

Efecto de extractos de frutas y hortalizas en la incorporación de glucosa en células musculares *in vitro*

NICOLÁS GONZALES MUÑOZ¹, PAOLA VALERO PALENCIA^{1,2}, AMALIA NEIRA³, JOSÉ ANTONIO YURI³, NELSON BROWN⁴, RODRIGO MOORE-CARRASCO¹

Effect of fruit and vegetable extracts on the incorporation of glucose in muscle cells "in vitro"

Abstract

Skeletal muscle appears to play a central role in the development of insulin resistance (IR) and consequently the metabolic syndrome due to high-fat diets, obesity, and aging. Recent evidence suggests that some bioactive compounds present in natural products can affect blood glucose, possibly due to interactions between the compounds and glucose transporters. As an objective, to evaluate the effect of the extract of the green bean (PV, Phaseolus vulgaris) and apple of small fruit of thinning (Malus domestica, MAF and MIT extracts) on the incorporation of glucose in C2C12 muscle cells. For this, the cytotoxic effect of the extracts on the cells was determined by detecting formazan. Subsequently, glucose incorporation was determined using a fluorescent glucose analog in cells treated with the extracts. Finally, the effect of the extracts on IL-6 and TNF α production was evaluated by ELISA. Results: PV and MAF decreased 50% of viability at 1000 μ g / mL while MIT only decreased 10% at that concentration. PV had no significant effect on glucose incorporation and the MAF and MIT extract extracts significantly increased glucose incorporation at 100 μ g / mL (13500 and 18000 URF respectively). PV increases the secretion of IL-6 and TNF- α , MAF and MIT only increase the expression of IL-6. Conclusion: These results make it possible to establish natural extracts derived from thinning small fruit apple can be used as a possible treatment for pathologies with high blood glucose levels.

Keywords: *Phaseolus vulgaris, Malus domestica, C2C12 cells, Obesity, Insulin resistance, IL-6, TNF α*

1. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca 3460000, Chile.

2. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Departamento de Obstetricia, División de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8330024, Chile.

3. Centro de Pomáceas, Universidad de Talca, Talca 3460000, Chile.

4. Centro de Investigaciones Médicas, Universidad de Talca, Talca 3460000, Chile.

Correspondencia

Profesor Rodrigo Moore-Carrasco PhD.

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca 3460000, Chile; e-Mail: nbrown@utalca.cl (N.E.B.); rmoore@utalca.cl (R.M-C.)

Introducción

Durante los últimos años la obesidad ha alcanzado cifras alarmantes al punto de ser considerado como epidemia.¹ A nivel mundial, las estadísticas del año 2014 muestran que uno de cada tres adultos sobre 18 años de edad presenta sobrepeso. Por otra parte, la prevalencia mundial de obesidad se duplicó entre 1980 y 2014, si este dato es preocupante, la prevalencia de obesidad en niños menores de 5 años es dramática, mostrando que más de 42 millones de niños presentaban obesidad en 2015, cifras que siguen en aumento.² La obesidad es un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes mellitus (DM), insulinoresistencia (IR), trastornos del aparato locomotor y algunos tipos de cáncer (CA), siendo la inflamación una de sus principales características.³ La inflamación sistémica crónica promueve el desarrollo de IR,⁴ aterosclerosis,⁵ la neurodegeneración⁶ y el crecimiento tumoral.⁷

Una alimentación poco saludable es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad². La primera línea de tratamiento para esta patología se basa en una dieta balanceada, reduciendo el consumo de grasas saturadas y carbohidratos refinados, sumado al aumento en el consumo de granos enteros, frutas, verduras y legumbres.⁸ Tanto el poroto verde (*Phaseolus vulgaris*),⁹ como la manzana (*Malus domestica*)¹⁰ son alimentos ampliamente consumidos y distribuidos en el mundo. El poroto posee una alta cantidad de proteínas, compuestos fenólicos y fibra. Su consumo aumenta la sensación de saciedad, disminuyendo la ingesta de alimentos y por consiguiente el peso corporal.⁹ La manzana por otra parte contiene flavonoides, los cuales tienen beneficiosos efectos para la salud.¹¹

El tejido adiposo es el principal órgano de reserva energética del cuerpo, este órgano no solo cumple funciones de reserva sino además

tiene función endocrina,¹² capaz de secretar diversas sustancias que regulan las funciones metabólicas de diferentes órganos, entre ellos el músculo esquelético.¹³ El músculo a su vez es un actor central en la adaptación a una entrada excesiva de energía, siendo uno de los principales órganos que consumen glucosa¹⁴ este órgano además de sus funciones motoras cumple funciones endocrinas secretando moléculas conocidas como mioquinas que contribuyen en la regulación del metabolismo energético.¹⁵

Los extractos basados en productos naturales se han empleado ampliamente en el tratamiento o manejo de la obesidad, debido a que contiene una gran variedad de varios componentes con diferentes efectos anti-obesidad y anti-oxidantes sobre el metabolismo corporal y la oxidación de grasas.²³ La manzana contiene compuestos biológicamente activos tales como: dihidrocalconas (florizina), flavonoles y flavonas (quercetina-3-O- β -D-glucopiranosido), auronas (aureusidina-O- β -D-glucopiranosido) y ácidos fenólicos (ácido protocatéquico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico);²⁴ compuestos de bajo peso molecular los cuales muestran actividad anticancerígena, antioxidante, antibacteriana y antialérgica.²⁵ En estudios realizados en células musculares C2C12, se ha informado que la quercetina estimula la captación de glucosa a través de la activación de AMPK.²⁶

Los porotos son conocidos alimentos funcionales bajos en grasas y altos en fibra, proteína vegetal, ácido fólico, hierro, magnesio, zinc, ácidos grasos omega-3 y antioxidantes. También contienen fitatos y compuestos fenólicos que pueden funcionar de manera similar a los inhibidores de α -glicosidasa o α -amilasa, los cuales son un grupo de medicamentos anti-diabéticos.²⁷ Algunos compuestos fenólicos previamente identificados en *P. vulgaris* con actividad biológica son: quercetina, kaempferol, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanílico, rafinosa,

estaquiosa, verbascosa, y el ácido fítico.²⁸ De estos compuestos se ha reportado que kaempferol estimula la absorción de glucosa en el músculo a través de las vías de señalización PI3K y PKC.²⁹

La literatura sobre el efecto de *Phaseolus vulgaris* y *Malus domestica* en células musculares es escasa. Sin embargo, de lo antes expuesto se puede deducir que los extractos de *Phaseolus vulgaris* y *Malus domestica* tienen compuestos fenólicos que aumentan la captación de glucosa en células musculares C2C12. Con base en esto se propuso evaluar el efecto de extractos de Manzana y Poroto sobre la incorporación de glucosa en el músculo esquelético, con la finalidad de proponer un tratamiento que permita disminuir los altos niveles de glucosa sanguínea que presentan pacientes con IR y diabetes mellitus (DM).

Materiales y métodos

Cultivos Celulares. Las C2C12³⁰ fueron gentilmente donadas por el Dr. Enrique Jaimovich de la Facultad de Medicina de la U. de Chile. Las células fueron descongeladas desde un pasaje 3 a partir del tiempo original, de las cuales se realizaron subdivisiones hasta el pasaje 8 para la realización de los ensayos. Las células se cultivaron en placas de Poliestireno Falcon (CORNING, New York, USA) de 100 mm, en medio de cultivo base alto en glucosa DMEM/High (4,5 mg de glucosa/mL, 110 mg de piruvato sódico/L y 4 mM de L-glutamina) (HyClone, Chicago, USA), suplementado con 10-20% de Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone, Chicago, USA), y un mix de antibióticos-antimicóticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina) (GIBCO, USA). El Medio suplementado se denominó medio de mantención (MM). Las células fueron cultivadas a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Se realizó cambio de medio cada 3 días y se cambió de pasaje celular al llegar al 80% de confluencia

utilizando Tripsina (0,25% Tripsina-EDTA 1X) (GIBCO, USA). Se realizó conteo de células con azul tripano utilizando una Cámara de Neubauer.

Para los experimentos con miotubos, se sembraron a 60.000 células/pocillo con MM en placas P24 (CORNING, New York, USA) incubando durante 24 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS ((PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4, 37 °C) y luego se agregaron 500 µL de medio de diferenciación I (MDI: SFB 2%, Mix de antibióticos 1% y DMEM/High c.s.p 50 mL), seguidamente se incubó durante 24 horas. Al concluir el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó medio de sincronización (MS: Mix de antibióticos al 1%, DMEM-H c.s.p 50 mL), se incubó durante 16-48 horas bajo las diferentes condiciones experimentales.

Preparación de Extractos

Se utilizaran extractos de manzana (*Malus domestica*) de fruto pequeño de raleo y extracto de poroto (*Phaseolus vulgaris*) verde.

Extracto de Poroto Verde

El liofilizado de poroto verde fue preparado y donado amablemente por el T.M. Felipe Castillo de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca. Para realizar los ensayos se preparó un estándar de 10 mg/mL, el liofilizado fue disuelto en MM (ensayos de citotoxicidad) y MDII (ensayo de incorporación de glucosa). El MDII contenía medio de cultivo base DMEM/Low (1 mg/mL de glucosa, 110 mg/L de piruvato sódico y 4 mM de L-glutamina) (HyClone, USA), suplementado con 2% de SFB y 1% de un mix de antibióticos. La solución se homogenizó en un vórtex y luego se sónico durante 20 minutos a 35°C. Finalmente la solución fue esterilizada mediante filtración (0,22 µm de porosidad) y

almacenada a 4°C hasta su uso.

Extracto de manzana (AF e IT)

El extracto crudo fue donado por la Bioquímica Amalia Neira del Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca, quienes obtuvieron el extracto desde el proyecto FONDEF IT 13I248. Se preparó un estándar de 20 mg/mL para cada liofilizado. Los liofilizados fueron reconstituidos en MM o MDII. Los liofilizados AF e IT tenían una capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC) de 192.031 ± 24.628 y 990.418 ± 111.742 respectivamente. El contenido de quercetina de los extractos era de 54,37 mg/g (MIT) y 9,07 mg/g (MAF), además se indicó que los extractos tenían alto contenido de ácido clorogénico, florizina y ácidos fenólicos. Se tuvo especial cuidado al momento de pesar el extracto de manzana AF, ya que este era altamente higroscópico. La solución se homogenizó mediante un vortex y luego se sonó durante 20 minutos a 35°C. Finalmente la solución fue esterilizada mediante filtración (0,22 µm de porosidad), y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Viabilidad Celular

La determinación de la viabilidad celular frente a distintas condiciones de extractos se realizó mediante el método del MTT (SIGMA, Missouri, USA) en placas de 24 pocillos siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de cada pocillo se midió en un lector de microplacas Multiskan Go (ThermoScientific, Massachusetts, USA) a 570 nm y 630 nm (blanco). La absorbancia a 630 nm luego fue restada a la absorbancia a 570 nm para la cuantificación.

Incorporación de Glucosa

Para medir la incorporación de glucosa, las células C2C12 previamente sincronizadas se

lavaron 3 veces con PBS, y se agregó posteriormente 500 µL de MDII en presencia de los extractos y se incubó durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, y se agregó enseguida MDII en presencia de los distintos extractos y 10 µM de 2-NBDG (ThermoFisher, Massachusetts, USA) y se lleva a incubación por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo se extrae el sobrenadante de cada pocillo, y se almacena a -80°C para la posterior medición de citoquinas. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS, lisadas mediante scrapping o raspado celular y posteriormente sonicadas, seguidamente el lisado fue centrifugado a 900 rpm por 5 minutos para la determinación de la fluorescencia. Para este ensayo se utilizó como control negativo Dexametasona 10 µM (Dex), y como controles positivos Quercetina 10 µM (Qn) (EXTRASYNTHÈSE, Genay, Francia) e Insulina 100 nM (INS) (SIGMA, Missouri, USA). La medición de la fluorescencia se realizó a 465/540 nm de excitación/emisión mediante el equipo Synergy HTX multi-mode reader (BioTek, Vermont, USA).

Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media, considerando como estadísticamente significativos valor $P < 0.05$. Para la comparación estadística se utilizó el test one-way análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico. Luego se realizó el post test de Bonferroni para comparar los datos de todas las variables analizadas. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el programa GraphPad Prism 5 para Windows.

Resultados

El efecto del extracto de poroto verde (PV) sobre la viabilidad celular se puede ver en la figura 1A, a concentraciones que van desde los 200 a los 1000 µg/mL. En la Figura 1B,

se puede observar el efecto citotóxico de los extractos de manzana en sus versiones MAF y MIT a concentraciones entre los 50 y los 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos se realizaron en un modelo *in vitro*, mediante 7 repeticiones de cada concentración. Como control se utilizó MM (con DMSO 2% para el extracto de PV) en ausencia de extractos. Se consideró el control como 100% de viabilidad. Las concentraciones que se utilizaron para los ensayos posteriores fueron aquellas que presentaban sobre el 90% de viabilidad. Como se puede ver en la figura, PV, MAF redujo aproximadamente 50% de la viabilidad a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que MIT solo redujo el 10% de la viabilidad a esa concentración indicando que aunque los 3 compuestos presentan una citotoxicidad baja la del extracto MIT es aún menos citotóxica.

En la figura 2, se muestra el efecto de los extractos de PV, MAF y MIT sobre la incorporación de glucosa en las células musculares C2C12 de ratón en un modelo *in vitro*. En cuanto a los controles, tanto la quercetina como la insulina (controles positivos) son estadísticamente significativos respecto de la dexametasona (control negativo), lo que valida el ensayo. El efecto sobre la incorporación de glucosa de los extractos, se evaluó contra el control negativo donde se observa que tanto el extracto de MAF como MIT son estadísticamente significativos, por lo cual tienen efecto sobre la incorporación de glucosa incluso en concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En contraste el extracto de PV no tiene efecto en la incorporación de glucosa en esta línea celular. Adicionalmente se evaluó la variación en el efecto a distintas concentraciones del mismo extracto, encontrando que el extracto MIT a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue estadísticamente significativo por sobre la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la concentración a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tubo diferencias estadísticamente significativas contra 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para el extracto MAF la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue estadísticamente

significativa que la concentración de 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la incorporación de glucosa. El extracto de PV no mostró cambios significativos independientemente de la concentración utilizada.

Discusión

La necesidad de un tratamiento para pacientes con alteraciones metabólicas producto de la obesidad que tenga pocos efectos secundarios y no altere la calidad de vida, es una de las razones por las que se estudia el efecto de productos derivados de compuestos orgánicos en la fisiopatología enfermedades asociadas a la IR como lo son la DM y el síndrome metabólico.³¹⁻³³ Una intervención alimentaria es la principal línea de tratamiento para estas patologías.³⁴⁻³⁵ Entre las principales recomendaciones para el tratamiento nutricional destacan el aumento en el consumo de alimentos con mayor contenido de fibras y antioxidantes como lo son frutas y hortalizas.³⁶⁻³⁸ En consumo de estos alimentos contribuye con la reducción de las complicaciones asociadas a la obesidad.³⁹⁻⁴¹ Estos alimentos están compuestos además por moléculas bioactivas que modulan los procesos metabólicos.²⁶⁻²⁹ Por lo que no es de extrañar que sean considerados para el desarrollo de tratamientos farmacológico de enfermedades metabólicas.⁴² En este trabajo nos centramos en el efecto de extractos de poroto verde y manzana de fruto pequeño de raleo, sobre la incorporación de glucosa en células musculares C2C12 de ratón, en un modelo *in vitro*.

Los resultados obtenidos del efecto de los extractos sobre la viabilidad celular (Figura 1), indican que el extracto de PV mantiene la viabilidad sobre el 90% hasta los 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero es considerablemente más baja a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde se tiene una viabilidad cercana al 50%. Estos resultados son consistentes y se relacionan con los estudios realizados en 2005 por Gonzalez de Mejia E.

y colaboradores, quienes usando extractos de *Phaseolus acutifolius* y *Phaseolus vulgaris* a 1000 µg/mL en células epiteliales, encontraron que ambos extractos reducen en un 87,4% y 53,5 % respectivamente la viabilidad celular.⁴³ Adicionalmente, se ha reportado la toxicidad oral aguda de lectinas de *P. vulgaris* en humanos, las cuales se traducen en manifestaciones como náuseas, vómitos, hinchazón y diarrea.⁴⁴ Los efectos citotóxicos de PV son tan reconocidos que actualmente están siendo considerados como posible tratamiento contra células cancerosas.⁴⁵ Se ha reportado que la fracción de péptidos de bajo peso molecular de *Phaseolus vulgaris* cuando se utiliza a bajas concentraciones 20 -30 µg/mL aumenta la producción de óxido nítrico y reduce el estrés oxidativo al disminuir la producción de H₂O₂ en células endoteliales de cordón umbilical humanas.⁴⁶ Sin embargo, cuando se usa a elevadas concentraciones PV activa vías de señalización involucradas en la apoptosis.⁴⁷ Los efectos citotóxicos del extracto de PV observados en este estudio concuerdan con el efecto dual reportado en la literatura para esta hortaliza.

En relación a los extractos MAF y MIT, estas mantuvieron la viabilidad sobre 90% hasta los 500 y 300 µg/mL respectivamente. Estos extractos provenían de frutos pequeños de raleo, los cuales cabe destacar tienen una alta relación cascara/pulpa. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los estudios realizados en 2013 por Tenore G y col. se evaluó la influencia de extractos de manzana en la proliferación celular y el estrés oxidativo, encontrando que los polifenoles muestran citotoxicidad, en particular *Malus* cv “Red Delicious” y *Malus* cv “Pink Lady” disminuyeron la proliferación en un 62,5%, y 37,5% respectivamente de células HepG2 debido a su capacidad prooxidante⁴⁸. Al comparar la citotoxicidad de los extractos (Figura 1B) se puede ver que el extracto MIT reduce la viabilidad gradualmente, a diferencia del ex-

tracto MAF el cual luego de los 500 µg/mL disminuye abruptamente. Este efecto puede ser causado por el contenido de quercetina, la cual era 6 veces mayor en el extracto MIT. Se ha demostrado que la quercetina inhibe la expresión de iNOS, eNOS y atenúa el estrés oxidativo.⁴⁹ El estrés oxidativo induce muerte celular.⁵⁰ Al reducir el estrés oxidativo la quercetina favorece la sobrevivencia de las células. Adicionalmente se nos proporcionó el ORAC de los extractos de manzana, 192.031 ± 24.628 para el extracto MAF y 990.418 ± 111.742 para el extracto MIT, lo que indica que el extracto MIT tiene una elevada cantidad de compuestos con actividad antioxidante efectivamente que la mayor cantidad de radicales libres que el extracto MAF. Los efectos citoprotectores de MIT incluso a elevadas concentraciones puede verse explicado por sus efectos antioxidantes.

En relación con los resultados de los extractos sobre la incorporación de glucosa (Figura 2), los extractos de manzana son significativamente más efectivos que los extractos de poroto, para inducir la captación de glucosa en las células C2C12 y en particular el extracto de MIT es mucho más efectivo que el MAF. Para estos ensayos se utilizó como control negativo dexametasona, que de inhibir la incorporación de glucosa⁵¹. La dexametasona es un glucocorticoides (GCS), que regulan múltiples aspectos de la homeostasis de la glucosa.⁵² En el músculo esquelético está bien documentado que el exceso de GCS inhibe la captación de glucosa y su utilización puede antagonizar la respuesta a la insulina.⁵¹⁻⁵³ Además, las acciones de la dexametasona se han asociado con la inhibición de AMPK y las vías de señalización dependiente de calmodulina dependiente de quinasa II (CaMKII).⁵¹ Junto con dexametasona como control negativo, se utilizó como controles positivos insulina cuyos efectos en el aumento de la captación de insulina tras aumentar la traslocación del transportador de glucosa-4 (GLUT-4) han

sido ampliamente estudiados⁵⁴ y la quercetina quien también aumenta la traslocación del transportador GLUT-4 en miotubos de células L6 al activar la vía de señalización CaMKK β /AMPK.⁵⁵ Es necesario mencionar que los resultados del control positivo fueron curiosamente más bajos que el vehículo. En relación con este fenómeno, en 2005 se realizó un estudio en el cual se midió la incorporación de glucosa utilizando 2-NBDG en presencia de 5 fármacos antidiabéticos, entre ellos la insulina (concentraciones desde 10^{-6} a 10^{-9} M) encontrando que la insulina pierde sus efectos fisiológicos en células musculares L6 de rata en modelos *in vitro*.⁵⁶

Los extractos de manzana por su parte aumentaron considerablemente la incorporación de glucosa, este efecto se debe al alto porcentaje de flavonoides como el ácido clorogénico.¹⁰ En un estudio realizado en 2015 por Ghadieh H y col. mostraron que el ácido clorogénico aumenta significativamente la fosforilación de AMPK y el receptor de adiponectina, aumenta la translocación de GLUT4 a la membrana.⁵⁷ Además, ha mostrado aumentar la expresión de PPAR- α en el hígado.⁴⁸ Estos resultados indican que estas vías podrían estar siendo activadas en C2C12 tras la exposición a los extractos MIT y MAF.

El extracto MIT fue significativamente más efectivo que el extracto MAF lo que se debe entre otras cosas al porcentaje de quercetina, que era aproximadamente 5 veces mayor en el extracto MIT. Como se ha mencionado anteriormente la quercetina aumenta la captación de glucosa en miotubos de células L6.⁵⁵ En relación al extracto de PV este no aumento en la incorporación de glucosa de manera estadísticamente significativa. A pesar de que el extracto de poroto verde contiene quercetinas, kaempferol y ácidos fenólicos los cuales incrementan la incorporación de glucosa a la célula.²⁸ No se tiene información del contenido de dichos compuestos en nuestro extracto, por lo que se hace necesario a futuro realizar

una caracterización química para determinar cuales son los componentes principales del extracto y determinar si estos efectos podrían estar relacionados con una baja concentración de estos compuestos. Por otra parte se ha reportado que *Phaseolus vulgaris* tiene elevadas concentraciones de lectinas que inhiben la absorción de glucosa a nivel intestinal.⁵⁸ Contrario a lo observado en esta investigación *Phaseolus vulgaris* incrementa la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1.⁵⁹ Sin embargo, estamos trabajando con una línea celular diferente y por lo tanto los resultados obtenidos son diferentes.

Conclusión

En este estudio se logró evaluar la capacidad de los extractos de PV, MAF y MIT sobre la incorporación de glucosa en células musculares C2C12 de ratón, encontrando que el extracto de PV es menos citotóxico a bajas concentraciones que los extractos de manzana. Pero el extracto de manzana IT, es menos citotóxico a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicando que la cantidad de flavonoides, mostró efectos benéficos sobre la viabilidad de las células musculares.

La incorporación de glucosa en presencia de los distintos extractos fue significativamente más alta tras la exposición a los extractos MAF y MIT. Se debe tener en cuenta que las concentraciones que tuvieron mejor efecto sobre la incorporación de glucosa resultaron tener un alto porcentaje de citotoxicidad, por ende se puede establecer como la concentración más efectiva 100 $\mu\text{g/mL}$ tanto para MAF como para MIT, y este porcentaje en el caso de MAF aumenta la incorporación de manera comparable a la Insulina mientras que MIT a esa concentración aumenta la captación de glucosa de manera significativamente más alta que la insulina. El extracto de PV, por otra parte no parece tener efecto sobre la incorporación de glucosa.

Estos resultados permiten plantear a los extractos naturales obtenidos de manzana pequeña de raleo como un ingrediente funcional con probado efecto en la incorporación de glucosa. Estos resultados son alentadores en la búsqueda de productos naturales que puedan ser utilizados como terapias en patologías asociadas a la obesidad y que hoy presentan una elevada prevalencia.

Conflicto de intereses

Los autores confirman que no hay conflicto de intereses.

Referencias

1. OMS. Obesidad y Sobrepeso [Internet]. Centro de Prensa. Nota descriptiva. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y sobrepeso [Internet]. 2021 [citado 26 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud [Internet]. Ginebra: OMS; 2002 p. 24. (Informe sobre la salud en el mundo 2002: reducir los riesgos y promover una vida sana.). Report No.: WHA55.-23. Disponible en: https://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf.
4. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 2017;127(1):43-54.
5. Brandsma E, Kloosterhuis NJ, Koster M, Dekker DC, Gijbels MJ, van der Velden S, et al. A proinflammatory gut microbiota increases systemic inflammation and accelerates atherosclerosis. *Circ Res*. 2019;124(1):94-100.
6. Walker KA. Inflammation and neurodegeneration: chronicity matters. *Aging*. 2019;11(1):3.
7. Zhong J-H, Huang D-H, Chen Z-Y. Prognostic role of systemic immune-inflammation index in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(43):75381.
8. Pellegrini M, Ponzio V, Rosato R, Scumaci E, Goitre I, Benso A, et al. Changes in weight and nutritional habits in adults with obesity during the “lockdown” period caused by the COVID-19 virus emergency. *Nutrients*. 2020;12(7):2016.
9. Kumar S, Verma AK, Das M, Jain SK, Dwivedi PD. Clinical complications of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consumption. *Nutrition*. 2013;29(6):821-7.
10. Patel V, Kaswala R, Chakraborty M, Kamath JV. Phytochemical and pharmacological profile of *Malus domestica*: an overview. *Int J Curr Biomed Pharm Res*. 2012;2(2):334-8.
11. Shallangwa GA, Ekwumemgbo PA, Osu UI, Olukemi O. Total phenolic, flavonoid contents and in-vitro anti-inflammation evaluation of ethanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyx, *Malus domestica* and their 1: 1 extracts blend on protein denaturation. *Algerian J Nat Prod*. 2017;5(2):483-91.
12. Rajesh Y, Sarkar D. Association of Adipose Tissue and Adipokines with Development of Obesity-Induced Liver Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2163.
13. Rodríguez A, Becerril S, Hernández-Pardos AW, Frühbeck G. Adipose tissue depot differences in adipokines and effects on skeletal and cardiac muscle. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;52:1-8.
14. Pereira RM, Moura LP de, Muñoz VR, Silva ASR da, Gaspar RS, Ropelle ER, et al. Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. *Mot Rev Educ Física*. 2017;23(SPE).
15. León-Ariza HH, Mendoza-Navarrete MP, Maldonado-Arango MI, Botero-Rosas DA. A systematic review of “myokines and metabolic regulation”. *Apunts Med Esport*. 2018;53(200):155-62.

16. Hasani-Ranjbar S, Jouyandeh Z, Abdollahi M. A systematic review of anti-obesity medicinal plants-an update. *J Diabetes Metab Disord.* 2013;12(1):1-10.
17. Zhao H, Hu X, Chen X, Shi S, Jiang X, Liang X, et al. Analysis and improved characterization of minor antioxidants from leaves of *Malus doumeri* using a combination of major constituents' knockout with high-performance liquid chromatography–diode array detector–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015;1398:57-65.
18. Dou J, Meng Y, Liu L, Li J, Ren D, Guo Y. Purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thinned-young apple. *Int J Biol Macromol.* 2015;72:31-40.
19. Eid HM, Nachar A, Thong F, Sweeney G, Haddad PS. The molecular basis of the anti-diabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(41):74.
20. Thompson SV, Winham DM, Hutchins AM. Bean and rice meals reduce postprandial glycemic response in adults with type 2 diabetes: a cross-over study. *Nutr J.* 2012;11(1):1-7.
21. Gamboa-Gómez CI, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Moreno-Jiménez MR, Vázquez-Cabral BD, González-Laredo RF. Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J.* 2015;14:809.
22. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr Metab.* 2015;12(1):1-20.
23. Yaffe D, Saxel ORA. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270(5639):725-7.
24. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2017;11(8):215-25.
25. Furman BL, Candasamy M, Bhattamisra SK, Veettil SK. Reduction of blood glucose by plant extracts and their use in the treatment of diabetes mellitus; discrepancies in effectiveness between animal and human studies. *J Ethnopharmacol.* 2020;247:112264.
26. Spínola V, Castillo PC. Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). *Phytochemistry.* 2017;143:29-35.
27. Riobó Serván P. Pautas dietéticas en la diabetes y en la obesidad. *Nutr Hosp.* 2018;35(SPE4):109-15.
28. Bajaña Salmerón DM. Dieta y ejercicio físico como medidas no farmacológicas para la prevención del síndrome metabólico en pacientes con esquizofrenia. Una revisión bibliográfica. 2018.
29. Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci.* 2011;76(1):R6-15.
30. Sarker U, Oba S. Protein, dietary fiber, minerals, antioxidant pigments and phytochemicals, and antioxidant activity in selected red morph *Amaranthus* leafy vegetable. *PLoS One.* 2019;14(12):e0222517.
31. Palomo I, Gutiérrez M, Astudillo L, Rivera C, Torres C, Guzmán L, et al. Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Rev Chil Nutr.* 2009;36(2):152-8.
32. Palomo I, Fuentes E, Moore-Carrasco R, González DR, Rojas A, Padro T, et al. El consumo de frutas y hortalizas ayuda a prevenir el daño endotelial. *Rev Chil Nutr.* 2011;38(3):343-55.
33. Palomo I, Moore-Carrasco R, Carrasco G, Villalobos P, Guzmán L. El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Idesia Arica.* 2010;28(3):121-9.
34. Torres C, Guzmán L, Moore-Carrasco R,

- Palomo I. Efecto antitrombótico, una característica poco conocida de las frutas y hortalizas. *Rev Chil Nutr.* 2008;35(1):10-7.
35. Francini-Pesenti F, Spinella P, Calò LA. Potential role of phytochemicals in metabolic syndrome prevention and therapy. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019;12:1987.
36. De Mejia EG, Valadez-Vega MDC, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods Hum Nutr.* 2005;60(3):137-45.
37. He S, Simpson BK, Sun H, Ngadi MO, Ma Y, Huang T. *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(1):70-83.
38. Aregueta-Robles U, Fajardo-Ramírez OR, Villela L, Gutiérrez-Urbe JA, Hernández-Hernández J, del Carmen López-Sánchez R, et al. Cytotoxic activity of a black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract and its flavonoid fraction in both in vitro and in vivo models of lymphoma. *Rev Investig Clínica.* 2018;70(1):32-9.
39. Graziani D, Ribeiro JVV, Cruz VS, Gomes RM, Araújo EG, Santos ACM, et al. Oxidant and antioxidant effects of a low molecular weight peptide fraction from hardened bean (*Phaseolus vulgaris*) on endothelium. *Braz J Med Biol Res.* 2021;54.
40. Moreno-Jiménez MR, López-Barraza R, Cervantes-Cardoza V, Pérez-Ramírez IF, Reyna-Rojas JA, Gallegos-Infante JA, et al. Mechanisms associated to apoptosis of cancer cells by phenolic extracts from two common beans varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Biochem.* 2019;43(6):e12680.
41. Tenore GC, Campiglia P, Stiuso P, Ritieni A, Novellino E. Nutraceutical potential of polyphenolic fractions from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chem.* 15 de octubre de 2013;140(4):614-22.
42. Abd-Elbaset M, Arafa E-SA, El Sherbiny GA, Abdel-Bakky MS, Elgendy ANA. Quercetin modulates iNOS, eNOS and NOSTRIN expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 2015;4(3):246-55.
43. Ghosh N, Das A, Chaffee S, Roy S, Sen CK. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. En: *Immunity and Inflammation in Health and Disease.* Elsevier; 2018. p. 45-55.
44. Gong H, Liu L, Ni C-X, Zhang Y, Su W-J, Lian Y-J, et al. Dexamethasone rapidly inhibits glucose uptake via non-genomic mechanisms in contracting myotubes. *Arch Biochem Biophys.* 1 de agosto de 2016;603:102-9.
45. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol.* 2015;872:99-126.
46. Ahrén B. Evidence that autonomic mechanisms contribute to the adaptive increase in insulin secretion during dexamethasone-induced insulin resistance in humans. *Diabetologia.* junio de 2008;51(6):1018-24.
47. Hook SC, Chadt A, Heesom KJ, Kishida S, Al-Hasani H, Tavaré JM, et al. TBC1D1 interacting proteins, VPS13A and VPS13C, regulate GLUT4 homeostasis in C2C12 myotubes. *Sci Rep.* 21 de octubre de 2020;10(1):17953.
48. Jiang H, Yamashita Y, Nakamura A, Croft K, Ashida H. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. *Sci Rep.* 25 de febrero de 2019;9(1):2690.
49. Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods.* 30 de septiembre de 2005;64(3):207-15.
50. Jin S, Chang C, Zhang L, Liu Y, Huang X, Chen Z. Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db mice. *PloS One.* 2015;10(4):e0120842.

51. Santiago José G, Levy-Benshimol A, Carmona A. Effect of Phaseolus vulgaris lectins on glucose absorption, transport, and metabolism in rat everted intestinal sacs. *J Nutr Biochem.* 1 de julio de 1993;4(7):426-30.
 52. Oseguera Toledo ME, Gonzalez de Mejia E, Sivaguru M, Amaya-Llano SL.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation in vitro. *J Funct Foods.* 1 de diciembre de 2016;27:160-77.

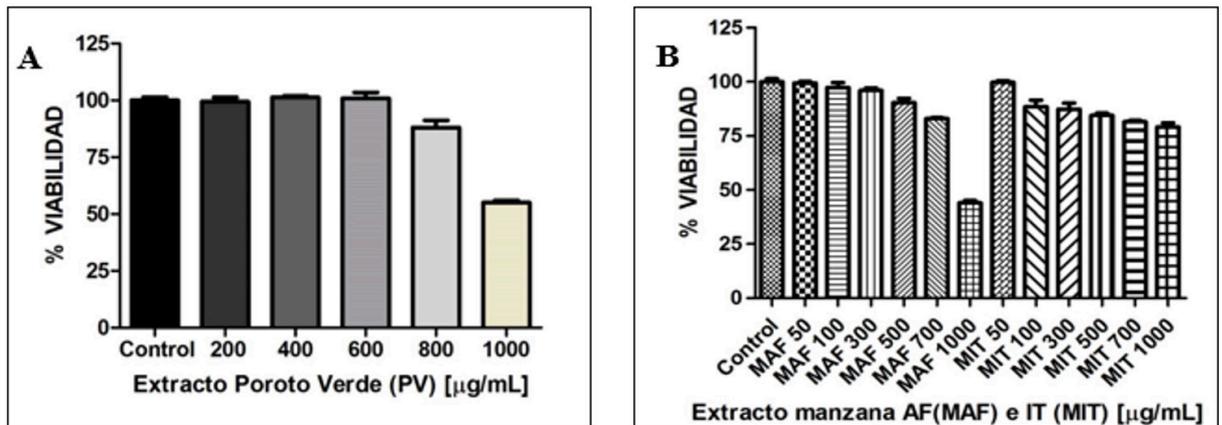


Figura 1. Efecto de los extractos sobre la viabilidad de las células musculares C2C12. (A) Los resultados muestran cómo el porcentaje de viabilidad decrece luego de los 600 µg/mL. Las concentraciones de 200, 400 y 600 µg/mL mantienen una viabilidad cercana al 100%, mientras que la concentración de 800 µg/mL tiene un viabilidad de 88% y los 1000 µg/mL es de 55%. (B) El porcentaje de viabilidad decrece tanto para el extracto AF como para el extracto IT. Se puede apreciar que el extracto AF es menos citotóxico, ya que mantiene un 90% de las células viables hasta los 500 µg/mL en comparación con el extracto IT el cual sobre los 100 µg/mL su viabilidad está bajo el 90%.

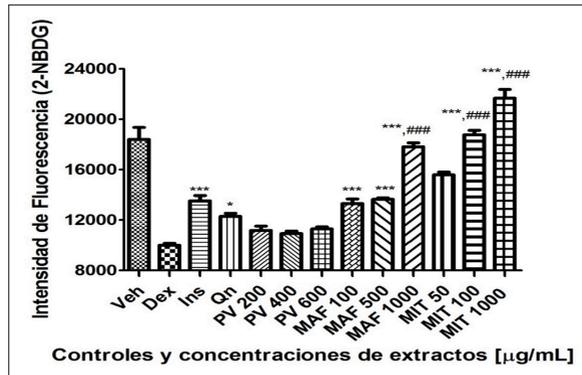


Figura 2. Efecto de los extractos de PV, MAF y MIT sobre la incorporación de glucosa en células musculares C2C12. Veh: Vehículo (MM en ausencia de fármacos o extractos); Dex: Dexametasona 10 μ M; Ins: Insulina 100 nM; Qn: Quercetina 10 μ M. Los resultados de intensidad de fluorescencia del reactivo 2-NBDG se muestran como unidades relativas de fluorescencia (RTU) . La significancia estadística respecto del control negativo se muestra como: *, $P < 0,05$; **, $0,01$; ***, $P < 0,0001$. La significancia estadística dentro del grupo tratado con el mismo extracto a diferentes concentraciones se muestra como: ###, $P < 0,0001$.