Inducción de obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia e hígado graso no alcohólico mediante dieta hipercalórica.** (A) Registro de los pesos de los ratones alimentados con dieta estándar baja en grasa (SD) y dieta alta en grasa (HFD) durante las 12 semanas de inducción, (B) Niveles de glicemia y (C) de insulina en ayunas de los ratones alimentados con dieta estándar (SD) y dieta alta en grasa (HFD) luego de las 12 semanas de dieta y previo al inicio del tratamiento experimental con los activos. (D) Niveles basales de triglicéridos y (E) de colesterol total plasmático de los ratones alimentados con dieta estándar (SD) y dieta alta en grasa (HFD) luego de las 14 semanas de dieta. (F) Porcentajes de área de infiltración de grasa hepática del grupo alimentado con dieta control baja en grasa (SD) y del grupo alimentado con dieta hipercalórica (HFD) al término de las 14 semanas de dieta. Los datos corresponden al promedio con su error estándar de un n= al menos 6 ratones. Diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se representan con asteriscos (\*) en donde \*p< 0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.

**Tabla 2.** Pesos de los ratones alimentados con dieta control baja en grasa (SD) y dieta alta en grasa (HFD), al inicio de la dieta (semana 0) y finalizadas las 12 semanas (n=8 para SD, n=32 para HFD).

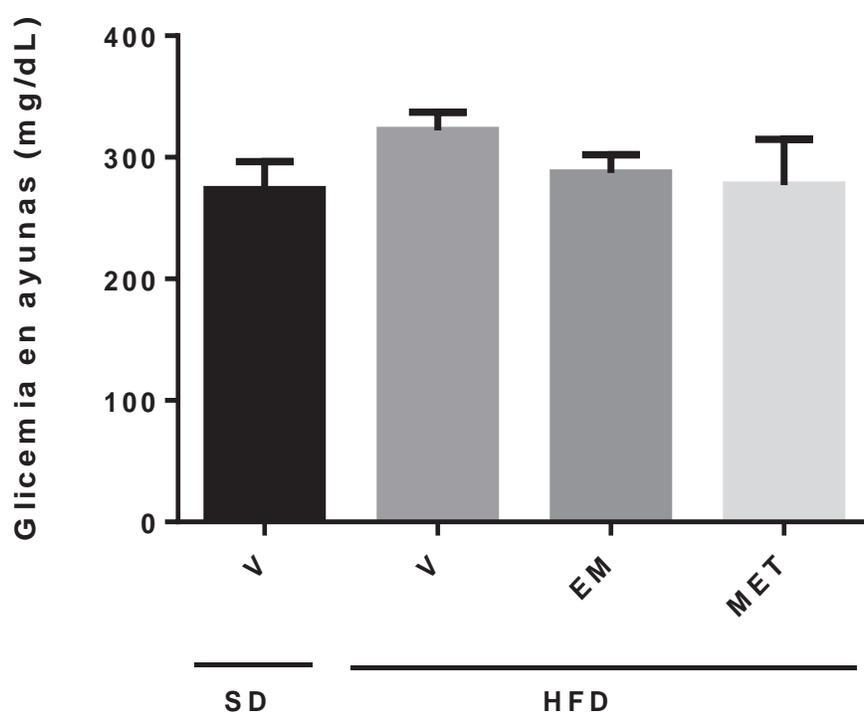
	SD	HFD	P(x) observada
Pesos semana 0 (g)	24,14±2,268	23,52± 2,205	n.s.
Pesos semana 12 (g)	28,50±1,414	43,29 ± 3,940	<0.0001

#### 4.2. Determinación del efecto antidiabético del extracto de *A. chilensis*

Para evaluar el efecto antidiabético del extracto de *A. chilensis*, al grupo de ratones diabéticos se les trató con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg, metformina 300 mg/kg (como control positivo), o vehículo (agua destilada a pH 4,00). Todos los tratamientos fueron administrados oralmente mediante sonda intragástrica rígida durante 14 días seguidos.

#### 4.2.1. Efecto del extracto de *A. chilensis* sobre los niveles de glicemia plasmática en ayunas

En la **figura 3**, se puede apreciar que hubo una tendencia a disminuir los niveles de glicemia en ayunas en los animales tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg en comparación con el control diabético, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa. Lo mismo se observa en el grupo tratado con el control positivo metformina 300 mg/kg.

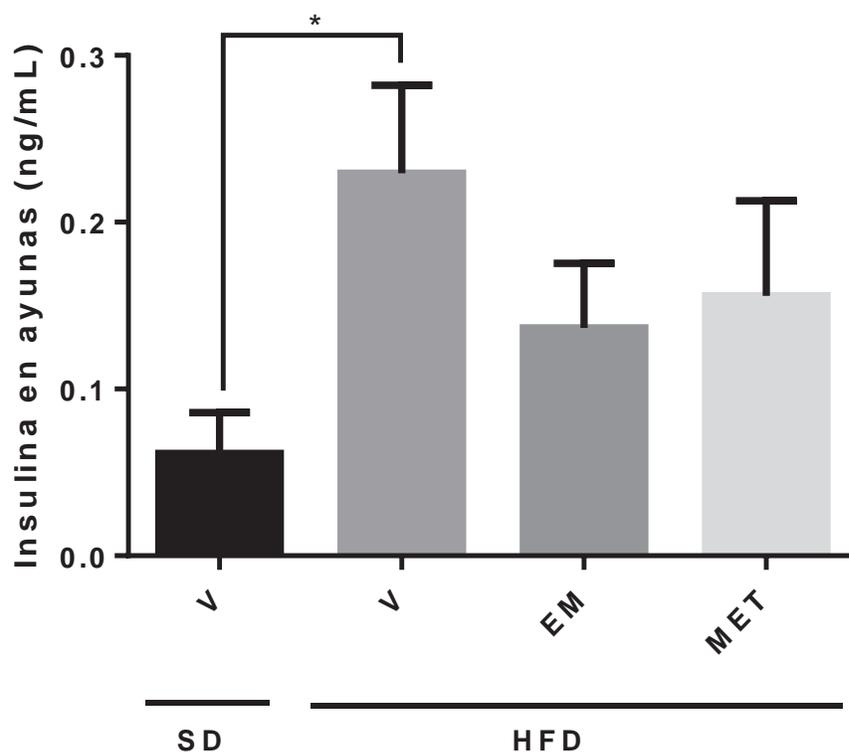


**Figura 3. Niveles de glicemia en ayunas finalizado el tratamiento experimental con los activos.** Luego de 14 días consecutivos de tratamiento experimental con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg, metformina 300 mg/kg o agua destilada a pH 4.00 (vehículo), se obtuvieron muestras plasmáticas de cada ratón y se midieron los niveles de glicemia en ayunas mediante el método GOD/POD. Cada barra representa el promedio de los niveles de glicemia en ayunas para cada tratamiento con su error estándar (n= al menos 6 ratones para cada grupo experimental). (SD + V: grupo de ratones alimentados con dieta control baja en

grasa tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con metformina 300 mg/kg).

#### 4.2.2. Efecto del extracto de *A. chilensis* sobre los niveles de insulina en ayunas

Como se puede apreciar en la **figura 4**, se produjo una disminución del valor promedio de insulina basales en el grupo tratado con extracto de *A. chilensis* en comparación con el control diabético, mas esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Lo mismo se observa para el grupo tratado con metformina.

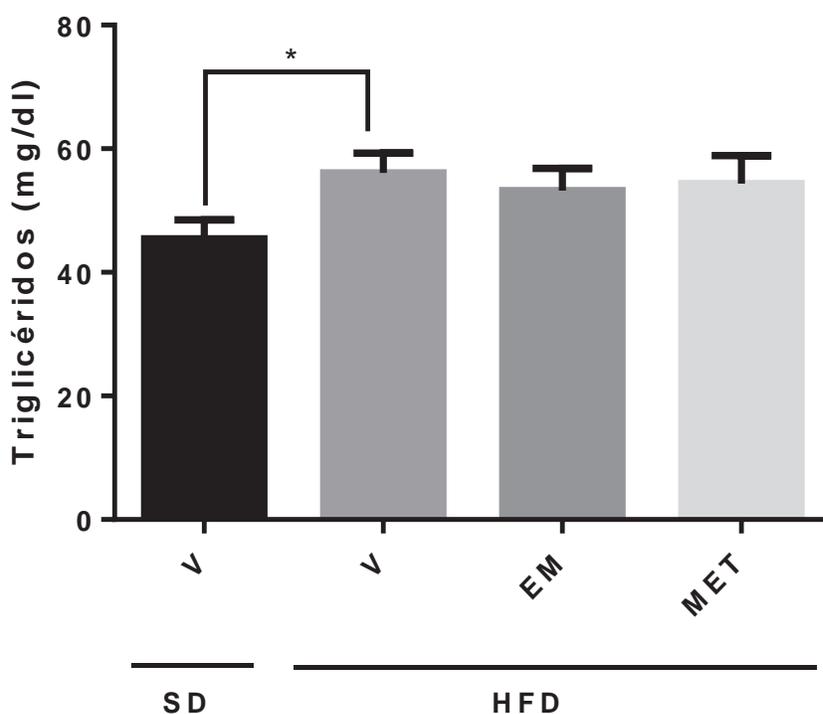


**Figura 4. Niveles plasmáticos de insulina en ayunas post tratamiento con los activos.** Cada una de las barras representa la media de los niveles basales de insulina con su error estándar (n= al menos 6 ratones para cada grupo experimental). \*  $p < 0,05$  respecto al control

diabético (HFD+V). (SD + V: grupo de ratones alimentados con dieta control baja en grasa tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con metformina 300 mg/kg).

#### 4.2.3. Efecto del extracto de *A. chilensis* sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos en ayunas

En la **figura 5**, se puede observar que no hubo diferencias significativas en el grupo HFD + EM respecto al control diabético. Resultados similares se observaron con el grupo tratado con metformina.

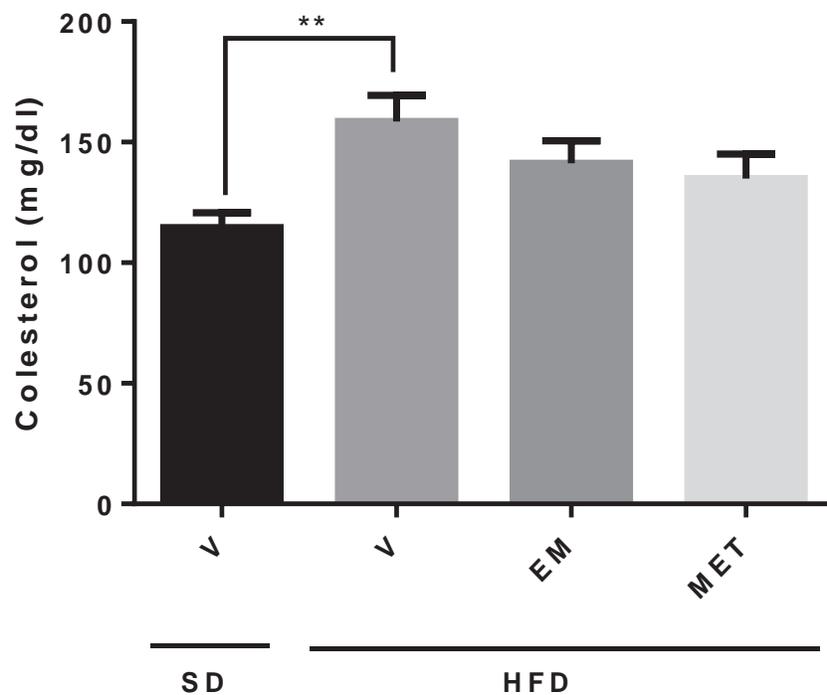


**Figura 5.** Niveles de triglicéridos plasmáticos luego de 14 días consecutivos de tratamiento experimental con extracto de *A. chilensis*, metformina y vehículo. El análisis de los niveles de triglicéridos plasmáticos se realizó mediante el método colorimétrico

GPO/PAP en una microplaca de 96 pocillos. Cada una de las barras representa la media + error estándar (n= 6-8 ratones para cada grupo experimental). \*p<0,05 respecto al control diabético. (SD + V: grupo de ratones alimentados con dieta control baja en grasa tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con metformina 300 mg/kg).

#### 4.2.4. Efecto del extracto de *A. chilensis* sobre los niveles basales de colesterol total plasmático

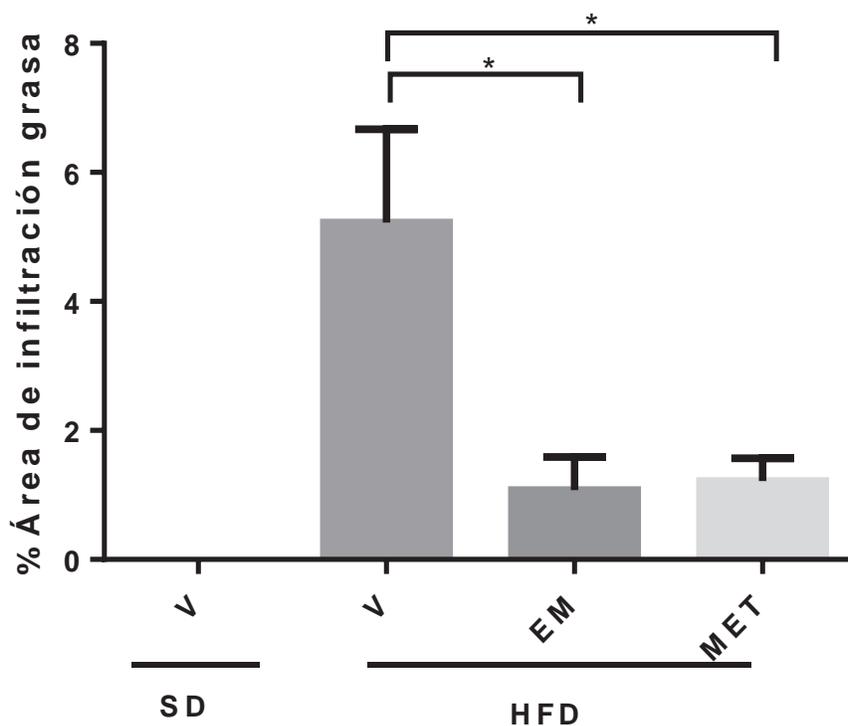
En la **figura 6**, se puede apreciar que hubo una tendencia a disminuir los niveles de colesterol total en el grupo HFD + EM y en el grupo HFD + MET respecto al control diabético, mas esta disminución no alcanzó significancia estadística.



**Figura 6. Niveles de colesterol total plasmático post tratamiento con extracto de *A. chilensis*, metformina o vehículo en los animales con dieta alta en grasa.** Los datos corresponden a la media + error estándar de n= al menos 6 ratones. \*\*p<0,01 respecto al control diabético. (SD + V: grupo de ratones alimentados con dieta control baja en grasa tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con metformina 300 mg/kg).

#### 4.2.5. Efecto del extracto de *A. chilensis* sobre los porcentajes de infiltraciones grasas características de hígado graso no alcohólico.

Como se puede observar en la **figura 7**, en el grupo tratado con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg se produjo una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de área infiltración de grasa hepática en comparación con el control diabético (V). Este efecto fue similar a lo observado en el grupo tratado con metformina 300 mg/kg.



**Figura 7. Porcentajes de área de infiltración de grasa hepática luego de 14 días consecutivos de tratamiento experimental con extracto de *A. chilensis*, metformina o vehículo.** Cada columna representa el promedio con su error estándar (n= al menos 6 ratones para cada grupo experimental). Diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se representan con asteriscos (\*) en donde \*p< 0,05. (SD + V: grupo de ratones alimentados con dieta control baja en grasa tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa tratados con metformina 300 mg/kg).

## 5. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica cuya prevalencia va en aumento, principalmente por los malos hábitos alimentarios y vida sedentaria que conducen al sobrepeso y obesidad. La obesidad es uno de los principales factores de riesgo, en individuos genéticamente predispuestos, para desarrollar insulinoresistencia, y en consecuencia si no se toman medidas dietéticas o farmacológicas, diabetes mellitus tipo 2 (5,7).

En este trabajo, los ratones machos de la cepa C57BL/6J luego de 12 semanas de ser alimentados con dieta alta en grasa, específicamente el pellet D12492 con un contenido graso de 60% kcal, desarrollaron obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas en comparación con el grupo alimentado con dieta control, características de un fenotipo diabético (43, 46). Además, finalizadas las 14 semanas bajo la misma dieta, desarrollaron hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia tal como ha sido previamente descrito en modelos de obesidad y síndrome metabólico inducido por dieta alta en grasa (48, 49, 50).

Aunque esta cepa alimentada con dieta hipercalórica no desarrolla diabetes mellitus tipo 2, porque no se observa una disfunción y atrofia en las células beta pancreáticas – evento que marca el inicio de la enfermedad – se considera un modelo murino de diabetes tipo 2 porque comparte las principales características con la patología desarrollada en humanos, la hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatoria en ayunas (46, 47). En estos experimentos, los animales se encontraban más hiperinsulinémicos que hiperglicémicos, lo que corrobora la hiperinsulinemia compensatoria observada en la insulinoresistencia (5).

Los ratones alimentados con dieta control baja en grasa manifestaron niveles de glicemia en ayunas elevados finalizadas las 12 semanas (aproximadamente 280 mg/dL). Estos niveles son contradictorios, ya que estos animales al recibir una dieta baja en grasa se mantienen en condiciones normales sin desarrollar obesidad, hiperglicemia ni hiperinsulinemia (46). Hay reportes acerca de que animales sometidos a un agente estresante, se produce hiperglicemia en respuesta a un aumento en la secreción de cortisol, en el caso de estrés crónico, y de adrenalina, en el caso de estrés agudo que estimulan receptores alfa y beta-adrenérgicos (54, 55).

El tratamiento con el extracto de *A. chilensis* en la dosis de 5 mg/kg, produjo una tendencia a disminuir los niveles de glicemia e insulina en ayunas, mas esta disminución no alcanzó significancia estadística. En contraste con estudios llevados a cabo por Jara y col. (2012) en ratas diabéticas y Rojo y col. (2012) en ratones de la cepa B6, en los cuales trataron dichos animales con un extracto estandarizado de *A. chilensis* durante 4 meses y en una sola dosis, respectivamente, se produjo una disminución significativa en los niveles de glicemia basales y posprandiales (41, 42). Además, en el estudio realizado por Rojo y col, se sugiere un efecto sensibilizador de insulina de maqui, ya que *in vitro* disminuyó la gluconeogénesis hepática y aumentó la captación de glucosa en miotubos L6 (41). Por otra parte, en el grupo tratado con metformina 300 mg/kg tampoco se produjeron cambios significativos. Estos resultados con metformina llaman la atención, ya que este fármaco es conocido principalmente por ser un sensibilizador de insulina con una amplia experiencia clínica, eficaz en disminuir la hiperglicemia, motivo por el cual se utilizó como control positivo (6). Además, la dosis escogida es considerada elevada, la cual produce un efecto sensibilizador de insulina e hipoglicemiante al ser administrada durante un período de 14 días consecutivos en ratones diabéticos y obesos de la cepa B6 (56). Los resultados obtenidos con glicemia podrían explicarse por el estrés inducido por la vía de administración el cual, como antes se mencionó, produce un aumento en los niveles de cortisol y adrenalina que estimulan receptores adrenérgicos gatillando una hiperglicemia. Los resultados no significativos obtenidos con insulina podrían explicarse por la misma causa, ya que el estrés también produce una inhibición de la secreción de insulina a nivel de las células beta pancreáticas, además, la elevada dispersión observada dentro de los mismos grupos experimentales podrían contribuir con resultados no significativos. Juntos estos resultados, podrían sugerir que el estrés inducido por la vía de administración, sonda intragástrica rígida, estaría dificultando la cuantificación de insulina y glicemia en los distintos tratamientos (Figura 9, anexo 3).

En la determinación de los niveles de la incretina GLP-1 activa (7-36) en las muestras plasmáticas obtenidas post tratamiento, varios animales de los grupos control diabético, control no diabético y grupo EM registraron valores por debajo de la curva de calibración, por lo que no se pudo determinar la concentración, pudiéndose cuantificar 1 de 8, 2 de 8 y 2 de 8, respectivamente. Sin embargo, al graficar los distintos grupos experimentales se ve una

tendencia a aumentar los niveles de GLP-1 en el grupo tratado con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg y metformina 300 mg/kg, alcanzando valores sobre el control no diabético (Figura 8 y Tabla 5, anexo 2). Hay estudios que han demostrado que las antocianinas y metformina producen un aumento de la secreción de GLP-1 a nivel intestinal (57, 56). Los valores no cuantificables en los animales del grupo control diabético podrían explicarse por la disminución en la secreción de GLP-1 por parte de las células tipo L intestinales en la diabetes tipo 2 (6).

Al igual que en los resultados obtenidos con glicemia e insulina, el tratamiento con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg y metformina 300 mg/kg produjo una tendencia a disminuir los niveles de triglicéridos y colesterol total plasmáticos, no alcanzándose significancia estadística. Una posible causa de estos resultados no significativos en el grupo tratado con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg podría ser que la dosis administrada o el período de tratamiento fueron insuficientes para producir un cambio significativo. Aunque se han descrito efectos hipolipemiantes significativos en animales tratados con distintas antocianinas (58, 59) y con metformina (60) durante un período de 4 a 12 semanas, otros estudios han reportado solo una leve disminución, similar a la observada en estos experimentos tanto para antocianinas (61, 62) y metformina (63).

El hígado graso no alcohólico es una patología asociada a la obesidad e insulinoresistencia a nivel hepático. Es considerada la manifestación hepática de la resistencia a insulina y una comorbilidad en pacientes con diabetes tipo 2 (11). Se produce cuando la tasa de síntesis de triglicéridos a nivel hepático excede el catabolismo de los mismos (64). Su fisiopatología aún no se conoce completamente, sin embargo se postula que la acumulación de ácidos grasos en los hepatocitos en forma de diacilglicerol, activa la PKC $\epsilon$  que finalmente produce una alteración en la señalización de insulina que conlleva la resistencia a insulina hepática y desarrollo de hígado graso no alcohólico (11, 64). En esta tesis, los ratones de la cepa C57BL/6J luego de 14 semanas de dieta hipercalórica desarrollaron infiltraciones lipídicas macrovasculares y microvasculares características del hígado graso no alcohólico. Una dieta hipercalórica administrada a ratones de la cepa B6, además de inducir obesidad, hiperglicemia e hiperinsulinemia, dislipidemia induce hígado graso no alcohólico (52, 65). En los grupos de ratones tratados con extracto de *A. chilensis*

5 mg/kg y metformina 300 mg/kg, se produjo una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de área de infiltración grasa luego de 14 días consecutivos de tratamiento. Jayaprakasam y col. (2006) demostraron que el tratamiento con un extracto purificado de antocianinas durante 8 semanas redujo significativamente los niveles de lípidos hepáticos sugiriendo como mecanismo que este efecto podría deberse a un aumento en la beta oxidación de ácidos grasos y una disminución de la lipogénesis a nivel hepático (66). Posteriormente, Guo y col. (2012) publicaron que el tratamiento con C3G durante 5 semanas redujo significativamente los porcentajes de esteatosis hepática (67). Por otra parte, el tratamiento con metformina en la dosis de 150 mg/kg en ratones de la cepa B6 con hígado grasoso no alcohólico inducido por dieta hipercalórica, produjo una disminución significativa en la esteatosis hepática (68).

Los resultados obtenidos con extracto de maqui sobre hígado grasoso no alcohólico son prometedores, sin embargo llama la atención que no exista correlación con los resultados obtenidos sobre los niveles de lípidos plasmáticos, ya que si *A. chilensis* produce una disminución significativa en los porcentajes de esteatosis hepática también debería disminuir significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol total plasmáticos. Esta no correlación podría deberse a que las infiltraciones lipídicas en hígado fueron determinadas con microscopía óptica, no pudiéndose distinguir si estas vacuolas estaban constituidas exclusivamente de triglicéridos o de una mezcla de triglicéridos y colesterol. Es probable que la mayor parte de las vacuolas lipídicas cuantificadas consistieran de una mezcla de triglicéridos y colesterol.

A pesar de que el modelo de inducción de obesidad, resistencia a insulina e intolerancia a glucosa mediante dieta hipercalórica fue exitoso, la vía de administración altamente invasiva y estresante para los animales, estaría imposibilitando ver el verdadero efecto de *A. chilensis* sobre los niveles de glicemia e insulina basales. Se sugiere realizar nuevos estudios *in vivo* tratando de eliminar o reducir al mínimo, las variables de confusión, en este caso el estrés por la vía de administración en los animales. Esto significaría tratar de manipular a los animales la menor cantidad de veces posible, y utilizar una vía de administración alternativa para los tratamientos.

El mejoramiento en los porcentajes de esteatosis hepática obtenidos con el tratamiento durante 14 días con extracto de maqui en la dosis de 5 mg/kg abren la posibilidad de continuar con estudios clínicos en pacientes con hígado graso no alcohólico como comorbilidad de diabetes tipo 2 o como patología no asociada. Si en estos estudios se confirman los resultados obtenidos sobre hígado graso no alcohólico, el extracto de maqui se convertiría en una nueva alternativa terapéutica en beneficio de pacientes diabéticos o no diabéticos con esteatosis hepática. Este extracto podría administrarse como reemplazo, en el caso de pacientes reacios a tomar la medicación convencional, o como coadyuvante al tratamiento de esta patología.

## 6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede concluir que:

- Los ratones machos de la cepa B6 alimentados con dieta hipercalórica desarrollaron hiperglicemia e hiperinsulinemia en ayunas luego de 12 semanas, además de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hígado graso no alcohólico al término de las 14 semanas de la misma dieta, en comparación con el grupo alimentado con dieta control.
- El extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg administrado durante 14 días consecutivos en ratones obesos y diabéticos de la cepa B6 mediante sonda intragástrica no disminuyó los niveles basales de glicemia, insulina, triglicéridos y colesterol total plasmáticos. La ausencia de respuesta también se observó con el control positivo metformina 300 mg/kg.
- El extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg administrado durante 14 días consecutivos en ratones obesos y diabéticos de la cepa B6 mediante sonda intragástrica produjo una mejoría significativa en los porcentajes de esteatosis hepática característica de hígado graso no alcohólico, siendo esta mejoría comparable a la producida con el tratamiento con metformina 300 mg/kg. Estos resultados sugieren un efecto principal de maqui sobre esteatosis.
- El estrés producido por la vía de administración fue un factor importante que pudo interferir con los efectos de fármacos en el control de glicemia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek, CJ et al. National, regional and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011; 378 (9785): 31-40.
2. WHO. Diabetes Fact Sheet n°312 [Internet]. United States: WHO [Updated 2015 january; cited 2015 february 7]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
3. WHO. 10 Facts about diabetes [Internet]. United States: WHO [Updated 2015 january; cited 2015 february 7]. Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/>
4. Ministerio de Salud. *Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2*. Santiago: MINSAL; 2010.
5. Guyton, A, Hall J. Insulina, glucagón y diabetes mellitus. En: Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica*. 12° ed. Barcelona: Elsevier España; 2011. p. 939-954.
6. Triplitt CL, Reasner CA, Isley WL. Diabetes mellitus. En: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic approach*. 7° ed. Nueva York: Mc Graw-Hill; 2008. p. 1205-1241.
7. Fonseca V, John-Kalarickal J. Type 2 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. En: Poretzky L. *Principles of Diabetes Mellitus*. 2° ed. Nueva York: Springer; 2010. p. 203-220.
8. Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun Rev*. 2014; 13 (4-5): 403-407.

9. Rang HP, Dale MM., Ritter JM, Moore PK. El páncreas endocrino y el control de la glicemia. En: Rang HP, Dale MM., Ritter JM, Moore PK. *Farmacología*. Madrid: Elsevier España; 2003. p. 380-393.
10. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009; 5 (3): 150-159.
11. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GL. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014; 510 (7503): 84–91.
12. Powers AC, D'Alessio D. Páncreas endocrino y farmacoterapia de la diabetes mellitus e hipoglucemia. En: Brunton L, Chabner B, Knollmann BC. Goodman & Gilman: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12° ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2012. p. 1237-1273.
13. Andersen OM, Jordheim M. The anthocyanins. En: Andersen OM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Edición. Nueva York: CRC Press; 2005. p. 471–552.
14. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003; 64 (5); 923-933.
15. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chem*. 2009; 113: 859-871.
16. Guo H, Xia M. Anthocyanins and diabetes regulation. En: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. *Polyphenols in human health and disease*. Nueva York: Academic Press; 2013. p. 83-93.
17. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci Tech*. 2005; 16 (9): 423–428.

18. Kruger MJ, Davies N, Myburgh KH, Lecour S. Proanthocyanidins, anthocyanidins and cardiovascular diseases. *Food Res Int.* 2014; 59: 41-52.
19. Szymanowska U, Zlotek U, Karas M, Baraniak B. Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chem.* 2015; 172: 71-77.
20. Faria A, Pestana D, Teixeira D, De Freitas V, Mateus N, Calhau C. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: Anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytother Res.* 2010; 24 (12): 1862-1869.
21. Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Olivera, J., Fernandes, A, de Freitas, V. et al. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chem.*, 2009; 119 (2): 518-523.
22. Konczak I, Zhang W. Anthocyanins-more than nature's colours. *J Biomed Biotechnol.* 2004; 2004 (5): 239-240.
23. Fernandes I, Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J Funct Foods.* 2014; 7: 54-66.
24. Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI, Shin SC, Lee SJ, Seo HG et al. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53 (11): 1419-1429.
25. Jurgoński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z. Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Foods Hum Nutr.* 2008; 63 (4): 176-182.
26. Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(4): 1948-1951.

27. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr.* 2010; 140 (3): 527-533.
28. Seymour EM, Tanone II, Urcuyo-Llanes DE, Lewis SK, Kirakosyan A, Kondoleon MG et al. Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. *J Med Food.* 2011; 14 (12): 1511-1518.
29. Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem.* 2005; 53 (1): 28-31.
30. Benedetti S. *Monografía de Maqui Aristotelia chilensis (Mol.)* Stuntz. Santiago: Instituto Forestal; 2012.
31. Alonso, J.R. Maqui (*Aristolelia chilensis*): Un nutracéutico chileno de relevancia medicinal. *Rev. Farmacol.* 2012; 5 (2): 95-100.
32. Céspedes C, Alarcón J, Ávila J, El-Hafidi M. Antiinflammatory, antioedema and gastroprotective activities of *A. chilensis* extract. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2010; 9 (6), 432 – 439.
33. Muñoz O, Christen P, Cretton S, Backhouse N, Torres V, Correa O et al. Chemical study and anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the leaves of *Aristolelia chilensis*(Mol.) Stuntz, Elaeocarpaceae *J Pharm Pharmacol.*, 2011; 63 (6), 849-859.
34. Ojeda J, Jara E, Molina L, Parada F, Burgos R, Hidalgo M et al. Effects of *Aristolelia chilensis* berry juice on cyclooxygenase 2 expression, NF-KB, NFAT, ERK1/2 and PI3K/Akt activation in colon cancer cells. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2011; 10 (6): 543-552.

35. Céspedes C, El-Hafidi M, Pavon N, Alarcon J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem.* 2008; 107 (2): 820–829.
36. Miranda-Rottmann S, Aspillaga AA, Perez DD, Vasquez L, Martinez AL, Leighton F. (2002). Juice and phenolic fractions of the Berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 2002; 50 (26): 7542–7547.
37. Céspedes C, Valdez-Morales M, Avila J, El-Hafidi M, Alarcón J, Paredes-López O. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chem.* 2010; 119 (3): 886-895.
38. Escribano-Bailón MT, Alcalde C, Muñoz O, Rivas G, Santos C. Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochem Anal.* 2006; 17 (1): 8-14.
39. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Mardones C, Vergara C, Herlitz E, Vega M et al. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *J Agric Food Chem.*, 2010; 58 (10): 6081-6089.
40. Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, de Mejia EG. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J Med Food.* 2010; 13 (2): 233-246.
41. Rojo L, Ribnicky D, Logendra S, Poulev A, Rojas-Silva P, Kuhn P et al. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem.* 2012; 131 (2), 387–396.
42. Jara E, Hidalgo J, Flores C, Pérez M, Yañez A, Hidalgo A, Quiñones L, Hancke L, Burgos R. Estudio de un extracto estandarizado de maqui rico en delfinidinas en el mantenimiento del balance de glucosa. *Revista Sociedad Farmacológica de Chile.* 2012; 5 (2): 27-34.

43. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes*, 1988; 37 (9): 1163-1167.
44. Angela M, Gajda MS. High fat diets for diet-induced obesity models. *Research Diets Inc.* 2008.
45. Wang C, Liao J. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol.* 2012; 821: 421-433.
46. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 2004; 81(2):243-248.
47. Omar B, Pacini G, Ahrén B. Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models. *Nutrients.* 2012; 4 (10): 1367-1381.
48. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007; 15(4): 798-808.
49. Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross M, Rabés J, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tomé D, Jais J, Junien C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring).* 2007; 15(8):1996-2005.
50. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010; 46 (3):212-223.
51. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J mice. *Int J Obesity.* 2000; 24 (5): 639-646.

52. Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, Kanatani A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res.* 2007; 37(1):50-57.
53. Díaz-Amigo C. Antibody-Based Detection Methods: From Theory to Practice. En: Popping B, Díaz-Amigo C, Hoenicke K. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. 1ª Ed. Nueva Jersey: Wiley; 2009. p. 223-248.
54. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2004; 43 (6): 42-51.
55. Klein BG. Las glándulas endocrinas y su función. En: Klein BG. *Cunningham: Fisiología Veterinaria*. 5ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2014. p. 374-407.
56. Kappe C, Zhang Q, Nyström T, Sjöholm A. Effects of high-fat diet and the anti-diabetic drug metformin on circulating GLP-1 and the relative number of intestinal L-cells. *Diabetol Metab Syndr.* 2014; 6:70-77.
57. Kato M, Tani T, Terahara N, Tsuda T. The Anthocyanin Delphinidin 3-Rutinoside Stimulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Murine GLUTag Cell Line via the Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II Pathway. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0126157.
58. Wu T, Tang Q, Yu Z, Gao Z, Hu H, Chen W et al. Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice. *Int J Food Sci Nutr.* 2014; 65 (3): 351-359.
59. Jang HH, Park MY, Kim HW, Lee YM, Hwuang KA, Park JH et al. Black rice (*Oryza sativa L.*) extract attenuates hepatic steatosis in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. *Nutr Metab (Lond).* 2012; 9 (1):27.

60. Geerling JJ, Boon MR, van der Zon GC, van den Berg SA, van den Hoek, Lombéz M et al. AM,2014 Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes*. 2014; 63 (3): 880-891.
61. Kim HW, Lee AY, Yeo AY, Chung H, Lee JH, Hoang MH et al. Metabolic profiling and biological mechanisms of body fat reduction in mice fed the ethanolic extract of black-colored rice. *Food Res Int*. 2013; 53 (1): 373-390.
62. Cheng DM, Pogrebnavak N, Kuhn P, Poulev A, Waterman C, Rojas-Silva P et al. Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrition*. 2014; 30 (7-8): 52-58.
63. Mookkan J, De S, Shetty P, Kulkarni NM, Devisingh V, Jaji MS et al. Combination of vildagliptin and rosiglitazone ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice. *Indian J Pharmacol*. 2014; 46 (1): 46–50.
64. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Hepatology*. 2014; 59 (2):713-723.
65. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2013;14 (11):21240-21257.
66. Jayaprakasam B, Olson LK, Schutzi RE, Tai MH, Nair MG. 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*. 2006; 54 (1): 243-248.
67. Guo H, Xia M, Zou T, Ling W, Zhong R, Zhang W. 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*. 2012; 23 (4):349-360.
68. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J et al. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014; 9 (3):e91111.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1:

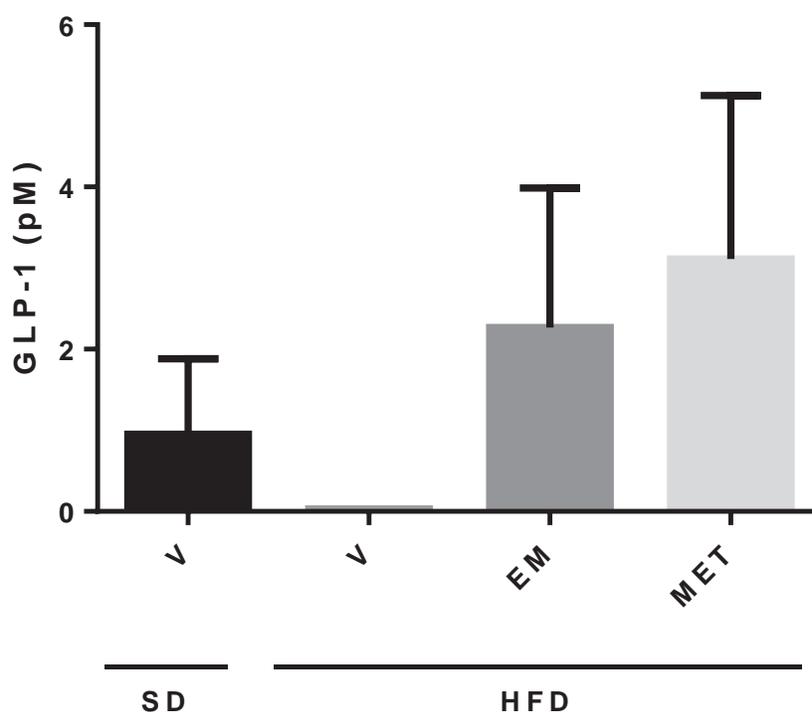
**Tabla 3.** Composición pellet dieta control baja en grasa (SD) D12450J

Nutrientes	gm%	Kcal%
Proteínas	19,2	20
Carbohidratos	67,3	70
Grasa	4,3	10
Total		100
Kcal/gm	3,85	
Ingredientes	gm	kcal
Caseína, 30 mesh	200	800
L-cisteína	3	12
Almidón de maíz	506,2	2024,8
Maltodextrina 10	125	500
Sacarosa	68,8	275,2
Celulosa, BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Manteca de cerdo	20	180
Mezcla mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5,5	0
Citrato de potasio, 1 H <sub>2</sub> O	16,5	0
Mezcla vitamínica V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
FD&C Amarillo #5	0,04	0
FD&C Azul #1	0,01	0
Total	1055,05	4057

**Tabla 4.** Composición pellet dieta alta en grasa (HFD) D12492

Nutrientes	gm%	Kcal%
Proteínas	26,2	20
Carbohidratos	26,3	20
Grasa	34,9	60
Total Kcal/gm	5,24	100
Ingredientes	gm	kcal
Caseína, 30 mesh	200	800
L-cisteína	3	12
Almidón de maíz	0	0
Maltodextrina 10	125	500
Sacarosa	68,8	275,2
Celulosa, BW200	50	0
Aceite de soya	25	225
Manteca de cerdo	245	2205
Mezcla mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de calcio	5,5	0
Citrato de potasio, 1 H <sub>2</sub> O	16,5	0
Mezcla vitamínica V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
FD&C Azul #1	0,05	0
Total	773,85	4057

Anexo 2:

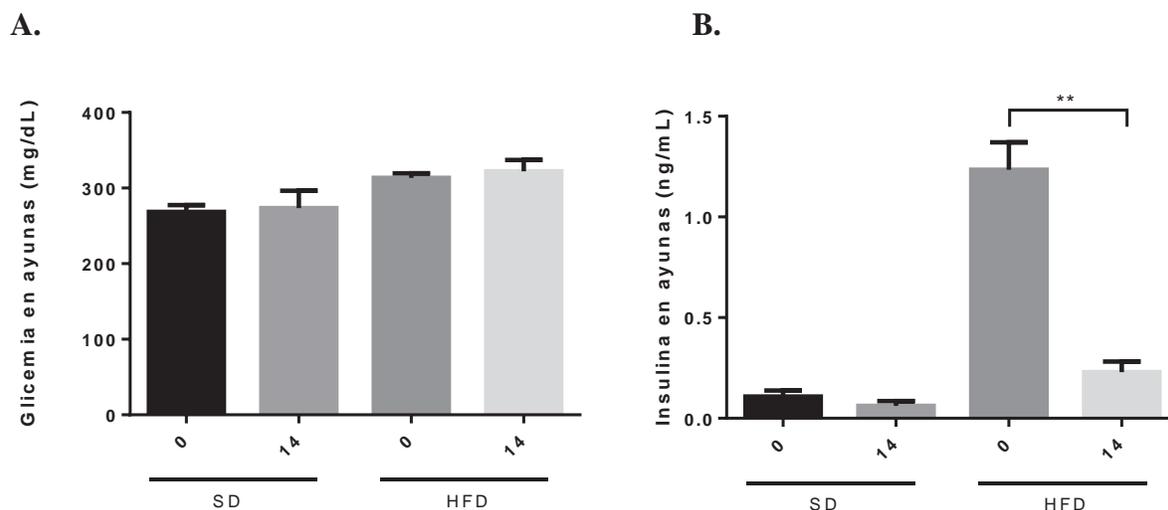


**Figura 8. Niveles de incretina GLP-1 activa (7-36) post tratamiento con los activos.** Cada columna representa el promedio con su error estándar (n= al menos 6 ratones para cada grupo experimental). (SD +V: grupo de ratones sanos tratados con vehículo; HFD + V: grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con vehículo; HFD + EM: grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con extracto de *A. chilensis* 5 mg/kg; HFD + MET: grupo de ratones obesos y diabéticos tratados con metformina 300 mg/kg)

**Tabla 5. Niveles en ayunas de incretina GLP-1 activa (expresados en pM) de los distintos grupos experimentales finalizados los 14 días de tratamiento con los activos.**

Control no diabético (SD + V)	Control diabético (HFD + V)	<i>A. chilensis</i> 5 mg/kg (HFD + EM)	Metformina 300 mg/kg (HFD + MET)
1,884995	0,0322926	No cuantificable	1,938128
No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable	11,106450
No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable	1,298914
No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable
No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable
No cuantificable	No cuantificable	3,985094	No cuantificable
0,0190539	No cuantificable	0,5545426	0,6642901
No cuantificable	No cuantificable	No cuantificable	0,5545426

### Anexo 3:

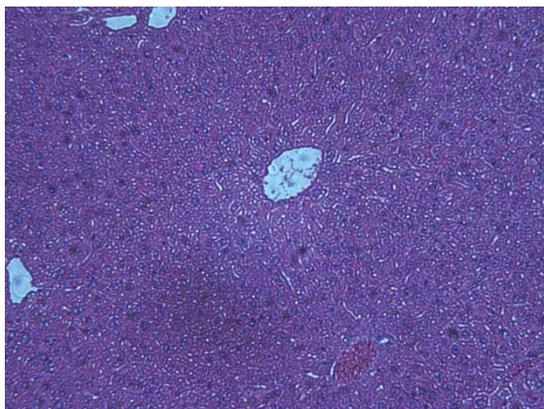


**Figura 9. Niveles basales de glicemia e insulina de los animales alimentados con dieta control baja en grasa y dieta alta en grasa, antes y después del tratamiento experimental.** (A) Tanto en los animales alimentados con dieta control baja en grasa como los alimentados con dieta alta en grasa, hubo un aumento en los niveles de glicemia y (B) una disminución en los niveles de insulina luego de las 2 semanas de tratamiento mediante sonda intragástrica rígida. Los datos corresponden al promedio con su error estándar. Diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se representan con asteriscos (\*) en donde \*\* $p < 0,01$ .

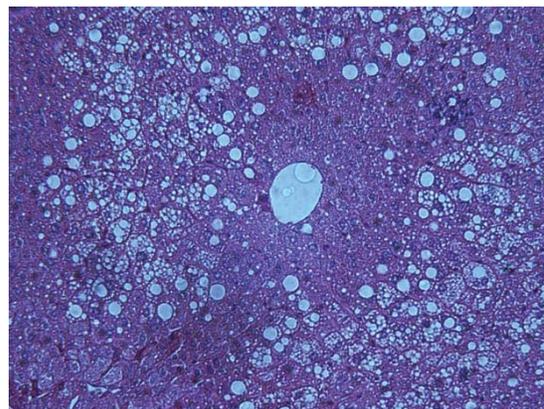
**Anexo 4:**

**A.**

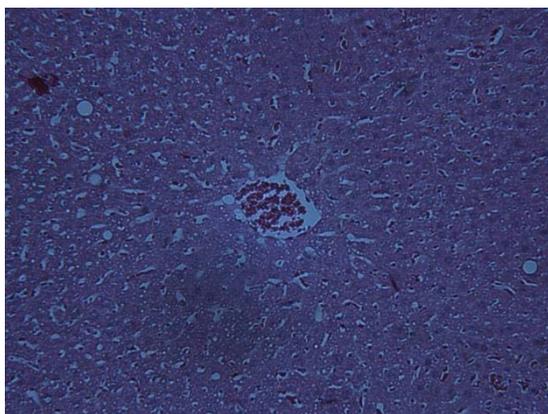
SD (V)



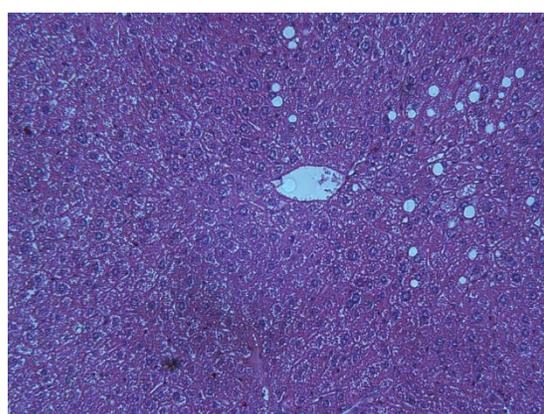
HFD (V)



HFD + EM



HFD + MET



**Figura 10. Efecto del extracto de *A. chilensis* 5mg/kg y metformina 300 mg/kg sobre las infiltraciones grasas características de hígado graso no alcohólico.** Fotos representativas de cortes histológicos de hígados teñidos con hematoxilina-eosina, tomadas con microscopio óptico (magnificación 20X).

**Anexo 5:**

**Tabla 6. Niveles en ayunas de glicemia, insulina, triglicéridos plasmáticos, colesterol total plasmáticos y porcentajes de área de infiltración de grasa hepática de los distintos grupos experimentales finalizados los 14 días de tratamiento con los activos. Cada parámetro está expresado como el promedio + error estándar (n= al menos 6 ratones para cada grupo).**

	Control no diabético (SD + V)	Control diabético (HFD + V)	<i>A. chilensis</i> 5 mg/kg (HFD + EM)	Metformina 300 mg/kg (HFD + MET)	P
Glicemia en ayunas (mg/dl)	273,5 ± 22,96	322,1 ± 15,08	287,2 ± 14,87	277,1 ± 37,78	0,4439
Insulina en ayunas (ng/ml)	0,06143 ± 0,02451	0,2293 ± 0,05269 <sup>a</sup>	0,1367 ± 0,03861	0,1558 ± 0,05712	0,4532
Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)	45,45 ± 3,044	56,13 ± 3,2 <sup>a</sup>	53,24 ± 3,612	54,36 ± 4,549	0,0189
Colesterol total plasmático (mg/dl)	114,6 ± 6,111	158,6 ± 10,71 <sup>a</sup>	141,3 ± 9,241	134,8 ± 10,18	0,3146
% Área de infiltración de grasa	0	5,227± 1,441 <sup>a</sup>	1,007± 0,5134 <sup>b</sup>	1,216± 0,3528 <sup>b</sup>	0,0115

<sup>a</sup> p<0,05 respecto al control no diabético

<sup>b</sup> p<0,05 respecto al control diabético