



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana**

**Capacidad antioxidante *in vitro* y propiedades hipolipidémicas de
manzanas de diversos genotipos en ratas Wistar diabéticas**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Ing. Fátima del Carmen Mosqueda Serrano

Dirigido por:

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche

Centro Universitario
Septiembre 2012
Querétaro, Qro. ,
México D.F.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

Capacidad antioxidante *in vitro* y propiedades hipolipidémicas de manzanas de diversos genotipos en ratas Wistar diabéticas

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Presenta:
Fátima del Carmen Mosqueda Serrano

para obtener el grado de Maestro en Nutrición

Dirigido por:
Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche
Presidente



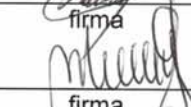
firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario



firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Vocal




firma


Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola
Suplente

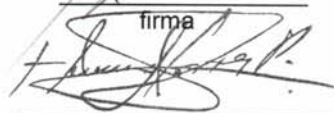


firma

M. en C. María del Rocío Arellano Jiménez
Suplente



firma

Dra. Teresa García Gasca
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE
BIOQUÍMICA MOLECULAR, TOXICOLOGIA MOLECULAR Y DE FISIOLÓGIA Y
FERMENTACIONES DE FRUTAS Y HORTALIZAS DE LA FACULTAD DE
QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. RAMÓN ALVAR MARTÍNEZ PENICHE.**

RESUMEN

México ocupa el 9° lugar mundial en mortalidad por diabetes. Estudios epidemiológicos han vinculado el consumo de manzana con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, asma y diabetes, lo cual se atribuye a la composición fitoquímica y a la actividad antioxidante de este fruto. Para determinar el efecto de distintos genotipos de manzana establecidos en la Sierra de Querétaro sobre la reducción de las complicaciones de la diabetes en ratas 'Wistar' (280–300g) inducidas con estreptozotocina, los frutos se liofilizaron, se administraron a las ratas durante cuatro semanas y se determinaron los niveles de glucosa y el perfil de lípidos, creatinina en suero y orina, y enzimas antioxidantes en el hígado y el riñón de los animales, asimismo, se evaluó la capacidad antioxidante (CA) de los frutos por el método ABTS. 'Golden Delicious' disminuyó los niveles de glucosa en la sangre en 31% y los de LDL en 40% además de incrementar los niveles de HDL en cerca de 20%. 'Micromalus' mostró un efecto protector en la función renal con valores de 0.68 ± 0.1 para depuración de creatinina comparado con 0.56 en el testigo. 'Golden Delicious' incrementó la actividad antioxidante en el hígado evaluada a través de la enzima GST en 53 %, mientras SM1 logró un aumento de 20 % de dicha actividad en el riñón. Por lo que respecta a la CA, las manzanas rojas, 'Micromalus' y 'Red Delicious' comercial presentaron los mayores porcentajes de inhibición del ABTS (97.57 y 97.37 %). Se encontró una correlación positiva entre los fenoles totales con la actividad hepática de Glutación Peroxidasa ($R= 0.49$, $P \leq 0.01$), con los triglicéridos ($R= 0.40$, $P \leq 0.05$) y con la depuración de creatinina ($R= 0.44$, $P \leq 0.01$); además se observa una correlación positiva entre la capacidad antioxidante con la depuración de creatinina ($R= 0.37$, $P \leq 0.05$) y con la actividad renal de glutación peroxidasa ($R= 0.37$, $P \leq 0.05$). Se concluye que el consumo de manzanas 'Golden Delicious', 'SM1' y 'Micromalus' previene los daños causados por las complicaciones de la diabetes.

Palabras clave: *diabetes mellitus*; compuestos fenólicos; capacidad antioxidante, genotipos de manzana

ABSTRACT

Mexico is ranked in the 9th place in the world in mortality provoked by diabetes. Epidemiologic studies have linked apple consumption with a less risk of cardiovascular diseases, asthma and diabetes. This is attributed to the phytochemical composition and antioxidant activity of this fruit. To determine the effect of different genotypes of apple established in Querétaro on the reduction of the complications of diabetes, in 'Wistar' rats (280-300 g) diabetes induced with streptozotocin, fruits were lyophilized, administered to the rats in their diet during four weeks and the levels of glucose and lipid profile, serum creatinine and urine, and antioxidant enzymes in the liver and kidney of the animals were evaluated. The antioxidant capacity (CA) of the fruits was also assessed by the ABTS method. 'Golden Delicious' decreased the levels of glucose in the blood in 31 % and LDL in 40 % and increased the levels of HDL in nearly 20 %. 'Micromalus' showed a protective effect in kidney function with values of 0.68 ± 0.1 for creatinine depuration as compared with 0.56 obtained in the control. 'Golden Delicious' increased the antioxidant activity in the liver, evaluated by means of the enzyme GST in 53% while SM1 augmented the same activity in the kidney in 20%. Concerning the CA, red apples, 'Micromalus' and commercial 'Red Delicious' showed the highest percentages of inhibition of the ABTS (97.6 and 97.4 %). Positive correlations between total phenols with liver activity of glutathione peroxidase ($R= 0.49$, $P \leq 0.01$), with triglycerides ($R= 0.40$, $P \leq 0.05$) and with creatinine depuration ($R= 0.44$, $P \leq 0.01$) were found; Furthermore, positive correlations between antioxidant capacity with creatinin depuration ($R= 0.37$, $P \leq 0.05$) and with liver activity of glutathione peroxidase ($R= 0.37$, $P \leq 0.05$) were also found. We conclude that the consumption of apples 'Golden Delicious', 'SM1' and 'Micromalus' are useful for the prevention of the damage caused by complications of diabetes.

Key Words: *diabetes mellitus*; phenolic compounds; antioxidant capacity, apple genotypes

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a:

Tacho por tu amor, paciencia, comprensión, por tu compañía y apoyo, por compartir mi vida y logros esta tesis también es tuya. Te amo

Marian por llegar a mi vida, por ser luz en mi camino, por darme tu sonrisa cada día. Te amo mi princesa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

DIOS

Te agradezco a ti Dios, por darme la vida, el tiempo y la fuerza para lograr mis metas, la voluntad y coraje para hacer este sueño una realidad,

Mis padres

Por su apoyo, porque a pesar de estar lejos, siempre están ahí, por su cariño, por compartir mis sueños y anhelos.

Mis hermanos

Por ser amigos, cómplices y hermanos, me han enseñado el valor de un equipo, de la amistad y la complicidad, gracias por compartir uno más de mis sueños.

Mis sobrinos Omar, Ricky, Yatzil y Sam por alegrar distintos momentos de mi vida con sus sonrisas, espero ser un ejemplo para ustedes.

Al **Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche** por su inmenso apoyo, por ser mi guía durante este recorrido y sobre todo por ser paciente y no dejarme dar por vencida.

A cada uno de los integrantes de mi comité de tesis:

A las **Dras. Rosalía Reynoso Camacho** y **Minerva Ramos Gómez** por la ayuda otorgada para realización de este trabajo, porque siempre tuvieron tiempo y paciencia para ayudarme a resolver mis dudas.

A la **Dra. Miriam Araceli Anaya Loyola** y **MC María del Rocío Arellano Jiménez** por la aportación de sus conocimientos y sus valiosas sugerencias que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis **Profesores de la Maestría en Nutrición Humana** por compartirme sus conocimientos.

A **Ma. Pueblito León Sánchez** por la ayuda otorgada y colaboración en todo momento durante todo el tiempo de la Maestría en Nutrición Humana.

A **mis compañeros de generación**, por convivir y trabajar juntos gracias por su amistad.

A los todos los **amigos** que me apoyaron en este camino.

A los chicos de los distintos laboratorios, a Coco y Mariana ya que sin su ayuda no hubiera sido posible concluir este trabajo.

A las **Familias Mendoza Freyre, García García, Méndez Cárdenas** por todo su apoyo durante la realización de la maestría.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Diabetes mellitus</i>	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Alteraciones metabólicas en la diabetes.....	4
2.1.3. Complicaciones de la diabetes.....	5
2.1.4. Sistema de defensa antioxidante.....	7
2.1.5 Tratamiento de la diabetes.....	9
2.1.5.1 Tratamiento farmacológico.....	9
2.1.5.2 Tratamiento no farmacológico: alimentos nutracéuticos.....	10
2.2. Generalidades de la manzana.....	13
2.2.1. Antecedentes históricos.....	13
2.2.2. Distribución e Importancia nacional y local.....	14
2.2.3. Botánica del manzano.....	15
2.2.3.1. Taxonomía.....	15
2.2.3.2. Morfología.....	16
2.2.3.3. Fisiología.....	17
2.2.4. Requerimientos ecológicos del cultivo.....	18
2.2.5. Prácticas del cultivo.....	19
2.2.5.1 Poda.....	19
2.2.5.2. Fertilización.....	19
2.2.5.3. Raleo.....	19
2.2.5.4. Riegos.....	20
2.2.5.5. Control fitosanitario.....	20
2.2.5.6. Cosecha.....	20
2.2.6. Composición y compuestos nutracéuticos de la manzana.....	21
III. JUSTIFICACIÓN.....	26

IV. HIPÓTESIS.....	27
V.OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo General	28
5.2. Objetivos Específicos.....	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1. Material biológico	29
6.1.1. Animales de experimentación.....	29
6.1.2. Manzanas	29
6.2. Caracterización física y química del la manzana	30
6.2.1. Determinación de pH, acidez titulable y sólidos solubles	30
6.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos	30
6.2.3. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	31
6.3. Experimento <i>in vivo</i>	31
6.3.1. Grupos experimentales y administración de las dietas.....	31
6.3.2. Inducción de diabetes con estreptozotocina.....	33
6.3.3. Determinaciones.....	33
6.3.3.1. Glucosa sanguínea.....	33
6.3.3.2. Triglicéridos, colesterol total y HDL en el suero.....	33
6.3.3.3. Creatinina en el suero y la orina	34
6.3.3.4. Determinaciones enzimáticas	35
a) Glutación-S-transferasa en riñón e hígado.....	35
b) Glutación reducido en riñón e hígado	36
c) Glutación peroxidasa en el riñón y el hígado.....	37
6.4. Análisis estadísticos.....	38
6.4.1. Análisis físicos y químicos y ensayo <i>in vitro</i> de las manzanas	38
6.4.2. Ensayo biológico <i>in vivo</i>	38
6.4.3. Análisis de correlación.....	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	40
7.1. Análisis físicos y químicos de las manzanas	40
7.1.1. Acidez total titulable, pH y sólidos solubles	40
7.2. Fenoles totales y capacidad antioxidante	41
7.3. Efecto hipoglucemiante e hipolipidémico de los genotipos de manzana	43

7.3.1. Consumo de alimento.....	43
7.3.2. Peso corporal	45
7.3.3. Glucosa sanguínea.....	46
7.3.4 Lípidos séricos.....	47
7.3.5. Prevención del daño renal	50
7.3.6. Actividad de enzimas en órganos	51
7.3.7. Análisis de correlación.....	55
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismo potencial mediante el cual la hiperglucemia produce sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial y se activan las cuatro rutas de generación de daño por hiperglucemia	5
Figura 2.2. Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno.....	9
Figura 2.3. Árbol de manzano en floración.....	16
Figura 2.4. Desarrollo del fruto del manzano	17
Figura 7.1. Consumo de alimento diario de ratas diabéticas tratadas con diferentes genotipos de manzana.....	44
Figura 7.2. Evolución del peso corporal de ratas diabéticas alimentados con dietas suplementadas con diferentes genotipos de manzana.....	45
Figura 7.3. Concentración de glucosa sanguínea de ratas diabéticas alimentadas con diferentes genotipos de manzana.....	46
Figura 7.4. Efecto de la adición de manzanas sobre la concentración de GSH (Glutatió n reducido) en el hígado	52
Figura 7.5. Efecto de la adición de manzanas sobre la concentración de GSH (Glutatió n reducido) en riñones de ratas ‘Wistar’	53
Figura 7.6. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de GST (Glutatió n-S-transferasa) en el hígado	53

Figura 7.7. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de GST (Glutación-S-transferasa) en riñón.....	54
Figura 7.8. Correlación entre fenoles totales y SST	56
Figura 7.9. Correlación entre colesterol y LDL	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Capacidad antioxidante total de frutos y hortalizas de México	12
Tabla 2.2 Composición de 100 g de pulpa fresca de manzana	23
Tabla 2.3. Flavonoides y estructuras químicas de la manzana	25
Tabla 6.1. Características de las manzanas de distintos genotipos usados en este estudio.....	29
Tabla 6.2. Tratamientos experimentales para la evaluación del tratamiento de diabetes con manzana	32
Tabla 7.1. Sólidos solubles totales, acidez total titulable y pH en los diferentes genotipos de manzana evaluados en este estudio.....	41
Tabla 7.2. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los genotipos de manzana	42
Tabla 7.3. Efecto de dietas suplementadas con manzana sobre la concentración de glucosa sanguínea a través del tiempo en ratas diabéticas	47
Tabla 7.4. Efecto de distintas dietas de manzana sobre la concentración de lípidos séricos de ratas después de 4 semanas de consumo	49
Tabla 7.5. Depuración de creatina en ratas ‘Wistar’ sometidas a distintas dietas con manzana.....	51
Tabla 7.6. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de Glutación peroxidasa (GPx)	55
Tabla 7.7. Coeficientes de correlación y significancia estadística	57

I. INTRODUCCION

La diabetes es un desorden de salud crónico metabólico y que en los últimos años ha sufrido un incremento en el mundo. Actualmente existen entre 6 y 10 millones de diabéticos en la población mexicana. De éstos, cada año se registran 40,000 defunciones lo que coloca a nuestro país en el 9° lugar en este rubro (Ávila *et al.*, 2007).

Las complicaciones propiciadas por la diabetes disminuyen la calidad de vida de los pacientes, lo que a su vez genera altos costos en el sector salud. Los reportes indican que las muertes ocasionadas por esta enfermedad son debidas a complicaciones renales o cardiovasculares (OMS, 2003; Olaiz *et al.*, 2006).

El consumo de frutas y hortalizas es consistentemente asociado con una disminución de los lípidos séricos, lo que conlleva a una reducción, no sólo en el riesgo de complicaciones en la diabetes, sino de accidentes cerebrovasculares y de obesidad (Vidal *et al.*, 2005).

Estudios epidemiológicos han vinculado el consumo de manzana, en particular, con un menor riesgo de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, asma y diabetes, lo cual se asocia a la composición fitoquímica y a la actividad antioxidante de esta fruta, la cual varía considerablemente entre los distintos cultivares, y en función de las condiciones de cultivo y su estado de madurez (Boyer y Liu, 2004).

Se ha observado que la ingesta de manzanas protege la oxidación de las LDL *in vitro*, siendo el efecto mayor cuando se usó jugo de manzana completa o piel de la misma, que cuando sólo se utilizó jugo de pulpa. Existen evidencias que indican que el consumo de manzanas también disminuye la probabilidad de desarrollar accidentes cardiovasculares en pacientes con *diabetes mellitus*. Asimismo, se ha visto que el consumo de esta fruta se asocia con la pérdida de peso corporal y disminución de la glicemia (Palomo *et al.*, 2010).

Por otro lado, en las zonas altas de algunos estados del centro del país, como Querétaro, existen microrregiones que cuentan con climas adecuados para el cultivo del manzano bajo temporal, en ellas son propicias las condiciones de

estrés hídrico, térmico y nutrimental, lo que se refleja en la composición del fruto, el contenido de azúcares, ácidos y compuestos fenólicos los cuales resultan benéficos para la salud humana (Hecke *et al.*, 2006).

Recientemente se han introducido en la Sierra de Querétaro, que incluye los municipios de Cadereyta y San Joaquín, diversos genotipos de manzano que tales como variedades comerciales, mutantes de 'Golden Delicious', así como diversos híbridos a partir de cultivares comerciales, como 'Gala', 'Anna', 'Red Delicious', etc., con el propósito de evaluar su comportamiento agronómico, la calidad de su fruta, sus posibles usos industriales y su aceptación entre el público consumidor. Se espera que la variación fenotípica obtenida se asocie con una variación en sus propiedades funcionales o nutraceuticas que proporcionen beneficios a la salud.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto del consumo de distintas variedades de manzana establecidas en la Sierra de Querétaro sobre la reducción de las complicaciones cardiovasculares y renales presentadas en ratas 'Wistar' diabéticas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Diabetes mellitus*

2.1.1. Definición

La *diabetes mellitus* (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por una hiperglucemia crónica que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, como consecuencia de alteraciones en la secreción o acción de la insulina, o en ambas (FID, 2006).

La diabetes afecta ahora al 7% de la población adulta mundial, por lo que es un importante problema de salud pública en México. En los últimos años, las complicaciones propias de la enfermedad han provocado que ésta ocupe el primer lugar como causa de muerte con 11 % del total de las defunciones de ambos sexos. En México la población de personas diabéticas se encuentra entre los 6.5 y los 10 millones, con una prevalencia nacional de 10.7% en personas de entre 20 y 69 años). Actualmente, México ocupa el 9° lugar a nivel mundial por incidencia de diabetes y se espera que en los próximos años el número de pacientes diabéticos aumente (FMD, 2009).

Los niveles elevados de glicemia desencadenan mecanismos de defensa, entre los cuales están: la proteólisis en el músculo y la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y de intermediarios del ciclo del ácido cítrico en el hígado, la oxidación de los ácidos grasos y la formación de cuerpos cetónicos. Estas alteraciones producen cambios en indicadores bioquímicos que sugieren una posible situación de estrés oxidativo (EO) (Mathews y Van Holde, 1996). Éste juega un papel central en la patogénesis y desarrollo de la diabetes. Se ha demostrado que el EO aumenta debido al estado de hiperglucemia presente en la diabetes, la cual a su vez dañaría directamente el endotelio a través de la vía enzimática de la aldosa reductasa, la vía de productos de glicación avanzada, la vía de la hexosamina y activación de la vía de la proteína quinasa C (Nawroth *et al.*, 2000; González *et al.*, 2009).

2.1.2. Alteraciones metabólicas en la diabetes

Se han sugerido cuatro cambios bioquímicos claves activados por un mecanismo en común, sobreproducción de radicales superóxido, inducido por la hiperglucemia (Figura 1):

- 1) aumento de flujo a través de la vía de los polioles: El incremento de esta vía trae dispuesto cambios severos que incluyen la disminución en los niveles de nicotinamida- adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH), glutatión y miositol; cada uno con un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (Tomlinson *et al.*, 1992).
- 2) Aumento de la formación de productos de glicación avanzada (AGE's): Los AGE's son liberados a la sangre y se unen a macrófagos, donde incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales activan al factor nuclear kappa-B (NF- κ B) que promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento (Brownlee, 2001) (Figura 2.1).
- 3) Activación de la proteína quinasa C (con efectos que van desde la oclusión vascular a la expresión de genes proinflamatorios): Este compuesto que se eleva en el interior de células expuestas a elevadas concentraciones de glucosa (Chibber *et al.*, 2003). Lo anterior puede deberse a la elevación de los metabolitos dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G3P), producto de la inhibición de la enzima G3PDH (Yuan *et al.*, 2000).
- 4) Aumento de la vía hexosamina: La acumulación de fructosa puede contribuir en la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de la glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato, la cual se ve incrementada. Esta glucosamina da origen a la UDP-N-acetilglucosamina que se utiliza en la formación de glicoproteínas y proteoglicanos. La activación de esta vía ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina, mecanismo que no es del todo comprendido (McClain y Crook, 1996; Ceriello y Testa, 2009).

La activación de estas vías está estrechamente vinculada a la sobreproducción del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Brownlee, 2001)

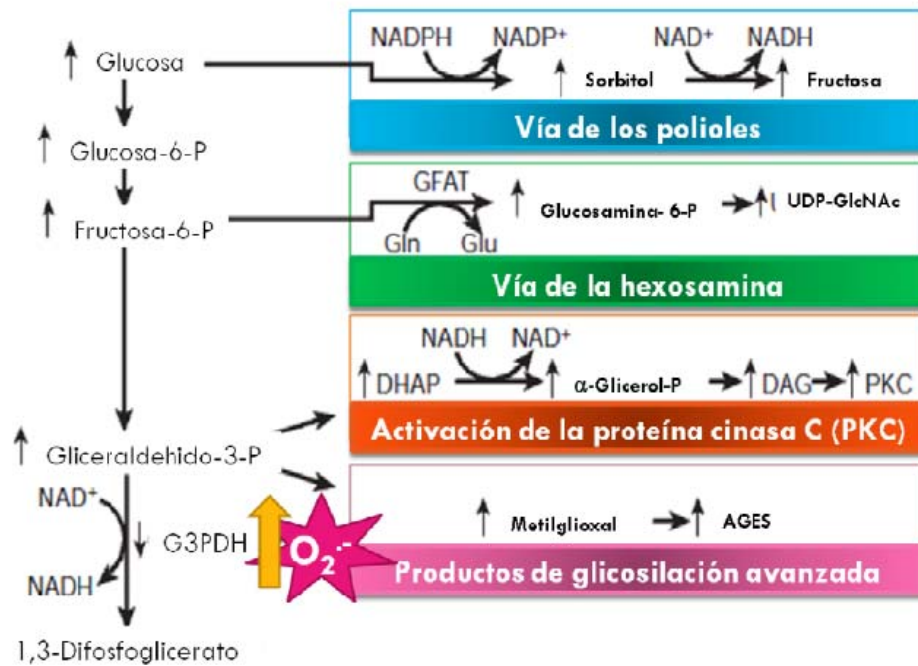


Figura 2.1. Mecanismo potencial mediante el cual la hiperglucemia produce sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial y se activan las cuatro rutas de generación de daño por hiperglucemia

2.1.3. Complicaciones de la diabetes

a) Macrovasculares

Las complicaciones macrovasculares están caracterizadas por un bloqueo y obstrucción del flujo sanguíneo por depósitos de grasa y coágulo sanguíneo. Estas complicaciones están asociadas con daños arterioscleróticos, al afectar la irrigación en distintos tejidos y órganos provocando infarto al miocardio, apoplejía o amputación de alguna extremidad en el paciente.

La arteriosclerosis se produce de manera más extensa y precoz que en la población general, además iguala la frecuencia de aparición entre varones y mujeres. Entre los factores que favorecen la aparición de la arteriosclerosis acelerada destacan los siguientes: mayor incidencia de hipertensión arterial, aumento del colesterol LDL, glicación no enzimática de las lipoproteínas y aumento de la adherencia plaquetaria (Palma, 2007).

b) Microvasculares

Las complicaciones microvasculares son aquellas que produce engrosamiento de la pared del vaso que causa sangrado, salida de proteínas y una considerable disminución en el flujo sanguíneo por dicho vaso. En este tipo de complicaciones se encuentra las alteraciones en la retina, en los glomérulos y en los nervios periféricos (retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica, respectivamente). (Palma, 2007)

Los estudios demuestran que altas concentraciones de glucosa inducen disfunción endotelial en pacientes diabéticos, así como en pacientes sanos. El papel de la generación y producción de radicales libres en la disfunción endotelial dependiente de la hiperglucemia se compensan con los antioxidantes (Ceriello y Testa, 2009).

Las dislipidemias constituyen una alteración común en la diabetes tipo 2, que consiste en una elevación de los niveles de triglicéridos séricos, reducción del HDL y predominio de las partículas de LDL pequeñas y densas (Jisieike-Onuigbo *et al.*, 2011).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la resistencia a la insulina y sus alteraciones metabólicas asociadas, como la disfunción endotelial, la dislipidemia, la hipertensión y el estrés oxidativo influyen en la aparición temprana y severidad de la aterosclerosis que desarrollan los pacientes con diabetes

mellitus ya que al ser un grupo de enfermedades inflamatorias es lentamente progresiva (Fernández *et al.*, 2000; Hurst y Lee, 2003).

La diabetes es una de las pocas enfermedades que afectan más al sexo femenino, los hombres con diabetes mueren en promedio a una edad más temprana que las mujeres (67 vs. 70 años respectivamente), y sólo 20% de los hombres que han desarrollado este padecimiento viven más de 75 años, contra 26% en el caso las mujeres (FMD, 2009).

La formación de los AGE's es uno de los mecanismos más importantes que participan en la progresión de la nefropatía diabética. Intervienen produciendo un efecto citotóxico sobre las células endoteliales y mesangiales del glomérulo, las modificaciones estructurales y funcionales del colágeno tipo IV y el aumento de su tasa de síntesis a nivel renal (Makita *et al.*, 1991; Iglesias y Díez, 1997).

2.1.4. Sistema de defensa antioxidante

Debido a que durante la diabetes existe un incremento de radicales libres inducidos por hiperglucemia, hay un aumento del estrés celular y daño a tejidos. El organismo puede sobrevivir al daño generado por altas concentraciones de radicales libres, debido a que tiene un eficiente sistema de defensa antioxidante. Este sistema de defensa antioxidante está conformado por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Esto se debe a que los antioxidantes no enzimáticos pueden sintetizarse *in vivo* o ingerirse en la dieta como las vitaminas (A, C y E) y minerales (cobre, zinc, manganeso, selenio). Dentro del sistema de defensa antioxidante endógeno existen enzimas con diferentes funciones en cada línea de defensa. Estas enzimas incluyen la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST), entre otras (Figura 2.2).

La enzima CAT cataliza la disociación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a oxígeno molecular y agua. Esta enzima se localiza principalmente en el peroxisoma de las células y su mayor actividad se ha observado en hígado y

eritrocitos, aunque también se encuentra en menor concentración en otros tejidos (Young y Woodside, 2001).

La enzima SOD cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) a H_2O_2 , el cual puede posteriormente ser removido por las enzimas CAT y GPx. En los tejidos de mamíferos, existen tres formas de la enzima SOD, cada una de ellas se localiza en diferentes compartimentos celulares: la Cu/Zn SOD se localiza en el citoplasma, la Mn-SOD se encuentra en la mitocondria de la mayoría de las células, y la EC-SOD (SOD extracelular). La EC-SOD es sintetizada por pocas células como fibroblastos y células endoteliales y es la SOD que se encuentra en mayor concentración en circulación sanguínea (Willcox *et al.*, 2004).

La enzima GPx cataliza la oxidación de glutatión a expensas del H_2O_2 u otro hidroperóxido (ROOH) y requiere selenio en su sitio activo para catalizar dicha reacción. La enzima GPx se localiza a nivel celular en el citoplasma y mitocondria, principalmente en hígado y en la mayoría de los tejidos (Young y Woodside, 2001). La actividad de esta enzima depende de una constante disponibilidad de glutatión reducido (GSH). La relación entre glutatión reducido y oxidado (GSSG), se mantiene alta en condiciones normales debido a la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR). Este ciclo de oxidación-reducción del glutatión es la fuente de protección contra niveles altos de estrés oxidativo. Por otro lado, el GSH es un cofactor de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), la cual cataliza una reacción de biotransformación de fase II, para la eliminación de xenobióticos (Wu *et al.*, 2004; Paravicini y Touyz, 2008).

Por otro lado, la enzima GR requiere de poder reductor en forma de NADPH para catalizar la reducción del GSSG. Este poder reductor proviene de la vía de las pentosas, por lo que cualquier vía metabólica que utilice este mismo poder reductor, entrará en competencia por el NADPH, lo cual puede originar una deficiencia de GSH, por lo tanto, una menor actividad de la enzima GPx.

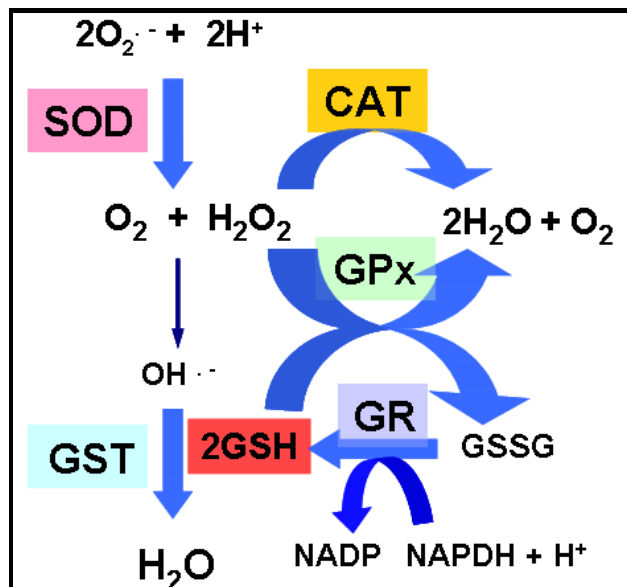


Figura 2.2. Reacciones del sistema de defensa antioxidante endógeno

SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GST: glutatión-S-transferasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, OH^{\cdot} : radical hidroxilo, NADP: nicotinamida-adenin dinucleótido fosfato

FUENTE: Modificado de Wu *et al.*, 2004

2.1.5 Tratamiento de la diabetes

2.1.5.1 Tratamiento farmacológico

Entre los principales grupos de fármacos orales se encuentran las sulfonilureas para el control de la hiperglucemia con bajos efectos secundarios; las biguanidas, que incrementan la sensibilidad a la insulina; los inhibidores de glucosidasas intestinales que disminuyen la hiperglucemia en el postprandio; las tiazolidinedionas que mejoran la resistencia a la insulina; y las meglitinidas que restauran la primera fase de secreción de insulina disminuyendo la hiperglucemia postprandial sin pico hiperglucémico entre comidas (Alfaro *et al.*, 2000).

Existen medicamentos ya en combinación fija, por ejemplo sulfonilurea mas metformina, rosiglitazona mas metformina, otra opción es la combinación libre entre estos diferentes medicamentos, la finalidad es incrementar la acción hipoglucémica (disminución de la glucosa en sangre), esto se consigue, por las

diferentes vías que actúan los medicamentos, produciendo una sinergia de tratamiento (Sánchez, 2001).

2.1.5.2 Tratamiento no farmacológico: alimentos nutraceuticos

Desde la antigüedad se han utilizado alimentos para el control de la diabetes (Modak et al., 2007). La implementación del consumo de alimentos tradicionales ofrece una nueva alternativa para la población. Al respecto México posee una biodiversidad muy amplia de especies vegetales, por lo que es importante fomentar y preservar su cultivo (Ramírez, 2009).

Además, el desarrollo y conocimiento de los mecanismos de acción de alimentos tradicionales y el surgimiento de nuevos productos alimenticios fundamentado en evidencias científicas, indican que el tipo de alimentos consumidos influyen en la conservación de la salud y previenen enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, aún falta por definir y documentar el sustento de estos hallazgos. Puesto que se han examinado algunas propiedades de productos de origen vegetal en su estado natural, y sus derivados mínimamente procesados, han surgido los alimentos funcionales o nutraceuticos a los cuales se les atribuye alguna acción curativa o preventiva más allá de sus propiedades alimentarias (Bourges, 2001).

Las investigaciones científicas recientes han confirmado la eficacia notable de algunas estrategias, como es el caso del consumo de las frutas y verduras, demostrando que poblaciones que consumen dietas que las incluyen tienen una menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas, atribuido a su contenido de compuestos antioxidantes como son los compuestos fenólicos ((Svilaas *et al.*, 2004; Pitsavos *et al.*, 2005; Nakamura *et al.* 2008).

Las frutas son alimentos que aportan una gran cantidad de vitaminas, minerales, fibra y otros compuestos bioactivos agrupados en el término genérico de fitoquímicos (Aranceta y Pérez, 2006).

Se ha sugerido que los antioxidantes tienen la capacidad de disminuir la oxidación de lípidos, proteínas y lipoproteínas(Jenkins *et al.*, 2008).

Los antioxidantes actúan de diferentes maneras, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres (Ramos *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que en particular los flavonoides presentan actividades antioxidantes, ya que son excelentes donadores de electrones o hidrógeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables. Este comportamiento está relacionado con la capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar los radicales libres (Agostini *et al.*, 2004). Estos compuestos se encuentran en manzanas, cebollas y en bebidas como té y vino (Kinsella, 1993).

El interés en la aplicación de los flavonoides y las evidencias clínicas de sus ventajas en la salud, determinó su importancia en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) accidentes cerebro-vasculares, hepatitis, hipertensión, lupus, diabetes mellitus, falla renal crónica, artritis reumatoide, y retardo del envejecimiento, entre otras (Agostini *et al.*, 2004).

Existen alimentos que contienen una gran variedad de fitoquímicos que contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total (Tabla 2.1). Entre las frutas que destacan por sus valores de actividad antioxidante se encuentran la guayaba, la papaya, la manzana y la naranja (Gutiérrez *et al.*, 2007).

La quercetina presenta propiedades antioxidantes que se relacionan con la vasodilatación y con efectos antitrombóticos, anticancerígenos y antiinflamatorios (Hollman *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007).

Estudios en ratas Wistar, con una alimentación rica en polifenoles provenientes de manzanas, produjeron efecto antiadipogénico, hipocolesterolémico y antiaterogénico, debido al estímulo del catabolismo del colesterol e inhibición de su absorción intestinal (Osada *et al.*, 2006).

Tabla 2.1. Capacidad antioxidante total de frutos y hortalizas de México

Alimentos	Capacidad Antioxidante Total (TAS) milimoles de equivalentes de Trolox/g de alimento ¹	Capacidad Antioxidante Total (TAS) milimoles de equivalentes de Trolox/g de alimento ²
Guayaba	28,5	30,25
Manzana	27,1	-
Papaya	25,1	23,7
Naranja	20,1	29,05
Plátano	8,2	12,72
Limón	6,7	4,81
Calabacita cocida	30,07	5,05
Betabel crudo	24,92	-
Aguacate	22,40	14,47
Berro	21,42	14,70
Chile	19,15	-
Lechuga	18,64	5,15
Cebolla	17,11	14,91
Betabel cocido	16,35	18,02
Pepino	9,5 4	1,75
Espinaca cocida	9,11	-
Tomate	8,11	3,21

(Fuente: Adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2007)

¹Según Gutiérrez *et al.*, 2007

²Según García *I*, Instituto de Farmacia Alimentos, Universidad de La Habana, 2000

En un estudio con jugo de manzana administrado en dosis de 5 y 10 ml por 60 días a conejos se encontró que éste redujo significativamente las lesiones ateroscleróticas de las arterias coronarias, en comparación con los grupos con dieta de colesterol alto y sin jugo, la dosis de 10 ml de jugo de manzana redujo significativamente LDL y aumento el HDL (Setorki *et al.*, 2009).

Existen evidencias que indican que el consumo de manzanas disminuye la probabilidad de desarrollar eventos cardiovasculares en pacientes con DM (Song *et al.*, 2005).

2.2. Generalidades de la manzana

2.2.1. Antecedentes históricos

Se desconoce a ciencia cierta el lugar de origen del manzano, pero es probable que proceda de la región comprendida entre los mares Negro y Caspio; aunque en asentamientos prehistóricos en los lagos suizos, se han hallado restos carbonizados de manzanas (Barbado, 2003).

Según V.V. Ponomarenko, *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem es una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia menor, podría ser esta la especie de la que se habrían originado, hace 15.000 a 20.000 años, las primeras razas cultivadas de manzano (Infoagro, 2002). El manzano se introdujo en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península. En Asia o Europa, algunos autores lo sitúan con mayor probabilidad en las montañas de Asia. Se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos (D' esclapón, 1970). Exploraciones recientes confirman que el principal progenitor de la manzana cultivada es *Malus sieversii*, y que los materiales silvestres en Kazakhstan contienen todas las características de las manzanas modernas, incluyendo tamaño, calidad y varios colores, desde el rojo hasta el amarillo y verde (Ramírez y Cepeda, 1993; SAGARPA /INCA rural, 2003). La

manzana llegó a América de la mano de los primeros colonos, que trajeron consigo semillas del árbol (Infoagro, 2002).

2.2.2. Distribución e Importancia nacional y local

El manzano es uno de los frutales más cultivados en todo el mundo, y esto se debe a su popularidad y a la facilidad de adaptación a los distintos climas y suelos. De acuerdo a la FAO, para 2010 la superficie establecida era de 4, 728,333 ha. En los últimos años, la producción mundial de manzana ha aumentado notablemente (llegando a alrededor de 70 millones de toneladas anuales) (FAO, 2010).

En 2010, China se encontró entre los principales países productores con más de 33 millones de toneladas y una superficie plantada que supera 2 millones de hectáreas, mismas que corresponden a 43.24% de la superficie mundial. EE.UU., aunque ocupa el 6° lugar en superficie cultivada, es el 2° productor mundial con 4, 212,330 toneladas, lo que refleja un buen manejo del cultivo.

México, por su parte, ocupa el 20° lugar en superficie con 61,219.53 ha plantadas, concentrándose los huertos en los estados del norte, entre los que destacan Chihuahua, Coahuila y Durango, los cuales, en conjunto, aportaron más de 80 % de la producción nacional en 2010. El resto de la producción proviene principalmente de estados del centro de la república, como Puebla, Hidalgo y Querétaro que, al contar con zonas serranas, presentan condiciones climáticas que permiten el cultivo de este frutal bajo temporal (Mendoza *et al.*, 2008).

En Querétaro, la producción de manzana en 2010 fue de 1671.5 toneladas (SIAP, 2010), concentrándose en los municipios de San Joaquín, Cadereyta, Pinal de Amoles y Amealco. Entre los principales problemas que enfrenta el cultivo en el estado, podemos mencionar la falta de agua de riego en las zonas que ofrecen las características climáticas de explotación, por lo que el cultivo es de temporal. Además, frecuentemente se presentan accidentes climatológicos como la sequía, el granizo o las heladas que pueden afectar la calidad o la cantidad de manzana producida (Mendoza *et al.*, 2008). Asimismo, existe una mala planeación en el

establecimiento y manejo de los huertos en lo que respecta a podas, raleo, control fitosanitario, por lo que se obtienen frutos pequeños (Zavala, 2005). Todo lo anterior, aunado al intermediarismo y al hecho de que las principales variedades establecidas en la región, 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' maduran en la época de mayor oferta en el mercado, propicia que la manzana que se produce en la región sea de mala calidad y, por lo tanto, se paga a bajos precios.

Con el fin de contar con materiales genéticos que superen en cantidad y calidad a los existentes, y que por lo tanto sean una alternativa económica para los productores locales, algunas instituciones como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) han introducido en la región, por medio de injerto, diversos materiales genéticos, algunos de los cuales corresponden a híbridos desarrollados en Saltillo, Coah. por el Ing. Aroldo Rumayor Flores. Éstos han sido evaluados sensorialmente, y se han determinado algunas de sus características físicas y químicas al momento de la cosecha (Mejía, 2006; Mendoza *et al.*, 2008).

2.2.3. Botánica del manzano

2.2.3.1. Taxonomía

El manzano es una especie vegetal perteneciente al orden de los *Rosales* el cual incluye a más de 3,000 especies, a la familia de las *Rosaceae*, la cual contiene en la subfamilia de *Pomoideae* a la manzana y la pera. La Especie *Malus domestica* Borkh, como lo conocemos actualmente, es un híbrido complejo generado a partir de diferentes especies de género *Malus*. Se considera que *M. sieversii* es la especie que mayor aporte genético tiene en la especie cultivada. Ésta es originaria del Caucaso, mientras que otras especies que se cree también contribuyeron al aporte de genes son *M. orientalis* Uglitzk, *M. sylvestris* Miller (manzana silvestre), *M. baccata* legitima de Siberia, *M. mandshurica*, originaria de Manchuria y *M. prunifolia* originaria de China (De Ravel, 1970).

2.2.3.2. Morfología

El árbol del manzano, con una vida promedio de 60 a 80 años, suele alcanzar una altura de 10 metros y se caracteriza por tener una copa globosa, sostenida por un tronco que generalmente se encuentra erecto y alcanza los 2 a 2.5 m de altura. Las ramas se caracterizan por insertarse con ángulos abiertos sobre el tallo principal y son de color verde oscuro o a veces dependiendo de la variedad a negruzco o violáceo (Ramírez y Cepeda, 1993).



Figura 2.3. Árbol de manzano en floración

Las raíces del manzano son fasciculadas cuando provienen de patrones clonales, se extienden mucho y se generan, por otro lado son pivotantes cuando provienen de semilla es decir por medio del desarrollo del embrión (Calderón, 1987).

Las hojas son simples y caducas en forma entre oval y elíptica, cortamente acuminadas, aserradas de dientes obtusos, blandas con el haz verde oscuro, y lanoso-blanquecinas por el envés, de doble longitud que el pecíolo, pecíolo corto de 4 a 13 cm de longitud, con cuatro a ocho nervios alternados y bien desarrollados (Lalatta, 1999).

Las flores son de tamaño grandes se encuentran casi sentadas o cortamente pedunculadas, brotan unos días antes que las hojas. Son hermafroditas y se dan en un número que va de tres a seis unidas por una inflorescencia denominada corimbo (Zavala, 2005).

2.2.3.3. Fisiología

Las yemas florales comienzan a diferenciarse en el verano del año anterior al de su brotación. Y al aproximarse el otoño entran en estado de quiescencia donde se mantienen latentes debido a factores exógenos. Después comienza el reposo cada vez más profundo, hasta que se completa a finales del otoño. Durante la primavera estas yemas permanecen en estado de reposo. Este periodo es vital para romper con la latencia y de esta manera reiniciarán su crecimiento en la primavera (Álvarez, 1998).

La fecundación del manzano es resultado de la fusión de los granos de polen y los óvulos en la flor y así fecundada se convertirá en fruto. Posterior a la fecundación viene la caída de los pétalos de la flor.

Desarrollo y maduración del fruto

Una vez fecundada la flor empieza el desarrollo del fruto. La fecundación del ovulo promueve el desarrollo de las semillas y así se estimula el crecimiento del ovario y del receptáculo floral con la posterior formación del fruto (Figura 2.4).



Figura 2.4. Desarrollo del fruto del manzano

Después de la fecundación comienza la multiplicación celular del fruto, durante la cual cada célula localizada en las paredes del ovario se divide en dos, y así sucesivamente de forma progresiva, sin que las mismas aumenten del tamaño, este periodo dura de cuatro a ocho semana y durante este el tamaño del fruto depende del número de células (Calderón, 1987).

La maduración del fruto involucra cambios de color, textura, firmeza, composición química y tasa respiratoria, incluyendo un súbito aumento coincidente con la liberación de etileno (Parra, 1994).

2.2.4. Requerimientos ecológicos del cultivo

El manzano soporta temperaturas inferiores a -10°C , sin que por ello se afecte su corteza, aunque al descender por debajo de los -15°C pueden perderse algunas yemas florales. La principal limitación para el cultivo del manzano en comarcas meridionales es el requerimiento de horas frío, el cual se sitúa por encima de las 1.000 horas frío (en función de las variedades), de 120 a 180 días sin heladas. La mejor calidad se logra en donde los días son cálidos, las noches frías y cuando hay máxima radiación. La manzana es resistente a las heladas cuando baja hasta -40°C . El florecimiento y el fruto sufren daño desde -2.2°C a -3.3°C . La manzana florece tardíamente en comparación con otros cultivos caducifolios, por lo tanto hay menos riesgo de congelación aunque en algunas variedades y regiones en donde hay gran posibilidad del excesivo frío se necesite un sistema de protección anti heladas. Es menos exigente en suelo que el peral, ya que se adapta a la mayoría de los terrenos, aunque prefiere los de aluvión, silíceo-arcillosos, pero de regadío o muy frescos. Por tener el sistema radicular superficial puede vivir en terrenos poco profundos. (Baraona y Sancho, 1998; Infoagro.2011)

Los suelos para el manzano deben ser de textura media (francos o de migajón) a ligera (arenosos), de 60cm de profundidad y bien drenados, debido a que sus raíces solamente respiran en un suelo permeable al aire y no demasiado húmedo (Gonzales y Sáenz, 1999).

En el manzano la fertilidad es relativamente menos importante que las características físicas del suelo. El pH más favorable se encuentra entre 5.5 y 6.5 aun que puede desarrollarse con pH dentro del intervalo de 4.0 y 8.5 (Álvarez, 1988).

2.2.5. Prácticas del cultivo

2.2.5.1 Poda

En este frutal es más recomendable la poda de formación de líder modificado. Para lograr una buena formación con ramas vigorosas de ángulo de inserción amplio se utilizan marcos de madera o estacas y agobio de ramas mediante amarras desde el suelo.

El objetivo de la poda de fructificación es lograr una renovación de la madera frutal mayor de cuatro años y estimular la floración en las ramillas vegetativas muy vigorosas (Baraona y Sancho, 1998).

2.2.5.2. Fertilización

El principal elemento de la fertilización es el nitrógeno; le siguen en orden decreciente por cantidad K, Ca, Mg, P, S, Fe, B, Cu, Mn y Zn (Trani *et al.*1982). Es recomendable combinar fuentes orgánicas con inorgánicas. Una fertilización muy alta en nitrógeno puede atrasar la entrada en producción de los arboles, debe aplicarse antes de la floración, de modo que esté disponible para el árbol en esta época y durante la fructificación (Baraona y Sancho, 1998).

2.2.5.3. Raleo

Algunas variedades fructifican más de lo que puede soportar el árbol, provocándose ruptura de ramas y producción de frutos pequeños y de menor calidad. Las ventajas que se obtienen son: fruta de mayor tamaño, mejora su color y sabor, se reduce la ruptura de ramas y se mantiene el vigor del árbol (Baraona y Sancho, 1998).

2.2.5.4. Riegos

Los manzanos utilizan gran cantidad de agua, de modo que un árbol adulto necesita entre 200 y 300 litros por año y kg de fruta, siendo julio el mes de máximo consumo; por lo que se requiere de al menos 700 mm y aún más en regiones cálidas (Agustí, 2011; Ramírez y Cepeda, 1993).

2.2.5.5. Control fitosanitario

El control de enfermedades se lleva a cabo, mayoritariamente, mediante métodos químicos, aun que también es posible la lucha biológica. En todo caso es posible la lucha integrada usando productos, concentraciones y épocas compatibles con la protección del medio ambiente, así como aplicando técnicas de cultivo respetuosas con éste, como injertos puente, desinsectación de herramientas, quema de restos de poda, manejo del riego, desinsectación del suelo, etc. Pero ha sido la resistencia genética, esto es, la utilización de variedades y/o portainjertos tolerantes o resistentes a enfermedades, lo que ha permitido convivir con muchas de ellas, sobretodo del origen vírico, sin restarle importancia a precio de la producción y a la calidad de los frutos. La utilización de cepas hipovirulentas también está dando buenos resultados en algunos casos (Agustí, 2011).

2.2.5.6. Cosecha

Las manzanas pueden consumirse directamente del árbol. Las manzanas destinadas a un largo almacenamiento son cosechadas en un estado de maduración menos avanzado que las que se venden inmediatamente. La recolección de manzanas dedicadas al mercado en fresco se hace a mano. Puesto que la calidad empieza a deteriorarse desde el momento de la recolección, para mantenerlas en buen estado se procede a mantenerlas en frío tan pronto como son cosechadas. Para reducir al mínimo de heridas y mallugadas que producen una merma en su aspecto, así como favorecen la entrada de hongos

que producen podredumbres, durante su almacenamiento es necesario extremar las precauciones en su manejo.

Para determinar el momento adecuado para cosechar cada cultivar, se utilizan diferentes índices de madurez. Algunos índices de madurez sirven para determinar la dureza de la carne y se determinan por el penetrómetro; el contenido del almidón se determina por la aplicación de yodo; la evaluación del color en la piel, utilizando modelos de color, la evolución del etileno por cromatografía gases; también se determina el color de las semillas y de la piel. En ocasiones un comité de maduración formado por expertos fija la fecha del comienzo de la recolección para cada cultivar aunque la mayor parte de la veces la cosecha es decidida por los agricultores o por los exportadores (Bultitude, 1983).

2.2.6. Composición y compuestos nutraceuticos de la manzana

Las manzanas representan una proporción importante de oferta de las frutas durante el año en la mayoría de los países occidentales, debido a diversos factores: la disponibilidad en el mercado, la diversidad de cultivares y la variedad de formas de consumo (fruta fresca, zumos, sidra, puré de manzanas, etc.). La composición de la manzana se muestra en la Tabla 2.2.

La manzana puede considerarse parte de una dieta saludable, siendo muy baja en calorías y fuente de fibra dietética (2.4 g/100 g fruta fresca), aunque el contenido en vitamina C es menor que en otras frutas (5-25 mg/100 g), dependiendo de la variedad, tiene concentraciones muy altas de otros antioxidantes especialmente de compuestos polifenólicos tales como la quercetina, epicatequina y polímeros de procianidinas (Tabla 2.3). Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos varía entre las distintas variedades de manzana (Chagné *et al.*, 2012).

En función de los hábitos alimentarios, se estima que las manzanas proporcionan de 20 a 25% del consumo *per capita* de los polifenoles provenientes de frutas en Estados Unidos (Aprikian *et al.*, 2003). En México, el consumo *per capita* de manzana ha variado a partir de la década anterior con una tendencia a

mantenerse en 4 kilos/*per capita*/año. En el 2007 se llegó a 6.4 kilos/*per capita*/año, cifra muy inferior a lo que se consume en Europa, con alrededor de 20 kilos/*per capita*/año (FAO, 2007; Palomo *et al.*, 2010).

Una de las características benéficas de la manzana para la salud humana es su actividad antioxidante, la que se debe fundamentalmente a su contenido en fenoles y flavonoides, éstos ayudan a reducir los niveles de lípidos en plasma y la progresión de la aterosclerosis; una fracción aislada de extracto de polifenoles de manzana disminuyó la esterificación del colesterol intestinal y la secreción de lipoproteínas (Aprikian *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2005; Palomo *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la manzana actúa disminuyendo el estrés oxidativo; gran parte del efecto se atribuye a compuestos antioxidantes presentes en este fruto, tales como la flavonoides e isoflavonoides (Boyer y Liu, 2004).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez *et al.*, 2002)

Las procianidinas contenidas en las manzanas son muy efectivas en atrapar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno *in vitro* y retardan la producción de peroxinitrito a partir de óxido nítrico; éstas reproducen la inhibición de la síntesis de ésteres de colesterol y la secreción de lipoproteínas (Vidal *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007).

Tabla 2.2 Composición de 100 g de pulpa fresca de manzana

Tamaño de porción	100 g
	Cantidad por porción
Agua	85.56 g
Energía	52 Kcal
Proteína	0.26 g
Grasas (Lípidos)	0.17 g
Hidratos de Carbono	13.81 g
Fibra dietética	2.4 g
Azúcares	10.39 g
Minerales	
Ca	6 mg
Fe	0.12 mg
Mg	5 mg
P	11 mg
K	107 mg
Na	1 mg
Zn	0.04 mg
Vitaminas	
Vitamina C	4.6 mg
Vitamina B1	0.017 mg
Vitamina B2	0.026 mg
Vitamina B3	0.091 mg
Vitamina B6	0.041 mg
Folato, DFE	3 µg
Vitamina A, IU	54 IU
Vitamina E (alfa-tocoferol)	0.18 mg

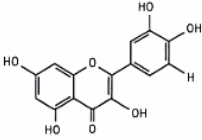
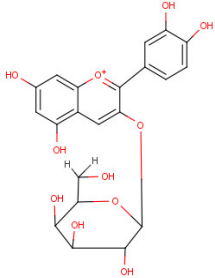
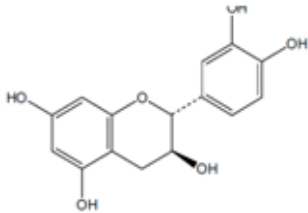
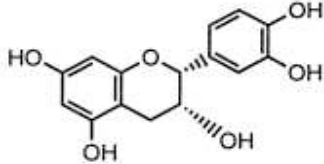
USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2010)

En las manzanas, así como en otras frutas, el contenido de fenoles totales varía en los diferentes cultivos debido a las condiciones de crecimiento, las prácticas culturales, el manejo en la cosecha y las condiciones del almacenamiento en poscosecha (Imeh y Khokhar, 2002; Boyer y Liu, 2004).

En el estudio finlandés de 10.000 personas, se asoció el consumo de manzana con la reducción del riesgo de diabetes tipo II (Knekt *et al.*, 2002).

En un estudio de aproximadamente 400 mujeres hipercolesterolémicas no fumadores se asignaron al azar a uno de tres grupos que se les administró uno de 3 suplementos: galletas de avena, manzanas o peras, tres veces por día durante doce semanas. Los participantes que consumieron cualquiera de los frutos tenían una pérdida significativa de peso después de 12 semanas de aprox. 1.21 kg, mientras que aquellos que consumieron galletas de avena no tenían una pérdida de peso significativa. Aquellos que consumieron fruta también tenían un nivel de glucosa en sangre significativamente más baja (De Oliveira *et al.*, 2003).

Tabla 2.3. Flavonoides y estructuras químicas de la manzana

Nombre del compuesto	Estructura del Compuesto	Referencia
Quercetina		Hooper <i>et al.</i> (2008)
Procianidina		Palomo <i>et al.</i> (2010)
Catequina		Boyer y Liu, (2004)
Epicatequina		Chagné <i>et al.</i> (2012)

III. JUSTIFICACIÓN

Las complicaciones de la diabetes, como la nefropatía y las enfermedades cardiovasculares, disminuyen la calidad de vida de los individuos diabéticos, generando altos costos en el sector salud. Una de las recomendaciones para el paciente diabético es un control adecuado de la dieta. Los estudios epidemiológicos han demostrado que una ingesta alta de frutas y verduras se asocia fuertemente con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, entre ellas varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II, que son las principales causas de muerte en los países desarrollados (Lampe, 1999; Artes y Hollman, 2005).

Esta asociación puede ser en parte atribuible a la presencia de los compuestos antioxidantes presentes en las frutas, que protegen las células contra el daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Se ha demostrado que la manzana actúa disminuyendo el estrés oxidativo; gran parte del efecto se atribuye a compuestos antioxidantes presentes en este fruto, tales como la quercetina, catequina, equicatequina (Boyer y Liu, 2004).

Las procianidinas contenidas en las manzanas son muy efectivas en atrapar ERO y ERN *in vitro* y retardan la producción de peroxinitrito a partir de óxido nítrico; éstas inhiben la síntesis de ésteres de colesterol y la secreción de lipoproteínas.(Vidal *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007).

En las manzanas, así como en otras frutas, el contenido de fenoles totales varía en los diferentes cultivos debido a las condiciones de crecimiento, las prácticas culturales, el manejo en la cosecha y las condiciones del almacenamiento en poscosecha (Imeh y Khokhar, 2002; Boyer y Liu, 2004).

IV. HIPÓTESIS

Existen genotipos de manzana establecidos en la Sierra de Querétaro cuyos componentes presentan una elevada capacidad antioxidante y ésta puede beneficiar el control de la diabetes y sus complicaciones.

V.OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar la capacidad antioxidante de manzanas de distintos genotipos y su efecto sobre el control de la diabetes y sus complicaciones en ratas Wistar diabéticas.

5.2. Objetivos Específicos

- Analizar las principales características físicas y químicas de los frutos de distintos genotipos de manzanas.
- Determinar la capacidad antioxidante (ABTS) *in vitro* y la concentración de compuestos fenólicos de los diversos genotipos de manzana.
- Evaluar el efecto del consumo de distintos genotipos de manzana en ratas diabéticas sobre los niveles de glucosa, el perfil de lípidos séricos, daño renal y actividad antioxidante.
- Determinar la correlación que existe entre la composición del fruto, la capacidad antioxidante y las propiedades antidiabéticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

6.1.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas 'Wistar' machos de 280 a 300 g de peso corporal (P.C.). Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla Qro. y se sometieron a un periodo de adaptación de una semana en condiciones controladas de temperatura y de ciclos de luz-obscuridad (12h: 12 h). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante todo el estudio experimental.

6.1.2. Manzanas

Se emplearon cinco genotipos de manzano los cuales se obtuvieron en una huerta semicomercial localizada en la comunidad de "El Suspiro", en el municipio de Cadereyta de Montes, Querétaro. Además, se incluyó un cultivar comercial 'Red Delicious' adquirido en un supermercado local. Las principales características de los genotipos empleados se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Características de las manzanas de distintos genotipos usados en este estudio

Características Físicoquímicas	Genotipo			
	'Golden Delicious'	'Red Delicious'	'Micromalus'	SM1
Color	Amarilla	Roja	Roja	Roja
Peso (g)	92.2	144.7	11.4	128.9
SST (°Bx)	13.4	12.7	22.2	14.6
ATT (% Ac. Málico)	2.5	3.2	1.2	4.6
Aceptabilidad sensorial	Regular	Buena	No comparable	Buena
Firmeza (N)	29.9	29.1	28.0	25.3
N° Semillas	9.0	6.5	2.2	8.2

Mejía, 2006; Mendoza *et al.*, 2008

6.2. Caracterización física y química del la manzana

6.2.1. Determinación de pH, acidez titulable y sólidos solubles

El pH se determinó utilizando un potenciómetro (Hanna, pH 2-10; Woonsocket, Rhode Island, EE.UU.) según la AOAC International (2010). El medidor de pH fue previamente calibrado con las soluciones buffer de pH 4.0, 7.0 y 10. Para realizar las mediciones se colocaron 10 mL de jugo de manzana en un vaso de precipitados y se introdujo el electrodo en el líquido, se esperó a que la lectura fuera constante para reportarla. Se tomaron lecturas por triplicado.

La acidez total titulable (ATT) fue determinada por el método volumétrico, se calculó como porcentaje de ácido málico titulando 5 mL del jugo de manzana con una solución de NaOH (0.1 N) hasta el vire de color a rosa. Los resultados fueron expresados como % de málico/ml.

Los sólidos solubles totales se determinaron por triplicado utilizando un refractómetro manual (Atago N-1E intervalo 0 – 32 °Bx) a partir de tres gotas de jugo de manzana, obteniendo los valores que fueron expresados en ° Brix. (Mendoza *et al.*, 2008). El refractómetro tiene como finalidad medir la cantidad de luz que es refractada por los sólidos en solución expresándola en una escala de 0 a 100. Se calibró el equipo con agua.

6.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 764 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 µg). El valor obtenido de la muestra se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/g (mg eq. AG/g) de manzana.

6.2.3. Capacidad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante del fruto se evaluó utilizando el método de ABTS. Este método determina la capacidad antioxidante *in vitro* de compuestos puros y materiales biológicos, se expresa como la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (ácido (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetramil-croman-2-carboxílico) ó TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, por sus siglas en inglés (Mariken *et al.*, 2004). En este método se mide la capacidad del compuesto antioxidante de atrapar al radical libre generado por el compuesto ABTS (2,2'-azinosbis-(2-aminodinopropano-HCl)), el cual se produce mediante la reacción de este compuesto con persulfato de potasio 2.5 mM.

6.3. Experimento *in vivo*

6.3.1. Grupos experimentales y administración de las dietas

En el estudio se utilizaron seis grupos experimentales de ratas diabéticas, que fueron tratadas con una dosis de fruto de manzana de 5.35g/kg peso corporal: equivalente a alrededor del consumo de tres manzanas (375 g) para una persona adulta de 70 kg de peso corporal.

También se estableció un grupo experimental de ratas diabéticas testigo. En la tabla 6.2 se muestran los diferentes grupos experimentales de ratas que se incluyeron en el estudio.

Las manzanas se cosecharon, transportaron y almacenaron a 8 °C hasta su preparación para ser liofilizadas, se cortaron en trozos de 5mm x 5mm. Una vez liofilizados se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de celofán comerciales por 15 días, se molieron para ser mezclados con el alimento.

Tabla 6.2. Tratamientos experimentales para la evaluación del tratamiento de diabetes con manzana

Grupo	Ratas	Tratamiento
1	Sanas	Alimento comercial
2	Control Diabéticas	Alimento comercial
3	Diabéticas	Alimento comercial + Manzana ‘Red Delicious’ local 0.535 g P.S./kg P.C.
4	Diabéticas	Alimento comercial + Manzana ‘Golden Delicious’ 0.535 g P.S./kg P.C.
5	Diabéticas	Alimento comercial + Manzana <i>Micromalus</i> 0.535 g P.S./kg P.C.
6	Diabéticas	Alimento comercial + Manzana ‘SM1’ 0.535 g P.S./kg P.C.
7	Diabéticas	Alimento comercial + Manzana ‘Red Delicious’ comercial 0.535 g P.S./kg P.C.

P.S.: Peso seco

P.C.: Peso corporal

Los distintos tratamientos basados en manzanas se administraron diariamente en el alimento de consumo durante cuatro semanas, posterior a la inducción experimental de diabetes. Se determinó diariamente el consumo de alimento. Se registró semanalmente el peso corporal y los niveles de glucosa sanguínea en ayuno de las ratas de todos los grupos experimentales.

Después de cuatro semanas de tratamiento se obtuvieron muestras de sangre y de orina de todos los grupos experimentales. La muestra de sangre se colectó por medio de la punción cardiaca y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para la obtención de suero, el cual se congeló a -20° C. La muestra de orina se congeló a -20° C. También se tomaron muestras de riñón y de hígado las cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C.

6.3.2. Inducción de diabetes con estreptozotocina

La inducción de la diabetes se realizó dejando a las ratas en un estado de ayuno de 12 h y posteriormente se inyectaron vía intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 50 mg/kg de peso corporal, disuelta en una solución amortiguadora de citrato de 0.1 M, pH 4.5.

Cuatro días posteriores a la inducción de diabetes con STZ se determinaron los niveles de glucosa en ayuno en los animales en estudio. Aquellos que presentaron niveles de glucosa mayores a 180 mg/dL se consideraron dentro de los grupos experimentales. Se utilizaron 7 ratas por grupo.

6.3.3. Determinaciones

6.3.3.1. Glucosa sanguínea

El nivel de glucosa se cuantificó en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal de los animales de experimentación, con un ayuno mínimo de 8 horas. Se utilizaron tiras reactivas de la marca Accutrend y un glucómetro de la marca Roche, con una sensibilidad de 60-600 mg/dL de glucosa.

6.3.3.2. Triglicéridos, colesterol total y HDL en el suero

Para la cuantificación de triglicéridos, colesterol y HDL se utilizaron kits enzimáticos comerciales de la marca Randox Laboratories. Las determinaciones se realizaron en muestras de suero de los animales de experimentación. Cada una de estas determinaciones se basa en reacciones colorimétricas.

a) Triglicéridos

Los triglicéridos presentes en la muestra de sangre reaccionan con una lipasa para formar glicerol. El glicerol, convertido a glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol cinasa, reacciona con la enzima glicerol fosfato oxidasa para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con la enzima con 4-aminoantipirina/p-clorofenol y a través de la enzima peroxidasa se lleva a cabo la formación de un compuesto de color rojo intenso llamado quinoeimina (Jacobs y VanDenmark, 1960; Koditschek y Umbreit, 1969; Trinder,

1969), el cual se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

b) Colesterol total

Para esta determinación también se utiliza el indicador quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra reaccionan con la enzima colesterol esterasa para liberar colesterol, el cual al reaccionar de nuevo con esta enzima produce colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno a partir del cual se obtiene el indicador antes mencionado (Koditschek y Umbreit, 1969). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 546 nm.

c) Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determina en la fracción HDL que queda en el sobrenadante. Por lo que esta determinación se basa en el mismo principio que la determinación enzimática de colesterol.

6.3.3.3. Creatinina en el suero y la orina

La creatinina es un producto final del metabolismo muscular. Se origina a partir de la creatina por pérdida de una molécula de agua. La eliminación de creatinina en un intervalo de 24 horas es un valor muy constante, dependiente principalmente de la masa muscular del individuo y, por otro lado, el cálculo del aclaramiento de la creatinina será un parámetro directo del funcionamiento renal y del estado nutricional. Para su determinación cabe destacar que hay varias sustancias en el suero y orina que actúan como cromógenos inespecíficos, lo que es un problema principalmente para el cálculo del aclaramiento. Por este motivo, la reacción se adapta a una medida cinética con alta especificidad en la que la

creatinina reacciona con el picrato alcalino con más rapidez que los cromógenos (metilguanidina, picramato), por lo que la medida del incremento de color en un breve período de tiempo inicial de la reacción valora principalmente creatinina, con poca influencia de los cromógenos inespecíficos (Diagnostic Chemicals Limited, 2004. No Catálogo 221-30). La concentración de creatinina en la muestra se expresó en mg/dL y se calculó a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{(A2 - A1) \text{ Muestra}}{(A2 - A1) \text{ Patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor dilución muestra} = C \text{ muestra}$$

Donde:

A2 = absorbancia final de la muestra desconocida (de suero o de orina)

A1 = absorbancia inicial de la muestra desconocida (de suero o de orina)

As2 = absorbancia final del estándar

As1 = absorbancia inicial del estándar

La determinación de este parámetro se realizó en suero y en orina utilizando kit enzimático de la marca Randox Laboratories.

6.3.3.4. Determinaciones enzimáticas

a) Glutación-S-transferasa en riñón e hígado

Para la determinación de la enzima glutación-S-transferasa (GST) se obtuvieron previamente los citosoles del órgano utilizando una solución amortiguadora de Tris-Sacarosa pH 7. Los órganos se homogenizaron en la solución amortiguadora en una relación 4:1. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 10,000 g por 20 min a 4°C y el sobrenadante se removió para su posterior ultracentrifugación (100 000 g por 60 min a 4°C) y así finalmente obtener los citosoles del sobrenadante. Los citosoles obtenidos se almacenaron en diferentes alícuotas y se congelaron a -70°C hasta su uso.

Una vez obtenidos los citosoles de los órganos, se realizaron diluciones apropiadas en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 6.5. Esta dilución se

utilizó para la determinación de GST en un ensayo por microplaca por el método de Habig *et al.*, 1974. Este método se basa en la reacción catalizada por la enzima GST entre el cofactor glutatión reducido (GSH) y el sustrato CNDB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). La reacción se realizó utilizando 50 μL de la dilución de citosol, 100 μL de solución de GSH 3 mM y 150 μL de solución de CNDB 2 mM. La conjugación del compuesto CNDB se monitoreó cada 20 segundos durante 2 minutos a una longitud de onda de 340 nm en un lector de microplacas modelo Jersa Max tunable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Las absorbancias obtenidas al primer y segundo minuto de la reacción se utilizaron para calcular la actividad de la enzima GST, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/mg proteína/min} = \frac{\Delta (\text{Abs2} - \Delta \text{Abs1})}{\text{mg proteína} * 0.0096}$$

Donde:

Abs 1= absorbancia al primer minuto del inicio de la reacción

Abs 2= absorbancia al segundo minuto del inicio de la reacción

Coefficiente de extinción molar de CNDB= $0.0096 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La concentración proteína total se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Inc, Rockford, IL, EUA) empleando una curva estándar de albúmina sérica bovina.

b) Glutatión reducido en riñón e hígado

Para la determinación del cofactor glutatión reducido (GSH) se utilizó el método propuesto por Ellman (1959) en microplaca. Se utilizaron 150 μL de extracto citosólico de órganos y se agregaron 120 μL de agua destilada y 30 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se dejó reposar por 30 min y posteriormente las muestras se centrifugaron (8500rpm por 5 min a 4°C), esto con el fin de precipitar la proteína. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de GSH. A cada pozo de la microplaca se le adicionó, en el siguiente orden: 150 μL de

amortiguador Tris-EDTA pH 8.2, 50 μ L del sobrenadante de la solución citosólica, 80 μ L de metanol y 20 μ L de solución de DTNB 2.46 mM (5,5-ditiol-2 ácido nitrobenzónico). También se utilizó un blanco con 150 μ L de amortiguador Tris-EDTA pH 8.2, 130 μ L de metanol y 20 μ L de solución de DTNB 2.46 mM. A los cinco minutos de haber agregado el DTNB, se leyeron las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 412 nm. Se utilizó una curva estándar de GSH (0-120 μ M) y los resultados se expresan como μ M de GSH/mg de proteína.

c) Glutación peroxidasa en el riñón y el hígado

La actividad GPx se midió por el método propuesto por Plagia y Valentine (1976). Se basa en la oxidación de GSH a glutación oxidado (GSSG) catalizada por GPx, que luego se acopla al reciclaje de GSSG a GSH utilizando la enzima glutación reductasa y NADPH. La tasa de consumo de NADPH se monitoreó a 340 nm, 25 ° C durante 2 min. Las absorbancias obtenidas al primer y segundo minuto de la reacción se utilizaron para calcular la actividad de la enzima GPx, utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml} = \frac{\Delta (\text{Abs}2 - \text{Abs}1) * \text{FD}}{6.22 * V}$$

Donde:

Abs 1= absorbancia al primer minuto del inicio de la reacción

Abs 2= absorbancia al segundo minuto del inicio de la reacción

FD= Factor de dilución

V = Volumen

Coefficiente de extinción molar de NADPH= 6.22

La concentración proteína total se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA), empleando una curva estándar de albúmina.

6.4. Análisis estadísticos

6.4.1. Análisis físicos y químicos y ensayo *in vitro* de las manzanas

Los resultados de las determinaciones de acidez titulable, pH, °Bx, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante *in vitro* son reportados como la media \pm la desviación estándar (DE).

6.4.2. Ensayo biológico *in vivo*

Diseño de tratamientos: Unifactorial.

Diseño experimental: Bloques al azar con siete repeticiones.

Factor de estudio: Genotipos de manzano.

Tratamientos: Los diversos genotipos: 'SM1' *Micromalus*, además de los cultivares 'Red Delicious', 'Golden Delicious' y 'Red Delicious' comercial en dosis de 0.535 g PS/kg P.C. así como el control diabético y el control sano.

Unidad experimental: Una rata 'Wistar' macho diabética de 280 a 300 g de peso corporal (P.C.).

Variables evaluadas:

- Peso corporal
- Consumo de alimento
- Glucosa sanguínea en ayuno
- Triglicéridos, colesterol total y HDL en el suero.
- Creatinina en suero y orina
- Actividades de enzimas antioxidantes y nivel de GSH

Se realizó un análisis de varianza con las variables consideradas, utilizando un nivel de confianza de 95%, además se realizó la comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer y la prueba de Dunnett. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico SPSS versión 17 (Castaño y Domínguez, 2010).

6.4.3. Análisis de correlación

Se llevó a cabo un análisis de correlación simple por pares entre las características físicas y químicas de las manzanas utilizadas y las distintas variables de respuesta evaluadas en los animales.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Análisis físicos y químicos de las manzanas

7.1.1. Acidez total titulable, pH y sólidos solubles

En la Tabla 7.1. se muestran los valores obtenidos para los distintos genotipos considerados referentes a Sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT) y pH.

Los SST fluctuaron entre 15 y 22 °Bx, valores dentro de los rangos ya establecidos para la manzana. En efecto, de acuerdo a la Norma Oficial, el contenido de sólidos solubles totales (azúcares) en la manzana para consumo en fresco debe ser mayor de 11^aBx en las variedades rojas y mixtas o parcialmente rojas y mayor de 12 ^aBx en las variedades amarillas (Norma Oficial Mexicana, 2003). El mayor porcentaje de azúcares se encontró para '*Micromalus*' (22 °Bx) mientras la menor concentración la presentaron los genotipos 'SM1', 'Red Delicious' comercial y 'Golden Delicious' (15 °Bx). El contenido de SST en todos los frutos analizados superó los límites establecidos por la Norma Mexicana NMX-FF-061-SCFI-2003 y concuerdan con los valores reportados por Mendoza *et al.* (2006) a saber 12.7 ^aBrix para 'Red Delicious', para 'Golden Delicious' 13.4 °Brix, y para *Micromalus* 22.2°Brix.

La acidez total titulable (ATT) de la fruta fresca varió entre cada cultivar. En efecto, en una plantación comercial, ubicado en Molina, Curicó, Región del Maule, Chile, los valores obtenidos en manzanas 'Red Delicious', 'Granny Smith', 'Fuji', 'Pink lady' y 'Royal Gala' fluctuaron entre 0.18 % y 0.40% de ácido málico (Vieira *et al.*, 2009; Henríquez, *et al.*, 2010). En el presente estudio los valores obtenidos de ácido málico de 0.19 para 'Red Delicious' comercial a 1.28% para '*Micromalus*'. Respecto al pH, los valores encontrados en este estudio fueron menores para las variedades rojas (3.4 para '*Micromalus*' a 4.0 para 'Red Delicious') y un poco mayor 4.1 para 'Golden Delicious'. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mendoza *et al.* (2008). Asimismo, se observa que mientras la acidez disminuye en las variedades consideradas, el pH tiende a incrementarse (R =-

0,97), lo cual se debe ciertamente a que el pH de los frutos está determinado fundamentalmente por la concentración de ácidos orgánicos presentes en el fruto. En el caso de la manzana el más abundante es el ácido málico (Lalatta, 1999).

Tabla 7.1. Sólidos solubles totales, acidez total titulable y pH en los diferentes genotipos de manzana evaluados en este estudio

Genotipo	Color	SST (°Bx)	ATT (% Ac. Málico)	pH
'Micromalus'	Roja	22 ± 0.002	1.28 ± 0.36	3.4 ± 0.02
'Red Delicious' comercial	Roja	15 ± 0.001	0.19 ± 0.01	4.0 ± 0.02
'Red Delicious' local	Roja	19 ± 0.001	0.45 ± 0.02	3.9 ± 0.01
SM1	Roja	15 ± 0.001	0.68 ± 0.01	3.7 ± 0.01
'Golden Delicious'	Amarilla	15 ± 0.001	0.25 ± 0.007	4.1 ± 0.01

Cada valor representa la media ± D.E. de tres mediciones independientes.

7.2. Fenoles totales y capacidad antioxidante

Los polifenoles confieren a los alimentos colores acentuados con diferentes matices lo que los hacen atractivos al consumidor (Araya *et al.*, 2006). Los compuestos antioxidantes presentes en los alimentos de origen natural pueden ayudar a disminuir el estado de hiperglucemia y el estrés oxidativo presente en la diabetes. La manzana se considera una fuente natural de antioxidantes como compuestos fenólicos.

En la Tabla 7.2 se muestran los valores obtenidos para compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los distintos genotipos de manzana utilizados en el presente estudio.

Las concentraciones de polifenoles fluctuaron entre 9.24 y 43.86 mg eq. AG/g, los cuales resultaron superiores a los reportados para la variedad 'Red Delicious' (11.6 mg eq. AG/g) en Chile (Enríquez *et al.*, 2010), así como los valores reportados para diversas variedades establecidas en Brasil (1.80 - 2.33 mg eq. AG/g) (Vieira *et al.*, 2009)

En el presente estudio es notorio que los genotipos correspondientes a manzanas rojas presentaron mayor contenido de fenoles respecto a 'Golden Delicious' lo cual coincide con Tsao *et al.* (2003). El contenido de compuestos fenólicos queda determinado por numerosos factores, entre los que podemos mencionar la especie, variedad, condiciones de cultivo y estado de maduración del fruto (Cacace y Mazza, 2003).

Tabla 7.2. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los genotipos de manzana

Tratamiento	Compuestos fenólicos mg eq. AG/g fruto	Capacidad antioxidante (Inhibición del ABTS, %)
<i>Micromalus</i>	43.8 ± 1.4	97.5 ± 0.2
'Red Delicious' Comercial	23.7 ± 1.7	97.3 ± 0.5
Red Delicious Local	22.6±1.2	94.3 ± 0.5
SM1	9.2 ± 1.4	39.7 ± 0.1
Golden Delicious	18.3± 1.0	78.7 ± 0.7

Cada valor representa la media ± D.E. de tres mediciones independientes.

Por otra parte, en el presente estudio se encontró que los genotipos de manzanas presentan variaciones significativas en su capacidad antioxidante (Tabla 7.2). En efecto, se observa que '*Micromalus*' muestra el mayor porcentaje de inhibición (97.5 %), seguida de 'Red Delicious' comercial 97.3%, 'Red Delicious' local (94.3%) 'Golden Delicious' (78.7%) y SM1 (37.7%).

El contenido en compuestos antioxidantes de frutas y, por tanto, su capacidad antioxidante asociada, puede verse afectado por factores fisiológicos, como la variedad y su estado de madurez, así como por factores tecnológicos, como las condiciones de conservación y procesado del fruto en cuestión (Lindley, 1998). Los alimentos difieren en su poder antioxidante y por lo tanto en su eventual capacidad para disminuir los riesgos de las enfermedades crónicas (Araya *et al.*, 2006). Los efectos benéficos a la salud de las manzanas son relacionados, en parte, con su capacidad antioxidante.

La mayor o menor capacidad antioxidante no siempre está en relación con la concentración de compuestos fenólicos, obteniéndose en este caso un coeficiente de correlación importante ($r = 0.74$).

Chagné y colaboradores (2012) reportan que cuando se evalúa la capacidad de secuestrar radicales libres no siempre es importante el contenido de compuestos fenólicos, sino más bien la posición del grupo hidroxilo de los fenoles presentes en solución.

7.3. Efecto hipoglucemiante e hipolipidémico de los genotipos de manzana

7.3.1. Consumo de alimento

Para evaluar los beneficios a la salud de los diferentes genotipos de manzana, estas fueron evaluadas en animales diabéticos. Cuando la diabetes está controlada, puede haber una disminución de la ingesta del alimento, la cual está regulado por péptidos anorexigénicos y orexigénicos que controlan los centros de saciedad y apetito, respectivamente (Patel, 2006). La Figura 7.1 muestra el consumo de alimento de los grupos experimentales tratados durante el periodo de

tiempo considerado. Se observa que el grupo control sano presentó un patrón de consumo relativamente estable con un aumento en la semana 2 del 6.7% comparado con la semana 1. El patrón de consumo para el grupo control diabético fue similar al del grupo sano, ya que presentó también un aumento máximo en la segunda semana, pero en este caso fue más pronunciado (9.8 %). Por su parte, los grupos de ratas diabéticas tratadas con manzana mostraron una evidente disminución en el consumo del alimento en la semana 2 con respecto al grupo control. Siendo mayor la disminución para los genotipos 'SM1' (6.9%) y 'Red Delicious' local (6.5 %).

Lo anterior sugiere que el fruto pudiera estar actuando de manera similar a la insulina o incrementando su secreción, lo que estimularía la expresión de péptidos anorexigénicos, regulando así la ingesta de alimento de los animales de experimentación. La expresión de estos péptidos es inhibida o estimulada por la insulina. Durante la diabetes, la disminución y/o actividad de la insulina, altera la regulación de estos péptidos lo que conduce a un aumento del consumo de alimento (Arora y Anubhuti, 2006).

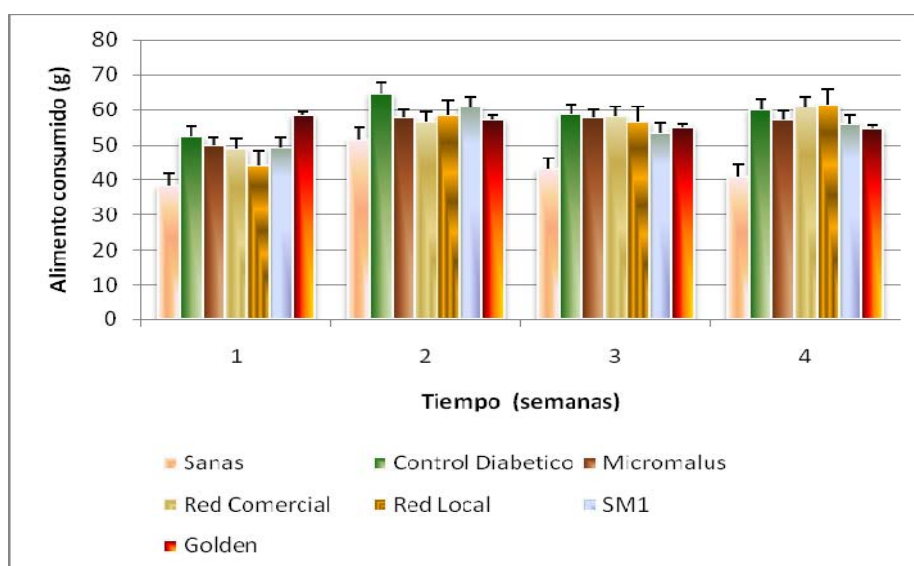


Figura 7.1. Consumo de alimento diario de ratas diabéticas tratadas con diferentes genotipos de manzana.

Cada barra representa la media \pm EE por grupo

7.3.2. Peso corporal

A pesar de que los pesos iniciales de los animales correspondientes a los distintos tratamientos fueron muy similares, se registró una disminución de éste en todos los tratamientos con relación al grupo de ratas sanas (Figura 7.2). El grupo correspondiente al control sano continuó ganando peso hasta la cuarta semana de tratamiento (277g a 380 g). Por su parte, el grupo control diabético y los grupos tratados con manzana perdieron peso desde la primera semana hasta el final del tratamiento. En la semana 2, el tratamiento suplementado con manzana 'Red Delicious' local tuvo la menor pérdida de peso con 47% respecto al grupo diabético control y dicha merma fue estadísticamente significativa. Al final del tratamiento la disminución de peso fue significativa con 'Golden Delicious' con una merma de 30,6 %, en relación al control diabético ($p \leq 0.05$). En un estudio administrando jugo de gámbulo a ratas diabéticas en diferentes dosis se observó también una pérdida de peso de (22.7%) para una dosis de 2g/kg (Martínez, 2008).

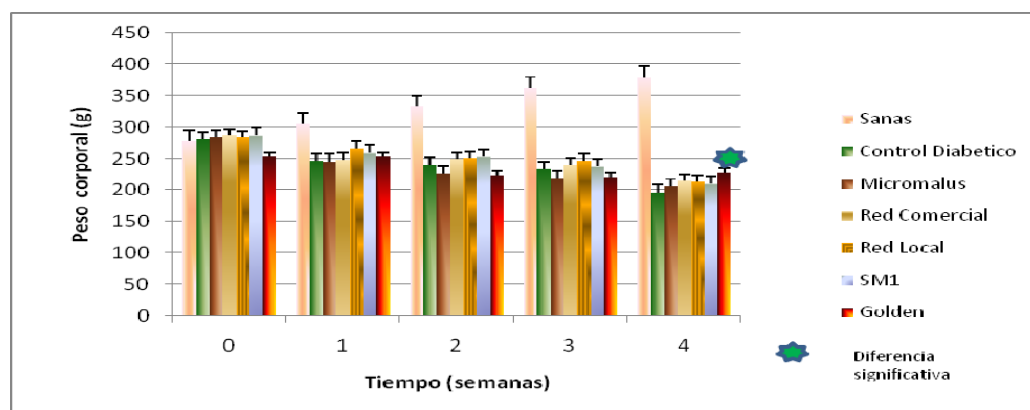


Figura 7.2. Evolución del peso corporal de ratas diabéticas alimentados con dietas suplementadas con diferentes genotipos de manzana.

Cada barra representa la media \pm EE por grupo; n= 7 ratas por grupo

La evolución del peso corporal durante la diabetes es un factor importante que indica el progreso de la enfermedad. Esto se debe a que una de las características de la diabetes es la disminución del peso corporal debido a la pérdida de masa muscular y la degradación de los triglicéridos provenientes del

tejido adiposo, como resultado de la demanda de energía del organismo que no puede cubrir la glucosa, al no poder ser incorporada a los tejidos dependientes de insulina.

7.3.3. Glucosa sanguínea

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por un constante estado de hiperglucemia que, dependiendo del avance de la enfermedad, puede afectar a ciertos órganos y tejidos. El progreso de la enfermedad incrementa el riesgo de desarrollar alguna complicación propia de la diabetes.

En la Figura 7.3 se muestra la evolución de las concentraciones de glucosa sanguínea de las ratas diabéticas de los tratamientos experimentales a través del tiempo. Se observa un incremento significativo en los niveles de glucosa de todos los tratamientos, incluyendo el testigo (control diabético), desde 250 mg/dl hasta 600 mg/dl. Se observó que a la cuarta semana se presentó un efecto hipoglucémico en las ratas diabéticas tratadas con manzana ‘Golden Delicious’ y SM1 con respecto a su grupo control diabético.

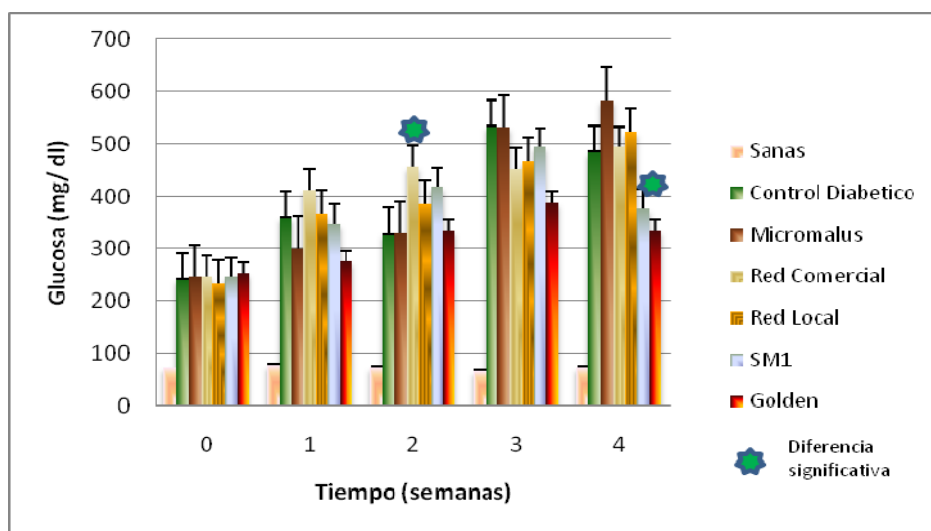


Figura 7.3. Concentración de glucosa sanguínea de ratas diabéticas alimentadas con diferentes genotipos de manzana.

Cada barra representa la media \pm EE por grupo; n= 7 ratas por grupo

Los estudios in vitro reportados, muestran que los compuestos fenólicos reducen los niveles de glucosa en la sangre (Al-Awwadi *et al.*, 2004) y podrían

participar en algunos mecanismos, los cuales incluyen la estimulación de la insulina por las células β -pancreáticas (Ohno *et al.*, 1993), la estimulación adrenérgica de la absorción de glucosa (Cheng y Liu, 2000) y la inhibición de gluconeogénesis (Waltner *et al.*, 2002).

En la Tabla 7.3 se observa que en la segunda semana ‘Red Delicious’ comercial propicia un incremento significativo en los niveles de glucosa sanguínea. Por el contrario, en la semana cuatro se manifiesta una disminución significativa para los tratamientos ‘Golden Delicious’ y ‘SM1’. Este resultado concuerda con lo reportado por De Oliveira (2003) en el cual pacientes que consumieron manzana tres veces al día por 12 semanas redujeron significativamente sus niveles de glucosa en la sangre.

Tabla 7.3. Efecto de dietas suplementadas con manzana sobre la concentración de glucosa sanguínea a través del tiempo en ratas diabéticas.

Tratamiento	Concentración de glucosa (mg/dL)			
	8 días	15 días	21 días	28 días
Sanas	79.2	73.2	66.7	74.5
Control Diabético	362.0 ab	329.5 a	535.7 b	486 bc
Micromalus	301.0 a	328.8 a	532.5 ab	584 c
Red Delicious comercial	412.1 b	457.8 b	452.2 a	493.5 bc
Red Delicious local	368.0 ab	384.4 ab	468.2 a	523.5 c
SM1	348.4 ab	417.8 ab	493.5 ab	376.2 a
Golden Delicious	275.1 ab	334.4 a	388.4 ab	334.4 ab
D.M.S. Dunnet 0.05	109.4	97.4	79.0	116.3
F	1.19	2.75	1.61	3.96

Cada valor representa la media; n= 7 ratas por grupo

Los promedios con letras distintas difieren significativamente según la Prueba de Dunnet (P=0,05).

7.3.4 Lípidos séricos

El perfil de lípidos incluye colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el suero sanguíneo. Las

alteraciones de este perfil son una complicación común de la diabetes inducida con STZ en animales de experimentación (El y Hassanin, 2007). Además de los niveles elevados de glucosa en la sangre, la diabetes se acompaña del metabolismo lipídico anormal conocido como dislipidemia diabética. Desafortunadamente, el control de la dislipidemia diabética no siempre acompaña al control de los niveles de glucosa en la sangre. La hiperlipidemia, como es comúnmente nombrada, representa un factor de riesgo importante para el desarrollo prematuro de la aterosclerosis cardiovascular en los pacientes diabéticos (Kaur *et al.*, 2002).

En la Tabla 7.4 se muestra el perfil de lípidos después de cuatro semanas de consumo de los distintos tratamientos.

Para triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL, los valores obtenidos en el control diabético son significativamente superiores a aquellos observados en el control sano, debido a trastornos lipídicos considerados como una consecuencia de la alteración del metabolismo de los carbohidratos, debido a la capacidad limitada que tiene el organismo para utilizar la glucosa y movilizar los depósitos de grasa para cubrir las necesidades energéticas (Andrade y Lifshitz, 2000).

El tejido adiposo requiere de la insulina para realizar su función en incorporar glucosa y reesterificar los ácidos grasos que son almacenados en forma de triacilglicéridos. En la diabetes, la función de reesterificación no se realiza eficientemente, incrementándose los niveles de triacilglicéridos en sangre (Goldstein *et al.*, 2003). Estas alteraciones en el metabolismo lipídico posteriormente, pueden producir lesiones vasculares afectando a grandes y pequeños vasos (Téllez, 2005). Los distintos tratamientos con manzana produjeron un aumento de triglicéridos siendo el máximo con *Micromalus* 45%, 'Golden Delicious' 34%, 'Red Delicious' comercial 8%, mientras 'SM1' disminuyó 22% seguida de 'Red Delicious' local con 4%, todas respecto al control diabético, lo que sugiere que SM1 pudiera tener un efecto protector cardiovascular.

Por otro lado, el colesterol total disminuyó alrededor de 29 % con el tratamiento correspondiente a 'SM1', seguido de 'Red Delicious' local con 17%, siendo estos tratamientos significativos respecto al control diabético. Los

compuestos fenólicos podrían participar en la reducción de la absorción de colesterol, probablemente debido a las interacciones con los transportadores de colesterol presentes en el borde en cepillo de la célula intestinal; al reducir la absorción de colesterol, disminuye el aporte de colesterol al hígado, lo que incrementa la expresión del receptor de LDL para compensar la menor disponibilidad de sustrato, disminuyendo el colesterol plasmático (Fernández *et al.*, 2007).

Tabla 7.4. Efecto de distintas dietas de manzana sobre la concentración de lípidos séricos de ratas después de 4 semanas de consumo

Tratamiento	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Sanas	88.8 ± 4.3	84.3 ± 11.6	46.2 ± 7.3	38.1 ± 13.7
Control diabético	109.4 ± 27.2ab	116.8 ± 55.2 b	46.5 ± 12.3 abc	91.2 ± 52.6 b
<i>Micromalus</i>	159.4 ± 64.5 c	107.4 ± 9.6 ab	50.7 ± 6.60 bc	56.7 ± 12.6 a
Red Delicious Comercial	118.9 ± 32.3 abc	111.3 ± 13.4 ab	47.9 ± 9.1 abc	63.4 ± 15.6 ab
Red Delicious Local	105.2 ± 19.1 ab	97.0 ± 17.9 a	41.6 ± 13.2 ab	55.3 ± 14.4 a
SM1	85.4 ± 19.1 a	98.6 ± 15.7 a	39.9 ± 7.0 a	61.2 ± 13.3 ab
Golden Delicious	146.2 ± 63.6 bc	109.7 ± 30.3 ab	56.1 ± 9.4 c	57.2 ± 13.4 a
D.M.S.	47.94	29.63	11.35	29.71
Dunnet 0.05				
F	2.95	1.32	2.42	1.91

Cada valor representa la media ± D.E.; n= 7 ratas por grupo

Los promedios con letras distintas difieren significativamente según la Prueba de Dunnet (P=0,05).

Por lo que respecta a las lipoproteínas, resulta conveniente señalar que en la diabetes generalmente se presentan elevadas concentraciones de LDL y bajas

concentraciones de HDL lo que repercute en problemas cardiovasculares (Goldstein *et al.*, 2003). Después del consumo de los tratamientos con manzanas se encontraron diferencias significativas respecto a las HDL y LDL. En efecto, se aprecia un aumento en los niveles de HDL hasta ~21% con 'Golden Delicious' con respecto al control diabético.

Para las LDL se aprecia una disminución significativa de alrededor de ~40% con 'Red Delicious' local, seguida de *Micromalus* y 'Golden Delicious' con ~37% y 'SM1' ~32%. Se ha reportado que los compuestos fenólicos afectan la secreción de las apolipoproteínas (Apo), en especial la Apo-B, resultando una lipoproteína VLDL modificada, lo que produce una mayor actividad de la lipasa lipoproteica y una menor cantidad de LDL circulante (Fernández *et al.*, 2007). Por lo anterior, el consumo manzana de la Sierra de Querétaro podría reducir los factores de riesgo de enfermedad cardiaca en pacientes con diabetes y con hipercolesterolemia.

7.3.5. Prevención del daño renal

Los riñones filtran la sangre para eliminar los productos de desecho que el cuerpo no puede utilizar; por ejemplo, la creatinina que es un producto de la descomposición de la creatina y es una parte importante del metabolismo de nitrógeno y la cual es eliminada por la orina. Si el nivel de creatinina sérica es alto es posible que esté presente un daño en la función renal (Bazari, 2007).

Por lo anterior, la depuración de creatinina se utiliza para estimar la tasa de filtración glomerular y establecer que tan dañados se encuentran los riñones. En la Tabla 7.5 se observa que los animales tratados con el genotipo *Micromalus* presentan un incremento significativo en los niveles de depuración de creatinina del 21% con respecto al control diabético. Este resultado sugiere un efecto protector del genotipo *Micromalus* contra alteraciones en la función renal. En un estudio realizado con ratas, se observó que la administración de proantocianidina en forma oligomérica mejoró los marcadores de la función renal (Yokozawa *et al.*, 2011).

Tabla 7.5. Depuración de creatina en ratas ‘Wistar’ sometidas a distintas dietas con manzana

Grupos	Depuración de creatinina
Sanas	1.19 ± 0.12
Diabéticas control	0.56 ± 0.15 ab
‘Red Delicious’ comercial	0.50 ± 0.14 ab
‘Red Delicious’ local	0.35 ± 0.14 ab
‘Micromalus’	0.68 ± 0.10 b
SM1	0.29 ± 0.08 ab
‘Golden Delicious’	0.20 ± 0.05 a
D.M.S. Dunnet 0.05	0.44
F	1.52

Cada valor representa la media ± D.E.; n= 7 ratas por grupo

Los promedios con letras distintas difieren significativamente según la Prueba de Dunnet (P=0,05).

7.3.6. Actividad de enzimas en órganos

Durante la diabetes, el organismo presenta un aumento del estrés oxidativo y un deficiente sistema de defensa antioxidante endógeno (Lee *et al.*, 2003). La enzima GST y el cofactor GSH son importantes biomarcadores del sistema de defensa antioxidante endógeno, al ser considerados como una de las principales líneas de defensa del organismo. La conjugación de xenobióticos con el cofactor GSH, junto con la actividad de la enzima GST representa una de las vías de detoxificación más utilizadas. La enzima GST cataliza la reacción de conjugación del GSH con xenobióticos, los cuales son precursores de la formación de radicales libres, eliminando productos del estrés oxidativo y neutralizando productos electrofílicos tóxicos (Stranley, 1991). Para conocer el estado oxidativo de los órganos de los animales de experimentación, se determinaron la concentración de GSH y actividad enzimática de GST y GPx en tejido.

En las Figuras 7.4 y 7.5 se muestran la concentración del cofactor glutatión reducido (GSH) en el hígado y el riñón respectivamente. Los resultados mostraron que la concentración de GSH aumentó 11% en el hígado con ‘Red Delicious’ comercial, el tratamiento con ‘Red Delicious’ local disminuyó 25%, seguida de ‘Micromalus’ en 15%, sin ser significativas respecto al control. En el riñón

'*Micromalus*' aumento el nivel de GSH en un 90%, seguida de 'Red Delicious' comercial en 20%, sin embargo este aumento en el contenido de GSH renal no fue significativo. En un estudio realizado con ratas, se observó que la administración de proantocianidina en forma oligomérica disminuyó la generación de ROS en la diabetes (Moskaug *et al.*, 2005). Esto sugiere que las proantocianidinas presentes en las manzanas probablemente mejoran el estrés oxidativo producido en la diabetes.

La actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en el hígado y el riñón de ratas diabéticas tratadas con manzana, respectivamente. La actividad de GST (Figura 7.6) en el hígado de los animales tratados se incrementó en un 53% con el genotipo 'Golden Delicious', este incremento fue significativo. Por otra parte, en el riñón (Figura 7.7) el aumento fue de 20% para el genotipo 'SM1' siendo estadísticamente significativo.

Este efecto supresor de la glucosa en ROS puede estar asociado con un aumento muy rápido en el contenido de NADPH y por lo tanto de la relación de GSH / GST, inducida por la glucosa alta, esto sugiere que el efecto dependiente de la glucosa en ROS implica los cambios metabólicos que aumentan la capacidad antioxidante como respuesta citoprotectora (Rebelato *et al.*, 2011).

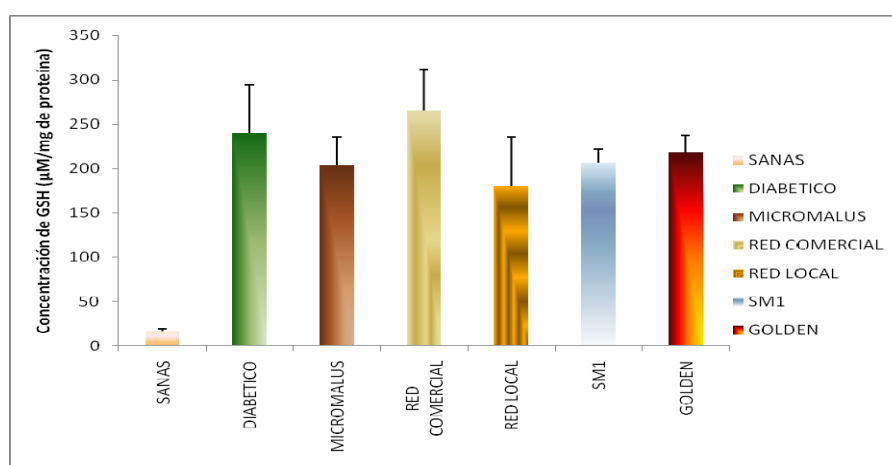


Figura 7.4. Efecto de la adición de manzanas sobre la concentración de GSH (Glutatión reducido) en el hígado

Cada barra representa la media \pm EE por grupo; n= 7 ratas por grupo

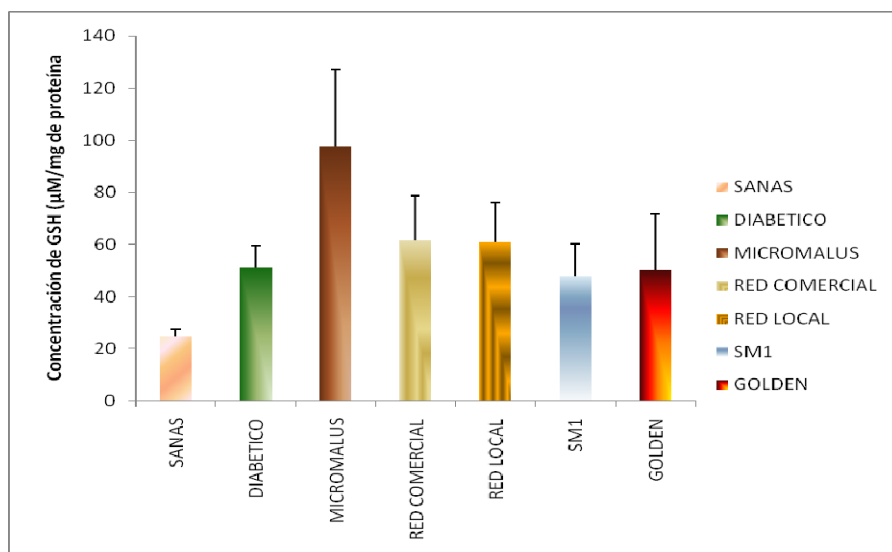


Figura 7.5. Efecto de la adición de manzanas sobre la concentración de GSH (Glutación reducido) en riñones de ratas ‘Wistar’.

Cada barra representa la media ± EE por grupo; n= 7 ratas por grupo.

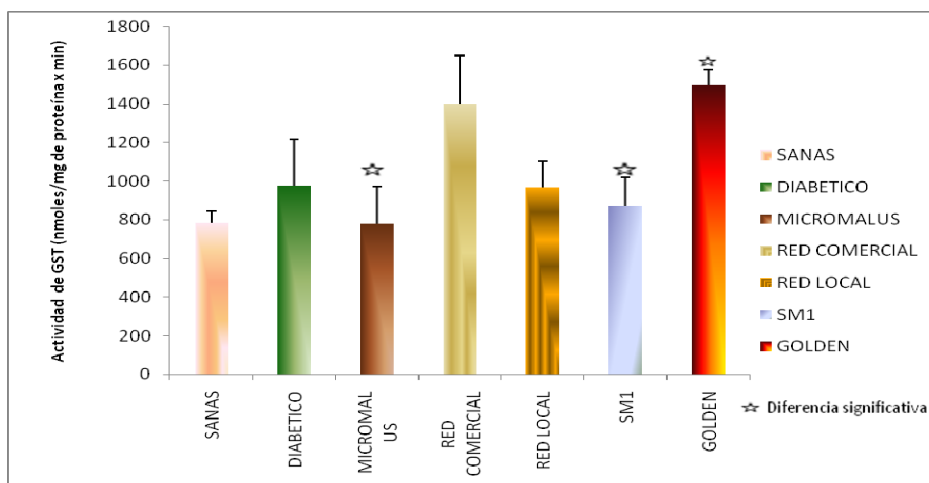


Figura 7.6. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de GST (Glutación-S-transferasa) en el hígado.

Cada barra representa la media ± EE por grupo; n=7 ratas por grupo.

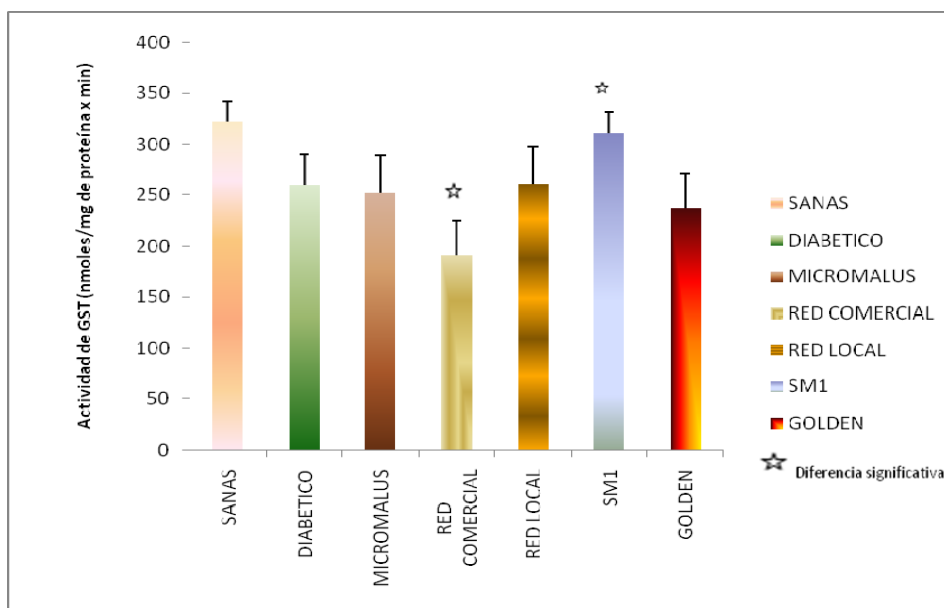


Figura 7.7. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de GST (Glutación-S-transferasa) en riñón.

Cada barra representa la media \pm EE por grupo; n=7 ratas por grupo.

En un estudio realizado con ratas diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina, se observó que el tratamiento con el extracto acuoso de la planta *Scoparia* dulces por tres semanas incrementó significativamente la actividad de GST y los niveles de GSH, tanto en hígado como riñón de ratas, respecto al grupo control (Pari y Latha, 2005).

Los resultados obtenidos son interesantes en el área ya que la GST brinda quimioprotección contra otras enfermedades crónico-degenerativas, debido a que la enzima es la principal enzima encargada de detoxificar y eliminar cualquier sustancia dañina o tóxica al organismo, así como de eliminar especies reactivas del oxígeno propias del metabolismo endógeno. En base a lo anterior, se sugiere que la inducción de enzimas detoxificadoras puede ser parte del mecanismo quimioprotector de las manzanas.

Por otro lado, la actividad enzimática de la Glutación Peroxidasa (GPx) (Tabla 7.6) aumento significativamente en el hígado con el genotipo 'Red Delicious' local en un 21% y en el riñón con 'Golden Delicious' (118%), 'Micromalus' (114%) y 'Red Delicious' comercial (87%). En un estado de estrés

oxidativo como la diabetes, la concentración y actividad de dichos biomarcadores, se encuentra disminuida tanto en el suero como en los órganos. Sin embargo, los compuestos antioxidantes ingeridos en la dieta pueden ayudar a disminuir el estado oxidativo en la diabetes, al actuar como inductores de enzimas antioxidantes.

Tabla 7.6. Efecto de la adición de manzanas sobre la actividad enzimática de Glutación peroxidasa (GPx)

Grupos	GPx Hígado μmol/min/ml	GPx Riñón μmol/min/ml
Sanas	1.18 ± 0.21	1.66 ± 0.21
Diabéticas control	1.83 ± 0.12 ab	1.12 ± 0.33 a
'Micromalus'	1.59 ± 0.17 a	2.40 ± 0.08 b
'Red Delicious' comercial	1.75 ± 0.13 a	2.10 ± 0.35 b
'Red Delicious' local	2.22 ± 0.06 b	1.16 ± 0.29 a
SM1	1.79 ± 0.21 ab	1.06 ± 0.30 a
'Golden Delicious'	1.68 ± 0.12 a	2.45 ± 0.03 b
D.M.S. Dunnet 0.05	0.42	0.76
F	2.14	6.41

Cada valor representa la media ± D.E.; n= 7 ratas por grupo

Los promedios con letras distintas difieren significativamente según la Prueba de Dunnet (P=0,05).

7.3.7. Análisis de correlación

Se realizó una matriz de correlación simple por pares en la que se incluyeron todas las variables de estudio, tanto las referentes a las características físicas y químicas de las manzanas, como a las variables de respuesta obtenidas en los animales como consecuencia de las dietas a las que fueron sometidos (Tabla 7.7). Se detectaron algunas correlaciones significativas, las cuales se describen a continuación.

a) Correlaciones entre las características físicas y químicas de los frutos

Se advierte una correlación positiva y significativa de los sólidos solubles totales con el contenido de fenoles totales ($R= 0.85$, $P < 0.01$). La regresión lineal se muestra en la Figura 7.8. En dicha figura se observa que los genotipos estudiados se mantienen cerca de la recta de regresión, siendo *Micromalus* quien parece definir el coeficiente significativo. Entre los factores fisiológicos importantes en maduración de la fruta están los sólidos solubles totales (SST) y ácidos orgánicos, pues juegan un papel importante en la relación de azúcar a ácido afectando el sabor y color de frutas. Bioquímicamente la relación es de vital importancia, pues en la maduración la glucosa sigue dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico (Avalos y Perez-Urria, 2009).

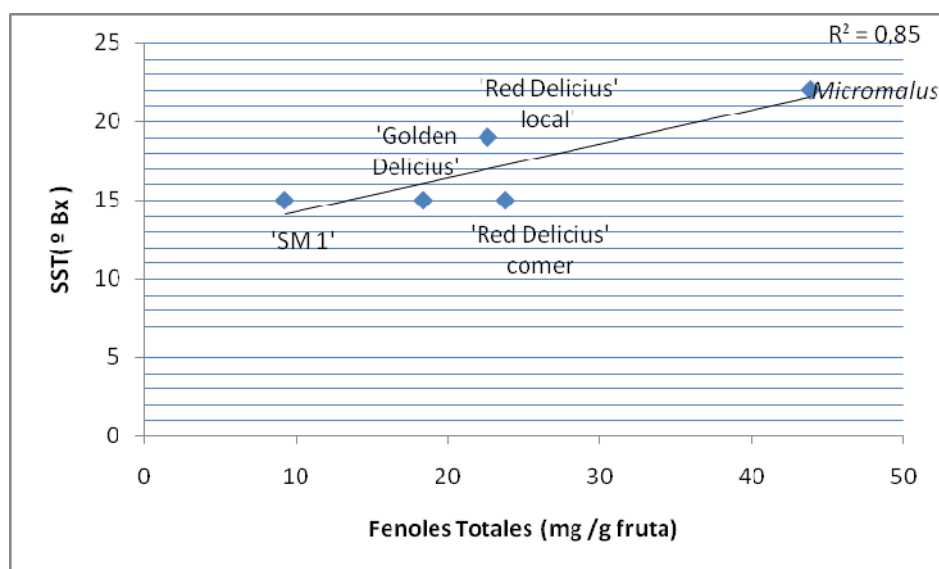


Figura 7.8. Correlación entre fenoles totales y SST.

Tabla 7.7. Coeficientes de correlación y significancia estadística

Variables	Peso (0)	Glucosa(0)	Peso(1)	Glucosa(1)	Peso(2)	Glucosa(2)	Peso(3)	Glucosa(3)	Peso(4)	Glucosa(4)	Colesterol	HDL	LDL	Triglicéridos	Aclaramiento	GSH riñón	GSH hígado	GST riñón	GST hígado	GPx riñón	GPx hígado	Fenoles	CA	SST	AAT	pH	
Peso (0)	1																										
Glucosa(0)	-0,213	1																									
Peso(1)	0,670**	-0,238	1																								
Glucosa(1)	0,002	0,113	0,044	1																							
Peso(2)	0,507**	-0,054	0,808**	0,133	1																						
Glucosa(2)	0,242	0,055	0,108	0,232	0,377	1																					
Peso(3)	0,299	-0,076	0,697**	0,049	0,859**	0,308*	1																				
Glucosa(3)	0,060	0,173	-0,180	0,138	-0,300	0,020	-0,278	1																			
Peso(4)	0,159	-0,066	0,540**	-0,081	0,759**	0,263	0,872**	-0,426**	1																		
Glucosa(4)	0,107	0,053	-0,119	0,243	-0,239	-0,022	-0,292	0,136	-0,222	1																	
Colesterol	0,142	0,026	0,074	0,015	0,177	-0,138	0,191	0,112	0,181	-0,180	1																
HDL	-0,156	0,104	-0,055	-0,199	-0,026	-0,142	0,133	-0,177	0,336*	-0,003	0,185	1															
LDL	0,172	-0,027	0,061	0,132	0,170	-0,083	0,134	0,179	0,013	-0,184	0,877**	-0,232	1														
Triglicéridos	-0,149	0,018	-0,133	-0,072	-0,119	-0,008	-0,063	0,031	0,170	0,175	-0,004	0,288	-0,148	1													
Aclaramiento	0,072	-0,021	0,023	-0,029	-0,034	-0,104	-0,099	0,092	-0,158	0,123	0,479**	-0,116	0,459**	-0,095	1												
GSH riñón	-0,186	-0,392	-0,209	0,106	-0,255	-0,377*	-0,327*	-0,035	-0,216	0,204	0,023	-0,010	0,032	0,076	-0,075	1											
GSH hígado	-0,105	-0,096	-0,009	-0,122	0,008	-0,165	-0,055	-0,179	0,061	-0,322*	0,435**	0,242	0,299	0,021	0,312	0,028	1										
GST riñón	0,120	0,171	0,180	0,131	0,084	-0,012	0,077	0,263	-0,087	0,076	0,142	-0,287	0,218	-0,084	0,061	-0,161	-0,367*	1									
GST hígado	-0,174	0,113	-0,182	0,044	-0,096	0,210	0,153	-0,089	0,145	-0,105	-0,219	0,202	-0,221	0,018	-0,295	-0,324*	0,007	-0,169	1								
GPx riñón	-0,249	0,125	-0,334*	0,075	-0,231	-0,091	-0,116	0,010	0,012	0,085	-0,070	0,183	-0,112	0,262	0,012	0,157	-0,105	-0,167	0,095	1							
GPx hígado	0,031	0,098	0,027	0,093	0,035	-0,069	0,015	-0,057	-0,046	0,061	0,111	0,057	0,036	-0,190	0,085	0,055	-0,002	0,015	-0,407**	-0,368**	1						
Fenoles	0,082	-0,050	-0,113	-0,124	-0,288	-0,248	-0,276	0,200	-0,116	0,571**	0,112	0,253	-0,041	0,404*	0,446**	0,332	-0,015	-0,153	-0,175	0,409*	-0,157	1					
CA	-0,014	-0,004	-0,094	0,052	-0,231	-0,095	-0,090	0,013	0,006	0,513**	0,134	0,274	-0,029	0,308	0,375*	0,204	0,051	-0,328	0,114	0,371*	0,037	0,743**	1				
SST	0,165	-0,083	0,101	-0,158	-0,146	-0,290	-0,197	0,166	-0,157	0,550**	-0,060	0,035	-0,093	0,248	0,446**	0,304	-0,163	0,041	-0,385*	0,100	0,026	0,852**	0,519**	1			
AAT	0,211	-0,098	0,058	-0,222	-0,098	-0,255	-0,270	0,252	-0,200	0,331	-0,052	-0,023	-0,045	0,194	0,299	0,269	-0,138	0,186	-0,474**	0,057	-0,161	0,649**	0,003	0,797**	1		
pH	-0,318	0,135	-0,125	0,161	0,017	0,158	0,261	-0,233	0,216	-0,330	0,066	0,103	0,007	-0,118	-0,318	-0,257	0,116	-0,191	0,499**	0,022	0,143	-0,589**	0,051	-0,739**	-0,979**	1	

* = correlación significativa ($P \leq 0,05$); ** = correlación significativa $P \leq 0,01$

Asimismo, es interesante destacar la correlación positiva y significativa que existe de sólidos solubles totales con la capacidad antioxidante *in vitro* ($R = 0.52, P < 0.01$).

Para la capacidad antioxidante expresada como % de inhibición de ABTS se observa una correlación positiva con fenoles totales ($R = 0.74, P < 0.01$). Esto podría deberse un aumento en la síntesis de enzimas antioxidantes y lo que lleva a un aumento en la concentración polifenólica debido a una mayor exposición de las plantas silvestres a los extremos de temperatura, al daño por plagas y organismos patógenos, porque la síntesis de compuestos fenólicos suele ser un mecanismo de defensa (Reyes *et al.* 2005).

Otras correlaciones significativas en las características físicas y químicas de la manzana son las siguientes: acidez total titulable se correlacionó positivamente con fenoles totales ($R = 0.65, P < 0.01$), con sólidos solubles totales ($R = 0.79, P < 0.01$) y se correlaciono negativamente con pH ($R = -0.98, P < 0.01$) (a mayor acidez, menor pH, como se comentó arriba). El pH se correlaciono negativamente con Fenoles totales ($R = -0.59, P < 0.01$) y con los sólidos solubles totales ($R = -0.74, P < 0.01$).

El pH y la composición de minerales también pueden afectar la actividad catalítica de enzimas en la pared celular teniendo un profundo efecto en la estabilidad de antocianinas y la expresión del color. Estas correlaciones indican que probablemente los compuestos fenólicos y flavonas podrían ser la causa principal del poder antioxidante de la fruta (Tehrani *et al.* 2011).

b) Correlaciones al interior de las variables de respuesta obtenidas en las ratas 'Wistar'

De las variables obtenidas como respuesta al tratamiento, las correlaciones fueron las siguientes:

La concentración de LDL se correlacionó positivamente con colesterol total ($R = 0.87, P < 0.01$). En la regresión lineal (Figura 7.9.) se observa que los genotipos estudiados se mantienen cerca de la recta de regresión, sin embargo el control diabético es superior a los tratamientos con manzanas.

En efecto, una elevación en la concentración de colesterol libre conlleva los siguientes procesos, disminución de la síntesis de colesterol endógeno, disminución de los niveles de receptores para las LDL en la superficie del hepatocito, lo que implica una reducción de la captación del colesterol sanguíneo y un aumento en la concentración de LDL en sangre (Navarro *et al.*, 2009).

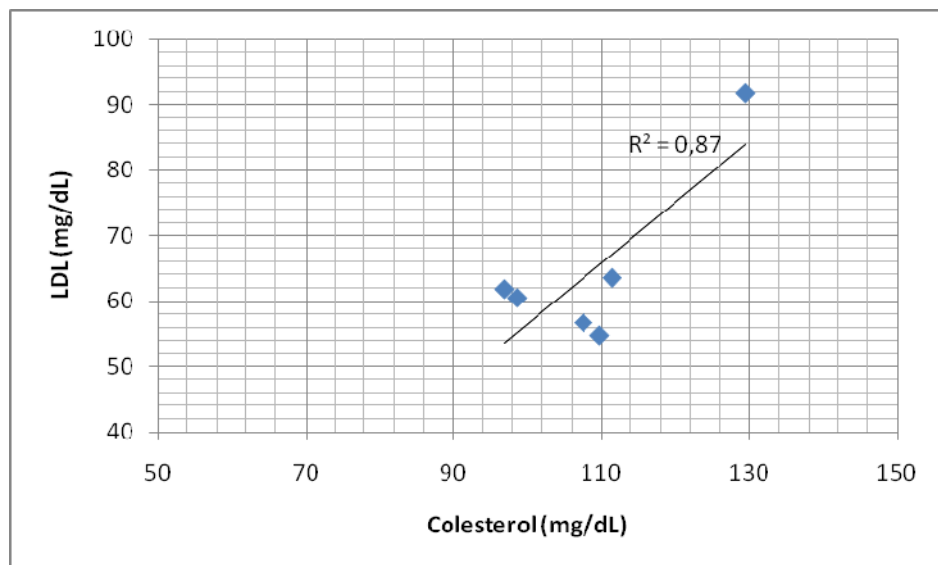


Figura 7.9. Correlación entre colesterol y LDL.

La glucosa al final del tratamiento se correlacionó positivamente con la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa renal ($R= 0.37$, $P < 0.05$). La elevación del nivel de glucosa en la sangre genera estrés oxidativo, contribuyendo a aumentar la utilización de glutatión reducido (Waggiallah y Alzohairy, 2011).

Por otro lado, la actividad de Glutación-S-Transferasa hepática se correlacionó positivamente con la concentración del cofactor GHS hepático ($R= 0.82$, $P < 0.01$). La actividad renal de Glutación peroxidasa se correlacionó positivamente con la concentración del cofactor GHS renal ($R= 0.34$, $P < 0.05$) y con la actividad hepática de Glutación Peroxidasa ($R= 0.73$,

$P < 0.01$). La actividad hepática de Glutación Peroxidasa se correlacionó positivamente con la concentración del cofactor GSH hepático ($R = 0.34$, $P < 0.05$). El efecto quimiopreventivo de compuestos fenólicos, flavonoides, isotiocianatos, entre otros compuestos, presentes en las frutas y vegetales también está asociada a la inducción de fase 2 y enzimas antioxidantes como glutación S-transferasa (GST), glutación peroxidasa (GPX), donde GSH participa como cofactor de éstas reacciones enzimáticas.

La depuración de creatinina se correlacionó positivamente con la actividad hepática de Glutación Peroxidasa ($R = 0.36$, $P < 0.05$), con colesterol total ($R = 0.48$, $P < 0.01$) y con LDL ($R = 0.46$, $P < 0.01$). Al disminuir los factores que causan estrés en el organismo mejora la función del sistema de defensa antioxidante endógeno.

c) Correlaciones entre las características físicas y químicas de las manzanas y la respuesta en los animales

Se encontró una correlación positiva entre los fenoles totales y las variables Glucosa final ($R = 0.51$, $P < 0.01$), actividad hepática de Glutación Peroxidasa ($R = 0.49$, $P < 0.01$), Triglicéridos ($R = 0.40$, $P < 0.05$) y Depuración de creatinina ($R = 0.44$, $P < 0.01$), lo que parece confirmar que la presencia en la fruta de este tipo de compuestos afecta disminuyendo las complicaciones de *Diabetes mellitus*.

Asimismo, para la capacidad antioxidante se observa una correlación positiva con Glucosa final ($R = 0.51$, $P < 0.01$), Depuración de creatinina ($R = 0.37$, $P < 0.05$) y actividad renal de Glutación Peroxidasa ($R = 0.37$, $P < 0.05$).

Por su parte, los sólidos solubles totales se correlacionaron positivamente Glucosa final ($R = 0.55$, $P < 0.01$), Depuración de creatinina ($R = 0.44$, $P < 0.01$) y negativamente la actividad hepática de Glutación-S-Transferasa ($R = -0.38$, $P < 0.05$).

Por otro lado, la acidez total titulable se correlacionó negativamente la actividad hepática de Glutación-S-Transferasa ($R = -0.47$, $P < 0.01$). El pH se

correlacionó positivamente con la actividad hepática de Glutación-S-Transferasa ($R= 0.49$, $P < 0.01$).

VIII. CONCLUSIONES

Características físicas y químicas

Las manzanas de los genotipos de epidermis roja mostraron mayor concentración de fenoles, totales y presentan características físicas y química semejantes a la variedad 'Red Delicious', obtenida del comercio.

Los genotipos rojos presentaron mayor capacidad antioxidante evaluada por el método ABTS.

Glucosa sanguínea y lípidos séricos

Las ratas alimentadas con dietas suplementadas con manzana 'Golden Delicious' y SM1 mostraron una disminución significativa en los niveles de glucosa en la sangre con relación a las ratas control diabéticas.

El consumo de manzana 'Red Delicious' local y SM1 redujo significativamente los niveles de colesterol en ratas diabéticas.

El consumo de manzana 'Golden Delicious' aumentó las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Los genotipos '*Micromalus*', 'Red Delicious' local y 'Golden Delicious' redujeron significativamente los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Prevención del daño renal y actividad enzimática

'*Micromalus*' aumentó la depuración de creatinina lo que contribuye a un efecto protector en la función renal.

Análisis de correlación

- Los análisis de correlación confirman la relación entre las características físico químicas, fenoles, capacidad antioxidante y la reducción de las complicaciones en la *Diabetes mellitus*, disminución de colesterol y aumento de la actividad antioxidante.
- Los genotipos establecidos en la Sierra de Querétaro podrían utilizarse para disminuir las complicaciones de la enfermedad

- Con estos resultados se podría buscar mejora en las variedades con perfiles específicos nutracéuticos con beneficio a la salud.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agostini, L.R., Moron Jimenez M.J., Ramon A.N. and Ayala G.A. 2004. Determination of the antioxidant capacity of flavonoids in fruits and fresh and thermally treated vegetables. *Arch Latinoam Nutr* ;54: 89-92.
- Al-Awwadi, N., Azay, J., Poucheret, P., Cassanas, G., Krosniak, M., Auger, C., Gasc, F., Rouanet, J.M., Cros, G. and Teissedre, P.L. 2004. Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol or both in streptozotocin-treated rats. *J Agric Food Chem.* 52: 1008-1016.
- Alfaro, J., Botella, F. and Simal, A. 2000. Tratamiento de la diabetes mellitus. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 24(2): 33-43.
- Andrade, S. y Lifshitz, A. 2000. Diabetes mellitus. 2a.ed. México: McGraw-Hill Interamericana
- Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S.,[†] Besson, C., Manach, C., Bernalier, A.*, Morand, C., Rémésy, C. and Demigne C. 2003. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in Rats. *J. Nutr.* 133: 1860–1865
- Aranceta, B.J. and Pérez R. C. 2006. Frutas, verduras y salud. Ed. Masson. Barcelona, España.
- Araya, L. H, Clavijo, R. C. and Herrera, C. 2006. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion.* Vol. 56 N° 4:361- 365
- Arora, S. and Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides.* 40:375-401.
- Augustí, M. 2011. Fruticultura. 2a Ed. Mundi-Prensa. Departamento de producción Vegetal Universidad Politécnica Nacional. Valencia. España. p.507.
- Ávila, C. A., Shamah L. T., Galindo G. C., Cuevas N. L., Moreno M. H. and Chávez V. A. 2007. Diabetes mellitus within low socioeconomic strata in Mexico City: a relevant problem. *Rev Invest Clin.* 59:246-55.
- Barbado, J. L. 2003. Frutales. SIR CONSULTORA (Ed), Revista AGROGATE. Buenos Aires, Argentina. p. 23.

- Baraona, C.M. y Sancho B.E. 1998. Manzana, melocotón, fresa y mora. Fruticultura especial. Universidad Estatal a Distancia(Ed). San José, Costa Rica, p. 18, 29.
- Bazari H. 2007. Approach to the patient with renal disease. En: Goldman L, Ausiello D. 23° edición. Cecil Medicine (Eds.). Filadelfia, Pa: Saunders Elsevier: Capítulo 115.
- Bultitude, J. 1983. Apples. University of Washington Press, Seattle, 323pp.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 414: 813-820.
- Boyer, J. and Liu, R. H. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. J Nutr 3: 5:1 – 15
- Cacace, J.E. and G. Mazza, 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. J. Food Sci., 68: 240-248
- Calderón, A. E. 1987. Fruticultura general. El esfuerzo del hombre. 3a Ed. Limusa (Ed), México, p. 647, 763.
- Castaño, T. E. y Domínguez, D. J. 2010. Diseño de Experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro. México. 418 p.
- Ceriello A. and Testa R. 2009. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. Diabetes Care; 32: 232-236
- Chagné, D. †, Krieger, C.†,, Rassam, M,, Sullivan M., Fraser, J., André, C., Pindo, M., Troggo, M., Gardiner, S., Henry R., Allan, A., McGhie T. and Laing, W. 2012. Qtl and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. BMC Plant Biology.12:12
- Cheng, J.T. and Liu, I.M. (2000). Stimulatory effect of caffeic acid on α 1Adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 362 (2): 122-127.
- D`esclapon, G. 1970. Variedades americanas de manzana. Nueva enciclopedia de agricultura. Acribia (Ed). Barcelona, España. p. 18

- De Oliviera, M., Sichieri R. and Moura A. 2003. Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. *Nutr*, 19:253-256.
- De Ravel, G., 1970. Variedades americanas de manzana. Nueva enciclopedia de agricultura. Ed. Acribia. Barcelona, España. pp:18- 75.
- Edwards, L. R., Lyon, T., Litwin, E. S., Rabovsky, A., Symons, J. D. and Jalili, T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 137(11): 2405-11.
- El, W. and Hassanin, L. 2007. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of alcoholic extract of *Tribulus alatus* in streptozotocin-induced diabetic rats: a comparative study with *T. terrestris* (Caltrop). *Indian J Exp Biol.* 45 (9): 785-790.
- Ellman, G. 1959. Determination of glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 82:70-79.
- FAO. 2007. The New FAOSTAT System. Production of fruit-vegetable share in world. Disponible en: <http://faostat.fao.org> Fecha de consulta: 15 de julio del 2010.
- FAO, 2010. FAOSTAT, Producción anual del manzano. <http://faostat.fao.org>. Fecha de consulta 12 de abril de 2012.
- Federación Internacional de Diabetes. Acerca de Diabetes. Enero 2009. [09 de Enero de 2009]. Disponible en la Web en: www.idf.org/about-diabetes
- Federación Mexicana de Diabetes A.C. Diabetes en números. Mayo 2010, [13 de Mayo de 2010]. Disponible en la Web en: www.fmdiabetes.org
- Fernández, A., Cabrera, R., Hernández, A., Requejo, R., Rueda, A., Fernández, F., Carmona J.R. and Basterra, N. 2000. Disfunción diastólica del ventrículo izquierdo en jóvenes con diabetes mellitus tipo 1. Factores asociados. *Rev Esp Cardiol.* 53: 603-10.
- Fernández L. J., Pinent, J. M., Bladé, M. C., Salvadó, M. J., Blay, M., Pujadas, G., Ardévol, A. and Arola, L.. 2007. Alimentos ricos en procianidinas, alimentación funcional para prevenir la aparición de síndrome metabólico. *Rev Esp de Obes.* 5 (2): 98-108

- González N. M., Salech M. F., Toro C.L. and Michea, A. L. 2009. Función y disfunción endotelial. *Rev Méd Clín Condes*. 20(3) 12547 - 12606
- Gutiérrez, Z. A., Rivero, L.L., García G. I. y Grajales C.O. 2007. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev Cub de Salud Pública*. 33(1)
- Henríquez C, Almonacid S, Chiffelle I, Valenzuela T, Araya M, Cabezas L, Simpson, R. and Speisky, H. 2010. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil J Agr Res*. 70(4): 523-536.
- Hollman P. C., Gaag M., Mengelers, M.J., Trijp J.M., Vries J.H. and Katan M.B. 1996. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21:703-7.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J., Harvey, I., Le Cornu, K., Ryder, J., Hall, W. and Cassidy, A. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 88: 38-50
- Hurst, R.T. and Lee, R.W. 2003. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. *Ann Intern Med*. 139: 824-34.
- Imeh, U. and Khokhar, S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J Agric Food Chem*. 50: 6301- 6306.
- Infoagro.2011. Toda la agricultura en Manzanas.
<http://www.infoagro.com/frutas/frutas.htm>
- Iglesias, P. and Díez, J.J. 1997. Glucación no enzimática de proteínas en la diabetes mellitus. *Med Clin*. 108: 23-33.
- Jacobs, N.J. and VanDenmark, P.J. 1960. Microbial oxidation of protoporphyrinogen, an intermediate in heme and chlorophyll biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 88: 250-255.

- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Marchie, A., Josse, A.R., Nguyen, T.H., Faulkner, D.A., Lapsley, K.G. and Blumberg, J. 2008. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J Nutr.* 138(5): 908-913.
- Jisieike-Onuigbo N.N., Unuigbo E.I., Kalu O.A., Oguejiofor C.O. and Onuigbo PC. Prevalence of dyslipidemia among adult diabetic patients with overt diabetic nephropathy in Anambra state South-East Nigeria. *Niger J Clin Pract* 2011;14:1715
- Kaur, J., Singh, P., Sowers, J.R. (2002). Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Am J Ther.* 9(6): 510-515.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. and Aromaa, A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76:560-568.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. 1993. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 85-89.
- Koditschek, L.K. and Umbreit, W.W. 1969. Alpha-glycerophosphate oxidase in streptococcus faecium F 24. *J Bacteriol.* 98: 1063-1068.
- Lalatta, F. 1999. Guía completa del cultivo de manzanas, De Vecchi (Ed), Barcelona, España. p.33,34.
- Lampe, J. W.1999. Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanism of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 70:475–90.
- Lindley, M.G. 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci Technol.* 9 (8/9): 336-40.
- Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E.F., Yang, Z., Skolink, E., Delaney, V., Friedman, E.A., Cerami, A. and Vlassara, H. 1991. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Eng J Med.* 325:836-842.
- Mathews C. and Van Holde K. *Bioquímica.* 2ª Ed. Madrid: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1996.

- Mariken, T.J., Guido, R.M., Hans-Peter V. and Aalt B. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxic.* 42:45-49.
- McClain, D.A. and Crook, E.D. 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes.* 45(8): 1003-1009.
- Mejia, G. V. 2006. Aceptación sensorial de distintos genotipos de manzana introducidos en la sierra de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de químico en alimentos. Pp 20, 27, 29-30.
- Mendoza, G. S. 2006. Evaluación de la época de maduración y calidad de genotipos de manzana en Cadereyta, Qro. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México 97 p.
- Mendoza, G. S., Martínez P. R. Á., Fernández, M. R., Rumayo F. A. and Castillo C. E. 2008. Evaluación de la época de maduración y calidad de genotipos de manzana en Cadereyta, Qro. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 14 (1):71-78.
- Martínez, S. P. M. 2008. Análisis molecular de la capacidad antioxidante del fruto de garambullo (*myrtillocactus geometrizans*) en ratas diabéticas. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, J. M.,* and Tuñón, J.M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nut Hosp.* 17:271-278
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S. and Devasagayam, T.P. 2007. Indian herbs and herbal drugs used for the treatment of diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 40: 163–173.
- Moskaug, J., Carlsen, H., Myhrstad, M. and Blomhoff, R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation^{1–4}. *Am J Clin Nutr* 81:277S– 83S.
- Nakamura, K., Nagata, C., Oba, S., Takatsuka, N. and Shimizu, H. 2008. Fruit and vegetable intake and mortality from cardiovascular disease are inversely associated in Japanese women but not in men. *J Nutr.* 138:1129-1134

- Nawroth, P., Borcea, V., Bierhaus, V., Joswig, M., Schiekofer, S. and Tritschler, H.J. 2000. Antioxidants in diabetes management. Oxidative stress, NFκB activation, and late diabetic complications. Marcel Dekker, Inc. 13:185-200.
- NMX-FF-061-SCFI-2003. Productos Agrícolas no industrializados para consumo humano- Fruta fresca - Manzana (*Malus pumila Mill*)- (*Malus domestica Borkh*) – Especificaciones.
- Ohno, T., Kato, N., Ishii, C., Shimizu, M., Ito, Y., Tomono, S. and Kawazu, S. 1993. Genistein augments cyclic adenosine 3, 5-monophosphate (cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr Res.* 19 (4): 273-285.
- Olaiz-Fernández, G., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Villalpando-Hernández, S., Hernández-Avila, M. and Sepúlveda-Amor, J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.
- Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el Mundo 2002. Reducir los riesgos y promover una vida sana. Disponible en: www.who.int/whr
- Osada, K., Suzuki, T., Kawakami, Y., Senda, M., Kasai, A., Sami, M., Ohta, Y., Kanda, T. and Ikeda, M. 2006. Dose dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple polyphenol in rats fed cholesterol. *Lipids.* 41:133-9
- Palma G. J. 2007. La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Diabetología para Cardiólogos.* 7:12H-19H.
- Palomo, G. I., Yuri, S.J.A., Moore-Carrasco, R., Quilodrán, P. A. and Neira, E. A. 2010. El consumo de manzanas contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. *Rev Chil Nutr.* 37:3; 377-385
- Paravicini, M.T., and Touyz, M. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 (Suppl. 2):S170–S180
- Pari L, Latha M. 2005. Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen Physiol Biophys.* 24(1):13-26.

- Parra, Q. R., 1994. Avances de investigación sobre el comportamiento de cultivares y portainjertos para el manzano en Cuauhtémoc, Chi. CESICH, INIFAP Campo experimental Sierra de Chihuahua, Cd. Cuauhtémoc. México. 18 p. 1
- Patel, H.R., Qi, Y., Hawkins, E.J., Hileman, S.M., Elmquist, J.K., Imai, Y. and Ahima. R.S. 2006. Neuropeptide Y deficiency attenuates responses to fasting and high-fat diet in obesity-prone mice. *Diabetes*. 55:3091-8.
- Pitsavos, C., Demosthenes, B.P., Tzima, N., Chrysohoou, C., Economou, M., Zampelas, A. and Stefanadis, C. 2005. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 82:694-699.
- Rebelato, E., Abdulkader, F., Curi, R. and Carpinelli, A.R. 2011. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS ONE* 6(8): e24507
- Ramos, I. M. L., Batista, G. C.M., Gómez, M.B.C., and Zamora, P. A.L. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*.(VIII):1.
- Ramírez, X.S. (2009). Alimentos funcionales, etnobotánica y nutrición. *CONCYTEG*. 49(2): 787-791.
- Ramírez, H., y Cepeda, M. 1993. El manzano. 2a Ed. Trillas (Ed). México, D.F.
- Ruiz, A. P., Braune, A., Hözlwimmer, G., Quintanilla-Fend, L. and Haller, D. 2007. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappa B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr* 137(5): 1208-15.
- SAGARPA, 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP), www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Sánchez R, K. 2001. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp. Cardiol* 54: 751-763.
- Scalber, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. and Jiménez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 45 (4): 287-306.
- Setorki, M., Asgary, S., Eidi¹, A., Haeri, A., and Esmaeil, N. 2009. Effects of apple juice on risk factors of lipid profile, inflammation and coagulation, endothelial

- markers and atherosclerotic lesions in high cholesterolemic rabbits. *Lip in Health and Disease* 8(39): 1-9
- SIAP. 2010. Internet: <http://www.siap.gob.mx>. Servicio de información agroalimentaria y pesca. Cierre de producción agrícola Querétaro 2010, ciclos-perennes. Manzana de todos los municipios. Fecha de consulta: 25 de enero de 2012.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Reventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299: 152-178.
- Song, Y., Manson, J.E., Buring, J.E., Sesso, H.D. and Liu, S. 2005. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J Am Coll Nutr.* 24:376-84.
- Stranley E. 1991. *Toxicological Chemistry.* 14a.ed. Lewis Publishers. Michigan, EUA.16: 69-83.
- Svilaas, A., Kaur, S. A., Andersen, F. L., Svilaas, T. , Ström, C.E., Jacobs, R.D.,† Ose, L. and Blomhoff, R. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J Nutr* 134(3):562-7.
- Téllez, J. 2005. Adiponectina y disfunción endotelial en pacientes diabéticos tipo 2. *Revista de la facultad de salud pública y nutrición, México.* Vol. 6. (4): 125 – 146
- Tehrani, M., Chandran, S., Sharif-Hossain, A. B. M and Nasrulhaq-Boyce, A. 2011. Postharvest physico-chemical and mechanical changes in jambu air (*Syzygium aqueum* Alston) fruits. *Australian Journ Crop Scien* 5(1):32-38
- Tomlinson, D.R., Willars, G.B., Carrington, A.L. (1992). Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. *Pharmac Ther.* 54: 151-94.
- Trani, P., Haag, P., Sarruge, J. y Dechen, A. 1982. Absorcao e concentracao de nutrientes en marcieira(*Pyrus malus L.*). *Proceeding Tropical Región American Society Horticultural Science.* 25:281-283

- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 6: 24-27.
- Tsao, R.; Yang, R.; Young, J. C.; Zhu, H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51(21): 6347–6353.
- Venereo G.J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil.* 31(2):126-33
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference. (2010).. Febrero 2010, [11 de Febrero de 2010]. Disponible en la Web: <http://www.nal.usda.gov/>
- Vidal, R., Hernandez-Vallejo, S. Pauquai, T., Texier, O.†, Rousset, M., Chambaz, J., Demignot, S. and Lacorte, J. 2005. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J Lipid Res* 46(2): 258-68.
- Vieira, F.G,K., Da Silva, G., Copetti, C., De Mello, R., Denardi, F. and Fett, R. 2009. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil. *Sci Hortic.* 122:421
- Waggiallah H, Alzohairy M. The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *North Am J Med Sci* 2011; 3: 344-347
- Waltner, M.E., Wang, X.L., Law, B.K., Hall, R.K., Nawano, M. and Granner, D.K. 2002. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Bio Chem.* 277 (38): 34933-34940.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44: 275-295
- Wu G., Fang, Y., Yang, S., Lupton R. J., and Nancy D. Turner. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134(3):489-492
- Young, I.S. and Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54(3):176-86.
- Yuan, S.Y., Ustinova, E.E., Wu, M.H., Tinsley, J.H., Xu, W., Korompai, F.L. and Taulman, A.C. 2000. Protein kinase C activation contributes to microvascular

barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res.* 87(5): 412-7

Zavala, I. 2005. Efecto del raleo y acolchado sobre la calidad de manzanas "Red Delicious" y "Golden Delicious" producidas en la Sierra de Querétaro, Qro. México. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México 109p.