

Efecto del extracto purificado rico en antocianinas del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) en un modelo experimental de hígado graso no alcohólico

Miguel Calderón H.¹, Cosme Quiroga G.¹, Jaime Abarzúa V.¹,
Jorge Flández R.², Juan Carlos Bertoglio C.², Nancy Solís L.³, Daniel Cabrera G.³,
Margarita Pizarro R.³, Marco Arrese J.³ y Arnoldo Riquelme P.^{3,4}

Effect of a purified anthocyanin-rich extract of maqui (*Aristotelia chilensis*) on experimental model of nonalcoholic fatty liver disease

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of hepatic lesions, ranging from benign intrahepatic lipid accumulation (steatosis) to progressive non-alcoholic steatohepatitis, in absence of other known secondary causes. Both insulin resistance and oxidative stress have been involved in NAFLD development and progression and, therefore, insulin-sensitizers and/or antioxidants have been targets of different therapeutic agents. Some natural compounds such as *Aristotelia chilensis* have a high content of polyphenols, which are known for their antioxidant and anti-inflammatory properties. **Objective:** To assess the effect of a purified anthocyanin-rich extract of maqui (*Aristotelia chilensis*) on experimental model of NAFLD. **Methods:** C57BL6 mice were separated in four experimental groups (n = 4-10) and fed a control diet (chow) or a high fat diet (HFD) with or without a purified anthocyanin-rich extract of *Aristotelia chilensis* (ACnE) (400 mg/kg/day diluted in drinking water). The hepatic effects of HFD were assessed measuring serum levels of glucose and aminotransferases, hepatic histology and triglycerides. **Results:** HFD diet induced an increase in hepatic triglycerides and histological NAFLD. Administration of ACnE did not affect serum aminotransferases, hepatic triglycerides, liver weight or histological NAFLD. **Conclusion:** Administration of an ACnE showed no effects on NAFLD in the HFD experimental model. **Key words:** Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD; non-alcoholic steatohepatitis; NASH; maqui; anthocyanin; experimental model.

Resumen

Introducción: El hígado graso no alcohólico (HGNA) constituye un espectro de lesiones hepáticas, desde la acumulación lipídica intrahepática benigna (esteatosis) hasta la esteatohepatitis no-alcohólica progresiva, en ausencia de causas secundarias conocidas. En el desarrollo y la progresión del HGNA se ha involucrado la resistencia a insulina y el estrés oxidativo y, por lo tanto, insulino-sensibilizantes y antioxidantes han sido blancos de diferentes agentes terapéuticos. Algunos compuestos naturales como la *Aristotelia chilensis* (maqui) tienen un alto contenido de polifenoles, los que presentan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. **Objetivo:** Evaluar el efecto de un extracto purificado rico en antocianinas (EACn) del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) sobre la esteatosis, en un modelo experimental de HGNA. **Métodos:** Los ratones fueron distribuidos en 4 grupos (n = 4-10). Dos alimentados con una dieta estándar (grupo control) y dos con una dieta alta en grasa- *high fat diet* (grupo HFD). Un grupo control y uno HFD recibieron además 400 mg/kg/día de EACn (grupo EACn). Se determinaron los niveles séricos de aminotransferasas y glucosa; se evaluó la histología hepática y el contenido hepático de triglicéridos. **Resultados:** HFD indujo aumento de triglicéridos hepáticos e HGNA histológico. La administración de EACn no modificó las transaminasas séricas, los triglicéridos hepáticos, el peso del hígado ni el HGNA histológico. **Conclusiones:** La administración de un EACn no mostró efectos en el modelo experimental de HGNA inducido por una dieta alta en grasa. **Palabras clave:** Hígado graso no alcohólico; HGNA; esteatohepatitis no alcohólica; EHNA, maqui; *Aristotelia chilensis*; antocianinas; modelo experimental.

¹Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

²Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

³Departamento de Gastroenterología. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

⁴Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Recibido: 15 de octubre de 2017
Aceptado: 19 de octubre de 2017

Correspondencia a:
Dr. Arnoldo Riquelme P.
Marcoleta 367,
Santiago, Chile.
Tel.: (+56 2) 23543820
a.riquelme.perez@gmail.com

Artículo Original

Introducción

Recientes estudios destacan el rol de diversos compuestos naturales con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. En ese contexto, los flavonoides son parte de una vasta familia de polifenoles. Están presentes en frutas y verduras en concentraciones variables, con actividad en la inducción de la apoptosis, propiedades antitumorales, reguladoras de insulinoresistencia y otras funciones derivadas de su poder antioxidante^{1,2}. Estructuralmente presentan un anillo benzo- γ -pirona y se agrupan según grado de oxidación y patrón de sustitución del anillo pirano heterocíclico, dando origen a 7 clases de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanonoles, flavanos y antocianinas (ACn)³. Este último compuesto está presente en altas concentraciones en diversos frutos de la región sudamericana, gestándose un creciente interés en la exploración de las propiedades terapéuticas de éstos⁴.

Las ACn se encuentran naturalmente en vegetales de colores rojos, púrpura y azul, siendo las uvas y bayas silvestres ricas en este compuesto⁵. Dentro de ellas, el maqui (*Aristotelia chilensis*) posee uno de los más altos contenidos de polifenoles y una potente actividad antioxidante⁶. Los polifenoles son metabolitos con efectos positivos en la salud⁷. Polifenoles dietarios, incluyendo antocianinas de *berries*, presentan potentes efectos antidiabéticos y representan una fuente promisorio de alimentos funcionales con propiedades antidiabéticas, como la inhibición de enzimas involucradas en la hidrólisis de carbohidratos, tales como la alfa amilasa y la alfa glucosidasa⁸ y la consecuente disminución en la tasa de absorción de glucosa⁹. En un estudio reciente, un preparado con antocianinas produjo una reducción significativa de la glicemia en ayunas en ratones obesos. Además, de manera dosis-dependiente de ACn se redujeron los niveles de glicemia de ratones insulinoresistentes. También mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones obesos hiperglicémicos con dieta alta en grasa (*High fat diet-HFD*), sugiriendo una potencial sensibilización a la insulina¹⁰.

La inflamación del tejido graso en obesidad se debe a infiltración macrofágica. Además, la obesidad está asociada a inflamación crónica del tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*-WAT), siendo un potencial mecanismo patogénico de la insulinoresistencia¹¹.

Estudios *in vitro* proponen que las ACn del maqui previenen oxidación del colesterol LDL (*low density lipoprotein*)¹². Adicionalmente, los compuestos fenólicos del extracto de maqui reducen adipogénesis y acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1¹³. A nivel metabólico, fue evaluada *in vitro* la capacidad de algunos extractos de maqui para reducir la adipogénesis y la acumulación de lípidos en adipocitos. Al

respecto, los extractos fenólicos demostraron inhibir la acumulación lipídica entre 4 y 10,8% en adipocitos maduros y entre 5,9 y 37,9% cuando son tratados a lo largo de la diferenciación¹⁴.

La administración de *Delphinol*[®], un extracto estandarizado de maqui, en ratas diabéticas redujo luego de 4 meses los valores de glicemia en ayunas, llegando a ser indistinguible de los valores correspondientes a ratas sanas. También se observó en humanos, que una única administración de 200 mg de *Delphinol*[®] disminuyó la glicemia post-prandial e insulina en personas con intolerancia moderada a la glucosa. Además, se sugiere que la delphinidina, en el *Delphinol*[®], reduce la absorción de glucosa en el intestino por interacción con el co-transportador Na/glucosa (*sodium-glucose linked transporter-SGLT-1*)¹⁵.

Sobre la base de los beneficios descritos previamente, el uso continuo de maqui tendría efectos potencialmente protectores contra patologías crónicas como enfermedades cardiovasculares y cáncer¹⁶. La mayor parte de las propiedades del maqui, se relacionan con enfermedades crónicas de origen metabólico (incluyendo dislipidemia, insulinoresistencia, diabetes mellitus y obesidad). Dichas enfermedades cardiometabólicas son parte del síndrome metabólico, que son comorbilidades habituales de pacientes con hígado graso no alcohólico (HGNA).

El HGNA es una acumulación de grasa en el hígado en un contexto de baja ingesta de alcohol con una hipertrofia hepática. El HGNA se puede dividir en esteatosis simple y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La esteatosis simple se observa como acumulación de lípidos en hepatocitos con poca o ninguna inflamación y fibrosis. La EHNA incluye inflamación y fibrosis^{17,18}. Desde el punto de vista histológico, HGNA comprende diversas enfermedades hepáticas, incluyendo esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis hepática y cirrosis. Cerca de 10% de los pacientes con cirrosis son secundarios a esteatohepatitis.

Dados estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de un extracto purificado rico en antocianinas (EACn) del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*), en un modelo experimental de HGNA utilizando ratones machos C57BL6, alimentados con una dieta rica en grasas (*HFD*).

Materiales y Métodos

Modelo experimental

Se utilizaron ratones machos C57BL6 de 4-10 semanas de edad (*Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine*). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Gastroenterología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en condi-

ciones de temperatura y luz controladas. Se les midió el peso una vez a la semana e ingesta de líquidos 3 veces por semana. En el desarrollo del protocolo de investigación se tuvo en consideración el principio de las 3R, enunciado por Russell y Burch en 1959. Para evaluar el rol de las antocianinas del maqui en HGNA/EHNA, los ratones se alimentaron con una dieta alta en grasas o *high fat diet* (HFD) (Catálogo #D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) durante 12 semanas. El grupo control recibió una dieta equilibrada o Chow diet (CHD) (LabDiet Inc.). Un grupo de animales recibió un extracto purificado rico en antocianinas (400 mg/kg/día) diluido en agua *at libitum* (EACn)^{15,21}. Este extracto del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) fue una donación del producto depurado y caracterizado por HPLC (*high performance liquid chromatography*) del laboratorio de fitofármacos de la Universidad Austral de Chile (Dr. Juan Carlos Bertoglio). Los ratones que no recibieron EACn sólo consumieron agua *at libitum*. Los grupos experimentales fueron: Grupo 1: 6 ratones que recibieron dieta control y agua *at libitum* (GC). Grupo 2: 7 ratones que recibieron dieta control con EACn en el agua durante las 12 semanas del experimento (Control-EACn). Grupo 3: 8 ratones inducidos a HGNA mediante la administración de HFD y que recibieron EACn (HFD-EACn). Grupo 4: 10 ratones que recibieron HFD, con ingesta de agua *at libitum* (HFD). Después de las 12 semanas, los ratones se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg) y Xylazina (10 mg/kg), se tomó una muestra de sangre del seno retro-orbital y fueron eutanasiados por exsanguinación. Se tomó muestra del tejido hepático en formalina para análisis histológico con hematoxilina-eosina. El resto del hígado se almacenó a -80 °C para posteriores análisis. Se midió glicemia con *hemoglucotest* (One Touch, Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics Group-Latin American), insulínemia (ELISA EZMRI-13K, Millipore) y alanina-amino-transferasa sérica (ALT) (*kit* Kovalent, Río de Janeiro, Brasil). En el tejido hepático se determinó el peso del hígado y el contenido de triglicéridos (F6428, T2449 Sigma, St. Louis, MO).

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como media $\pm$ DE. Las diferencias entre los ratones que recibieron EACn y los controles, se evaluaron mediante *test T de Student*. Se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o inferior a 0,05.

Los experimentos con animales se realizaron considerando la aprobación del comité de cuidado y el bienestar animal de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile del proyecto Fondecyt 1150327 (MA).

Resultados

Peso de los animales

Se observa que el promedio de peso disminuyó significativamente en el grupo HFD tratado con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) en comparación al grupo HFD sin *Aristotelia chilensis* (valor p: 0,01) (Figura 1).

Glicemia

Si bien se observó un aumento de la glicemia en el grupo HFD intervenido con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) en comparación al grupo HFD no intervenido, esta diferencia no fue significativa (valor p: 0,25) (Figura 2).

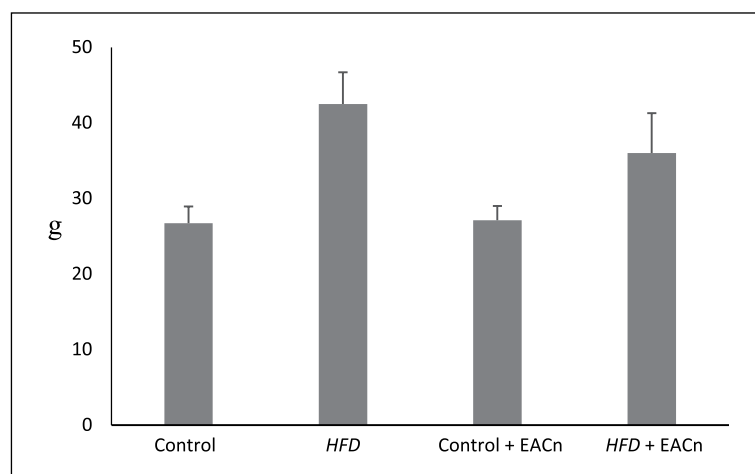


Figura 1. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre el peso de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

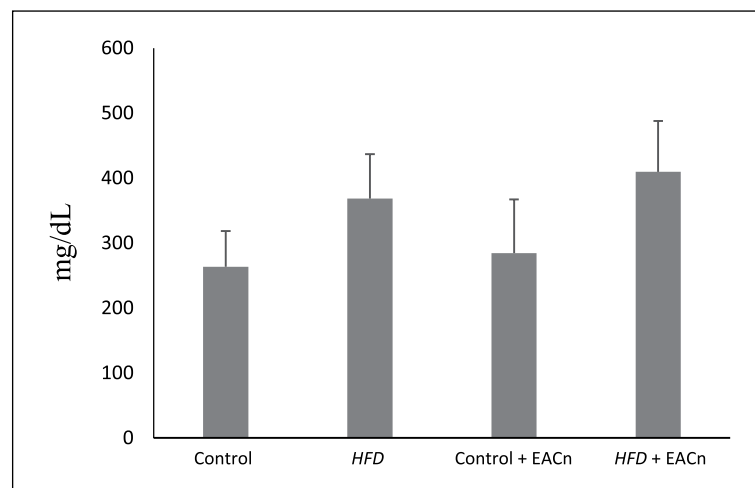


Figura 2. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre la glicemia de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

Artículo Original

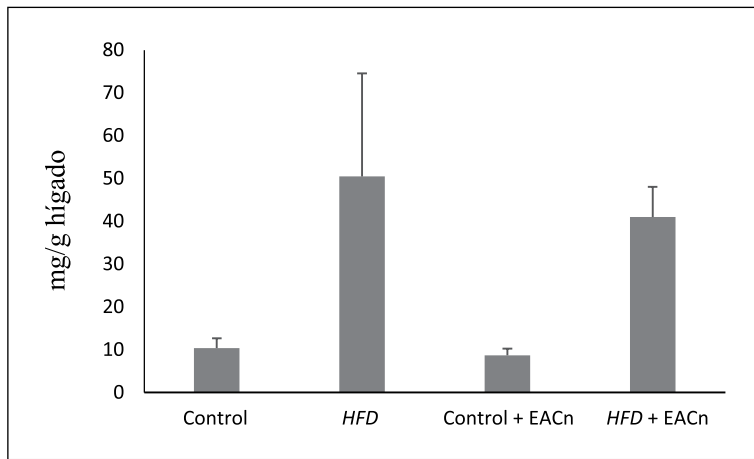


Figura 3. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre el contenido de triglicéridos hepáticos de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

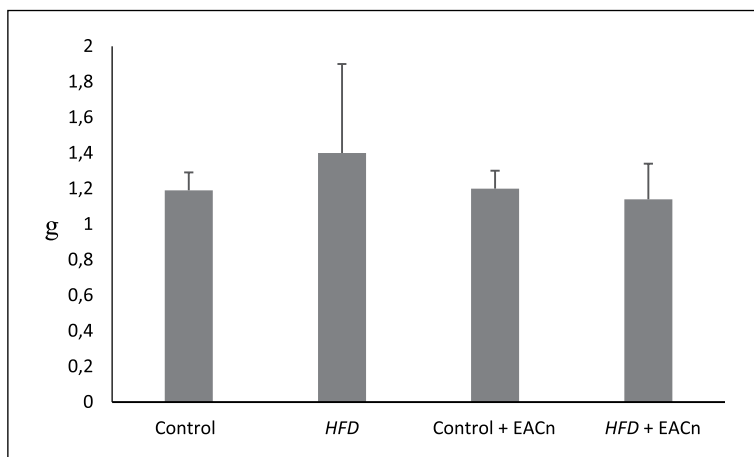


Figura 4. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre el peso del hígado de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

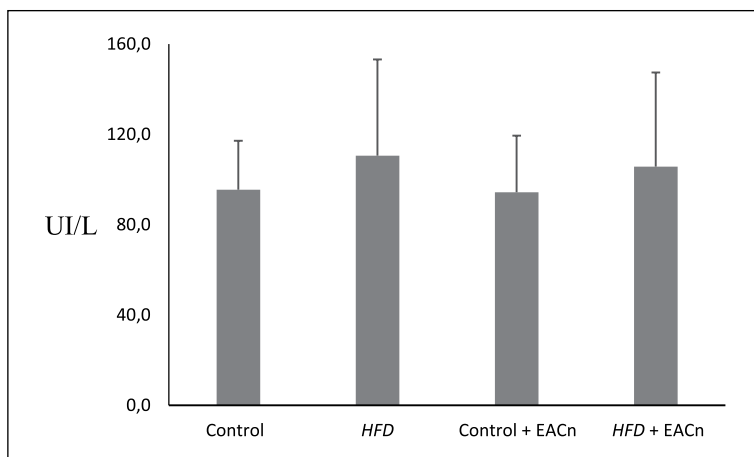


Figura 5. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre la actividad de alanina aminotransferasa sérica de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

Triglicéridos hepáticos

Los resultados mostraron una disminución de los triglicéridos intrahepáticos en el grupo *HFD* intervenido con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*), aunque esta diferencia no fue significativa (valor p : 0,39) (Figura 3).

Peso hígado

El peso hepático en el grupo *HFD* intervenido con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) es menor al grupo no intervenido. Sin embargo, la diferencia entre estos valores no fue significativa (valor p : 0,15) (Figura 4).

Alanina aminotransferasa (ALT) sérica

Los valores de ALT en el grupo *HFD* intervenido con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) son menores al grupo *HFD* que no lo recibió. Pero esta diferencia no fue significativa (valor p : 0,81) (Figura 5).

Histología hepática

En el grupo *HFD* intervenido con EACn del fruto del maqui (*Aristotelia chilensis*) se observó que sólo 1 ratón desarrolló esteatosis hepática, mientras que los otros 7 ratones desarrollaron micro-esteatosis. Por el contrario, en el grupo *HFD* no intervenido con EACn del fruto del maqui *Aristotelia chilensis* 3 ratones desarrollaron esteatosis hepática y 7 ratones micro-esteatosis. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 6).

Discusión

No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y *HFD* tratados con EACn respecto de la glicemia, los niveles séricos de ALT, los triglicéridos intrahepáticos, el peso del hígado o la histología del hígado, a pesar de que se encontró una tendencia a la reducción en estos parámetros (excepto por la glicemia) y una diferencia significativa en el peso, siendo menor en el *HFD*. Se logra cumplir el objetivo general y específico de la investigación, ya que se logró esclarecer cuáles son los efectos de un EACn en un modelo de HGNA en inflamación y esteatosis hepática, mediante la medición de ALT, triglicéridos intrahepáticos e histología, sin embargo, es necesario recalcar que no se realizó el estudio durante un tiempo suficiente para producir fibrosis hepática y que debido a la metodología del estudio es posible que los ratones hayan consumido cantidades variables de EACn. La dieta *HFD* causa HGNA de magnitud leve/moderada

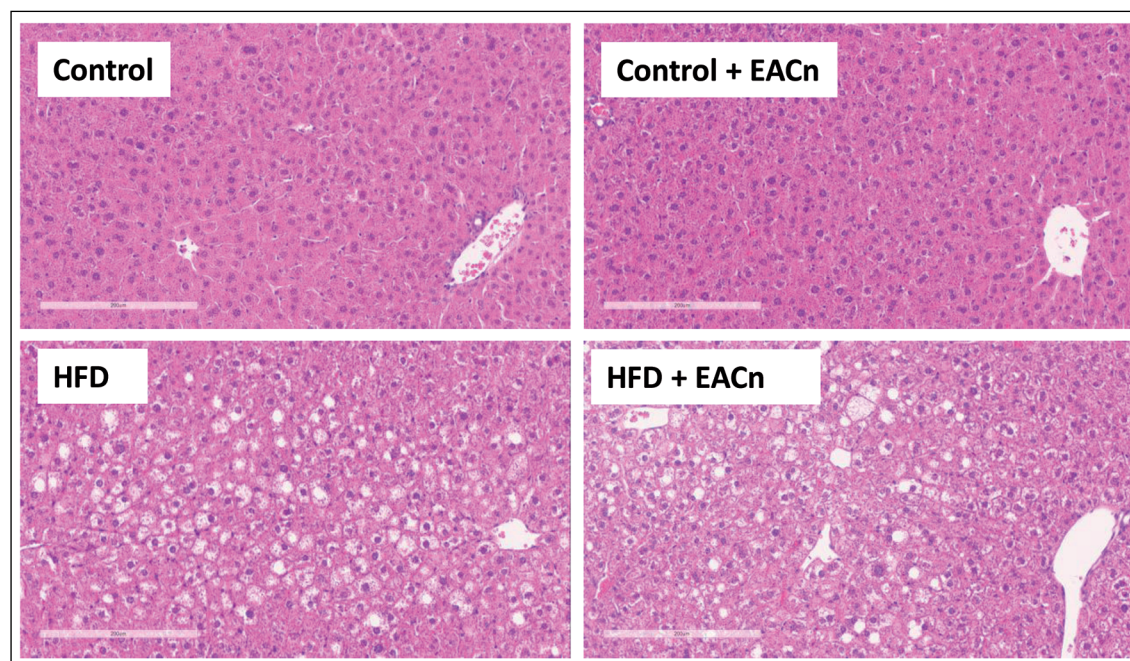


Figura 6. Efecto de un extracto rico en antocianinas (EACn) sobre la histología hepática de los ratones, controles y alimentados con dieta alta en grasa (HFD).

e imita solo ciertos aspectos del espectro de la enfermedad y que ellos difieren en relación al uso de otro modelo^{19,20}.

Se puede concluir que las ACn presentes en el fruto maqui no son capaces de prevenir el HGNA, pero que

sí tienen efectos positivos en elementos que participan en la fisiopatología del HGNA como el fenotipo metabólico asociado a la resistencia a la insulina, como se observa en el peso de los ratones, tal como se había detectado en estudios anteriores.

Referencias

- 1.- Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Ya-maki K, Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 68-75.
- 2.- Marchand LL. Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 296-301.
- 3.- Ribeiro D, Freitas M. Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. *Med Res Rev* 2015; 35: 877-936.
- 4.- Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Gómez M, Robert P. Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation in Central Chile. *Chilean J Agric Res* 2012; 72: 582-9.
- 5.- Mosele J, Maciá A, Motilva M. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: a review. *Molecules* 2015; 20: 17429-68.
- 6.- Araya H, Clavijo C, Herrera C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivadas en Chile. *ALAN* 2006; 56: 361-5.
- 7.- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2: 270-8.
- 8.- Grace MH, Ribnick DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, et al. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* 2009; 16: 406-15.
- 9.- Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutiérrez C, Sineiro J, et al. Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz): sources of antioxidant compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase inhibitors. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 1630-7.
- 10.- Rojo LE, Ribnick L, Poulev A, Rojas-Silva P, Kuhn P, Dorn R, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem* 2012; 131: 387-96.
- 11.- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25: 4-7.
- 12.- Miranda-Rottmann S, Aspillaga A, Pérez DD, Vásquez L, Martínez AL, Leighton F. Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation *in vitro* and protect human endothelial cells against oxidative

Artículo Original

- stress. J Agric Food Chem 2002; 50: 7542-7.
- 13.- Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villañoa D, Speisky H, García-Viguera C, Moreno D. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. J Funct Foods 2014; 7: 599-608.
 - 14.- Schreckinger M, Wang J, Yousef G, Lila M, González de Mejía E. Antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. J Agric Food Chem 2010; 58: 8966-76.
 - 15.- Hidalgo J, Flores C, Hidalgo MA, Pérez M, Yáñez A, Quiñones L, et al. Delphinol® standardized maqui berry extract reduces postprandial blood glucose increase in individuals with impaired glucose regulation by novel mechanism of sodium glucose cotransporter inhibition. Panminerva Med 2014; 56: 1-7.
 - 16.- Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, de Mejía EG. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. J Med Food 2010; 13: 233-46.
 - 17.- Leng L, Jiang Z.Q, Ji GY. Effects of soybean isoflavone on liver lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver rats. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 2011; 45: 335-9.
 - 18.- Uysal S, Armutcu F, Aydogan T, Akin K, Ikizek M, Yigitoglu MR. Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. Clin Biochem 2011; 44: 1375-9.
 - 19.- VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. Am J Pathol 2009; 175: 355-64.
 - 20.- Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. Int J Mol Sci. 2013; 14: 21240-57.
 - 21.- Aldini R, Micucci M, Cevenini M, Fato R, Bergamini C, Nanni C, et al. Antiinflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: prevention, induction, remission study. PLoS One 2014; 9:e108112.