



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Evaluación de la suplementación de un
microencapsulado del jugo de los arilos de granada
roja (*Punica granatum* L) en pacientes con síndrome
metabólico”**

Tesis que para obtener el grado de:
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA
SALUD**

Presenta:

JOSÉ MORÁN LEÓN

Director de tesis

Gabriel Betanzos Cabrera

Codirector de tesis

Dra. Guadalupe López Rodríguez

San Agustín Tlaxiaca, Hgo. Julio de 2017





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias de la Salud
 School of Health Sciences
 Área Académica de Medicina
 Department of Medicine
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

19/JUNIO/2017
 AAMMCBS/083/2017

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

José Moran León
 Alumno de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación de la suplementación de un microencapsulado del jugo de los arilos de granada roja (*Punica granatum L.*) en pacientes con síndrome metabólico" con el cual obtendrá el Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DRA. GLORIA SOLANO SOLANO
- PRIMER VOCAL DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
- SECRETARIO DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
- SUPLENTE DR. MARCOS MARCELO GALVÁN GARCÍA
- SUPLENTE DR. ALFONSO ATILAN GIL

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

UAEH
BIBLIOTECA



Instituto de Ciencias de la Salud
 Ex Hacienda la Concepción s/n Camino a Tlaxiaco
 San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 mtra_bco_sal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

El presente trabajo se realizó se realizó en la Escuela secundaria Técnicas Numero 38 y en la Universidad Privada del Centro en Pachuca, Hidalgo, el procesamiento y análisis de las muestras biológicas se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrigenómica del Área Académica de Nutrición del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Apoyo financiero fue obtenido por el CONACYT (PDC Problemas Nacionales PDCPN2013-01).

DEDICATORIA

Deseo dedicar este trabajo al ser supremo que ha dado la oportunidad de llegar hasta este punto, mostrándome su infinita bondad al brindarme los medios necesarios para seguir andando.

A mi Madre Angélica León Galicia por siempre estar ahí alentando este camino y siempre tener la fuerza para impulsarme para ir por más; Te amo.

Karina, Jhoanna y Emilio que, aunque a la distancia, siempre estamos cuando así lo necesitamos, esto también fue pensado en ustedes, mi familia chiquititita.

A mis abuelos, mis tíos y primos que siempre estuvieron al tanto de este proyecto y que, con sus palabras de ánimo, ayudaron a alcanzar este objetivo.

A mis amigos y la banda que estuvo presente siempre en los ambientes que se generaron alrededor de este proyecto.

*A mi gran amigo, en donde quiera que estés, aunque en este logro no pudimos estar juntos, estoy seguro que allá lo estas disfrutando tanto como yo, esto también lleva tu nombre
Erick Arturo Beltrán León.*

Con todo el cariño que puedo, les dedico esta parte de mi vida.

José Morán León.

AGRADECIMIENTOS

A ti Gabriel Betanzos Cabrera (las palabras no me van a alcanzar), muchas gracias por la confianza, tolerancia, paciencia, enseñanzas y ese apoyo que nunca deje de sentir, sin ti yo no podría ser nada de lo que académicamente soy, sin tu atinada dirección esto no pudo haber sido, en verdad muchas gracias.

A cada uno de los miembros del laboratorio de Nutrigenómica que me acompañó por mi estancia en él, su apoyo, sonrisas y gestos tan nobles a mi persona los valoro. Antonio Guerrero Solano gracias mi hermano, sin tu ímpetu y paciencia para soportar estos miedos no hubiera sido lo mismo, Belinda Patricia Velázquez Morales por tu compromiso con este proyecto, así como tu amistad entrañable, Pedro Álvarez Cervantes muchas gracias porque con tu peculiar forma de ser siempre estuviste dispuesto a apoyar, así como a Isabel Sánchez Crisóstomo, Oyuki Manterola Quezada, Fernanda Osorno Reséndiz, Rodrigo Ronces Arrieta y Deviani García Pérez por ser parte de este gran equipo.

Gracias a cada uno de los miembros de mi comité tutorial, Dra. Guadalupe López Rodríguez, Dra. Gloria Solano Solano, Dr. Alfonso Atilán Gil, Dr. Marcos Marcelo Galván García y a mi director Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por brindar su tiempo, conocimientos y disposición para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Escuela Secundaria Técnica número 31 y Universidad Privada del Centro, así como a sus autoridades por haber brindado las facilidades para realizar este proyecto en sus instalaciones.

A mi alma máter, la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, fiel testigo de mi crecimiento personal y profesional, porque aquí he aprendido que, como principio el amor, como medio el orden y como fin el progreso, a todo esto, gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar las becas de a los posgrados de calidad (PNPC), una herramienta necesaria y vital para el progreso de nuestro México.

¡Gracias!

RESUMEN

El síndrome metabólico es definido como un conjunto de alteraciones metabólicas, que incluyen: obesidad central, disminución de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), aumento en la concentración de triglicéridos, aumento de la presión arterial e hiperglucemia; todos ellos ha sido relacionado en el riesgo de desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares, las cuales son importantes causas de mortalidad alrededor del mundo, incluyendo México. Por su parte, la granada (*Punica granatum L.*) es un fruto, donde investigaciones científicas sugieren que el fruto tienen diversas propiedades funcionales, las cuales son atribuibles al considerable número y tipo de antioxidantes que este fruto tiene. Desafortunadamente, es un fruto que no se consume habitualmente, debido en parte a que es un fruto de temporada. Por tal razón, se elaboró un polvo, a base de jugo de los arilos de la granada roja; a través de un proceso conocido como microencapsulación por secado por aspersión, el cual es un método de conservación de alimentos y consiste en proteger los compuestos bioactivos de la oxidación por la luz y medio ambiente; de esta manera se obtuvo un producto estable y disponible todo el año. Por lo que, en el presente trabajo, se evaluó el efecto de la suplementación diaria durante 12 semanas de 4 gramos del microencapsulado (~0.73 mg equivalentes de ácido gálico) en 109 pacientes divididos en 4 grupos experimentales bajo los criterios de diagnóstico de síndrome metabólico según el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII). Se midieron indicadores bioquímicos; (glucosa, triglicéridos y colesterol total (c-HDL y c-LDL) presión arterial y mediciones antropométricas al tiempo basal, y cada 30 días. Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías y las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas con una $P < 0.05$; Con el consumo del microencapsulado se encontró una disminución de presión arterial diastólica y c-HDL, así como la reducción en el índice aterogénico. Aunque los mecanismos están por dilucidar, la cantidad de polifenoles presentes en el microencapsulado de jugo de granada parecen jugar un papel importante. Los resultados sugieren que el microencapsulado, podría emplearse como coadyuvante en el tratamiento eficaz del síndrome metabólico y sus consecuencias.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is defined as a set of metabolic alterations, including: central obesity, low levels of high-density lipoproteins (c-HDL), high levels of triacylglycerols, hypertension and hyperglycemia; all of them have been related as risk factor in the developing of diabetes and cardiovascular diseases, which are to known to cause mortality throughout the world including Mexico. On the other hand, pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit, where several scientific investigations suggest that the fruit has diverse functional properties, which are mainly attributable to the considerable number and type of antioxidants present in the fruit. Unfortunately, it is a fruit poorly consumed, probably because it is a seasonal fruit. Thus, a powder was prepared from red pomegranate arils juice by a process known as spray drying giving a microencapsulation as final product, which is a food conservation method and basically protects to the bioactive compounds from the oxidation caused by light and air; thus, a stable product and available at any time of the year was obtained. Therefore, the present work evaluated the effect of daily supplementation for 12 weeks of 4g of microencapsulated (~0.73 mg Gallic Acid Equivalents) in 109 subjects divided in 4 groups under the criteria of diagnosing of metabolic syndrome in accordance with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII). Biochemical indicators (glucose, triacylglycerols, total cholesterol, c-HDL and c-LDL) blood pressure and anthropometric measurements were measured at basal time and every 30 days. The results were analyzed by a two-way ANOVA, differences were considered significant at $p < 0.05$. We found a decreasing in diastolic blood pressure, c-HDL and atherogenic index. Although, the mechanisms of action are to be elucidated, the amount of polyphenols present in the red pomegranate microencapsulated seems to play an important role. Overall, the results suggest that the microencapsulated might be used as adjuvant in the treatment of metabolic syndrome and its consequences.

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INDICE.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	3
I ANTECEDENTES.....	4
1.1 Síndrome Metabólico.....	4
1.1.1 Definición.....	4
1.1.2 Prevalencia del Síndrome metabólico.....	6
1.1.3 Fisiopatología del SM.....	7
1.1.3 Obesidad.....	9
1.1.4 Dislipidemia.....	11
1.1.5 Presión Arterial.....	12
1.1.6 Hiperglicemia.....	13
1.1.7 Estrés Oxidativo.....	14
1.2 Ingesta de antioxidantes como auxiliar al tratamiento de enfermedades crónico no transmisibles.....	15
1.3 Granada (Punica granatum L).....	15
1.3.1 Efectos benéficos del consumo de granada.....	19
1.4 Microencapsulación de compuestos.....	19
II JUSTIFICACIÓN.....	21
III HIPÓTESIS.....	22
IV OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo General.....	23
4.2 Objetivos Específicos.....	23
V MATERIALES Y MÉTODO.....	24
5.1 Diseño de estudio.....	25
5.2 Factibilidad y aspectos éticos.....	25
5.3 Ubicación espacio-temporal.....	25
5.4 Determinación de tamaño de muestra.....	25
5.5 Recursos humanos y financieros.....	26
5.6 Criterios de selección.....	26
5.6.1 Criterios de inclusión.....	26

5.6.2	<i>Criterios de exclusión</i>	26
5.6.3	<i>Criterios de eliminación</i>	27
5.7	Descripción general del estudio.....	27
5.7.1	<i>Obtención de la materia prima para el MEJGR</i>	27
5.7.2	<i>Cuantificación de polifenoles totales</i>	27
5.7.4	<i>Estudio subcrónico de toxicidad</i>	28
5.7.3	<i>Suplementación de los sujetos con MEJGR</i>	28
5.7.4	<i>Medición de indicadores de diagnóstico de SM</i>	28
5.8	Análisis estadístico.....	29
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1	Conteo de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante.....	30
6.2	Estudio Subcrónico de toxicidad.....	31
6.3	Descripción de la muestra estudiada.....	32
6.4	Circunferencia abdominal.....	33
6.5	Presión Arterial Sistólica.....	35
6.6	Presión Arterial Diastólica.....	36
6.7	Glucosa.....	38
6.8	Triglicéridos.....	40
6.9	c-HDL.....	42
6.10	Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico.....	44
6.11	Índice Aterogénico.....	47
VII	CONCLUSIONES.....	49
VIII	BIBLIOGRAFÍA.....	50
IX	ANEXOS.....	56
9.1	Certificado de calidad del microencapsulado de granada roja.....	56
9.2	Solicitud al comité institucional de ética para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.....	57
9.3	Documentos de gestión de población.....	63
9.4	Respuesta del Comité de investigación del ICSa de la UAEH.....	64
9.5	Carta de consentimiento informado.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la fisiopatología del SM	7
Figura 2. Componentes de la granada	16
Figura 3. Estructura química de los principales compuestos antioxidantes de la granada, a) Pinicalagina, b) Acido gálico y c) Acido elágico	18
Figura 4. Diagrama de Secado por Aspersión. Donde el flujo del líquido es atomizado y éste es secado por aire caliente.	20
Figura 5. Diagrama metodológico	24
Figura 6. Mediciones de prueba DL ₅₀ , realizada cada 2 días. a) Medición de consumo de alimento, b) Medición de peso	31
Figura 7. Medición mensual de circunferencia de cintura, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	34
Figura 8. Medición mensual de presión arterial sistólica, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	36
Figura 9. Medición mensual de presión arterial diastólica, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	38
Figura 10. Medición mensual de glucosa, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	40
Figura 11. Medición mensual de triglicéridos, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	42
Figura 12. Medición mensual de c-HDL, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	44
Figura 13. Seguimiento de los indicadores de diagnóstico de SM, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.....	46
Figura 14. Seguimiento del índice aterogénico, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses.	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de distintos organismos para el diagnóstico de síndrome metabólico.....	5
Tabla 2. Clasificación de la obesidad por IMC	9
Tabla 3. Principales comorbilidad y complicaciones de la obesidad	10
Tabla 4. Valores optimas, deseables y de riesgo de las fracciones lipídicas	11
Tabla 5. Clasificación de la diabetes mellitus según la Asociación americana de la diabetes	14
Tabla 6. Seguimiento de producción de granada (2011-2015)de Estados y municipios de Hidalgo	17
Tabla 7. Contenido polifenolico y capacidad antioxidante del microencapsulado de jugo de arilos de granada roja.....	30
Tabla 8. Descripción de la muestra estudiada en tiempo basal	32
Tabla 9. Descripción de la muestra estudiada en tiempo final.	33

I ANTECEDENTES

1.1 Síndrome Metabólico.

1.1.1 Definición

En la actualidad, una de las principales problemáticas de salud pública son las enfermedades crónico no transmisibles (ECN) ya que son las principales causas de mortalidad y que trae una repercusión económica y social a los países en vías de desarrollo, al generar altos costo *per capita*, dentro de estas enfermedades las más comunes son la obesidad, la hipertensión (HTA), la diabetes tipo 2 (DM2) entre otras; dichas patologías, se generan a consecuencia de deficiencias metabólicas, como lo es el síndrome metabólico (SM) (1).

Actualmente una de las definiciones del síndrome metabólico, es la asociación de factores de riesgo cardiovascular, a consecuencia factores clínicos asociados incluyendo insulinoresistencia, dislipidemia, obesidad central, HTA, DM2 y recientemente se han incluidos biomarcadores de inflamación, estrés oxidativo y enfermedad aterosclerótica, por ello es que una de las problemáticas de este síndrome es la unificación de criterios para su diagnóstico y tratamiento (2-4).

El concepto de síndrome metabólico es reconocido en la literatura médica por lo menos desde hace 80 años y ha recibido diversas denominaciones a través del tiempo. En 1923, el médico sueco Kylin fue el primero en observar en un mismo cuadro clínico, asociación frecuente entre: niveles de glucosa en sangre elevados (hiperglucemia), presión arterial elevada (hipertensión), niveles de ácido úrico en sangre elevados (hiperuricemia) y presencia de gota; por lo que sugirió la existencia de un mecanismo causal común, dando origen a lo que hoy en día se conoce como síndrome metabólico (5, 6).

Kylin sugería que el desarrollo de los trastornos metabólicos tenían un origen en común, bases con las cuales Marañón denomina la prediabetes, coincidiendo en que las consecuencias del SM tenían su génesis en la obesidad y el sobrepeso (6). Ya en la década de los 80's se propuso a la resistencia a la insulina como el factor principal de desarrollo de DM2, HTA y enfermedad coronaria, aunque existen actualmente diferentes formas de

describir al síndrome metabólico como: síndrome de insulino-resistencia, síndrome de Reaven, síndrome cardiometabólico, síndrome “X” entre otros (7).

Al inicio, la Organización mundial de la salud (OMS) propuso generar un conjunto de criterios, incluyendo en ellos la resistencia a la insulina, sin embargo; el tercer panel de tratamiento para el adulto del programa nacional de educación sobre el colesterol (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*), identificado por sus siglas en inglés NCEP ATP-III, genera su propio concepto que le ha permitido ser citado en diversidad de estudios en lo que respecta a el diagnóstico del SM ya que pudo adecuar a regiones e incluso poblaciones con características genéticas considerables ya que en 2004 consideró reducir el criterio de glucosa de 110 mg/dl a 100 mg/dl adecuándolo a población latina y dándolo como un valor de normalidad, pero sus criterios particulares se enlistan en el Tabla 1 (1, 7).

Tabla 1. Criterios de distintos organismos para el diagnóstico de síndrome metabólico.

Criterios / Organismo	WHO	EGIR	NCEP ATP-III	IDF	AHA
Obesidad	IMC ≥ 30 kg/m ²	IMC ≥ 30 kg/m ²			
Abdominal	Índice Cintura/Cadera	Cintura	Cintura	Cintura	Cintura
	Mas. > 0.9	♂ ≥ 102 cm	♂ ≥ 102 cm	♂ ≥ 94 cm	♂ ≥ 102 cm
	Fem. > 0.85	♀ ≥ 88 cm	♀ ≥ 88 cm	♀ ≥ 80 cm	♀ ≥ 88 cm
Glucosa (mg/dL)		≥ 110	≥ 110	≥ 100	≥ 100
HDL-c (mg/dL)	Mas. ≥ 35	< 40	♂ ≥ 40	♂ ≥ 40	♂ ≥ 40
	Fem. ≥ 39		♀ ≥ 50	♀ ≥ 50	♀ ≥ 50
Triglicéridos (mg/dL)	≥ 150	≥ 180	≥ 150	≥ 150	≥ 150
Presión Arterial (mmHg)	$\geq 140/90$	$\geq 140/90$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$

WHO: World Health Organization, EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance, NCEP ATP-III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, IDF: International Diabetes Federation, AHA: American Heart Association

Fuente: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (7).

El NCEP ATP-III propone que al presentarse 3 de los 5 criterios propuestos se podrá dar un diagnóstico claro de SM, permitiendo que la obesidad abdominal sea el principal factor de diagnóstico y con esto deja de lado la resistencia a la insulina y algunos otros indicadores bioquímicos como el ácido úrico (3).

El síndrome metabólico en la actualidad es un tema controversial en la comunidad médica pues es relacionado íntimamente con las ECN causa de mortalidad en el mundo sin olvidar que su incidencia acompañada de sus consecuencias aumentan día a día (8).

1.1.2 Prevalencia del Síndrome metabólico

No es fácil de estimar la prevalencia del SM pues al existir diversos puntos de corte, es complicado precisar la cantidad de pacientes que en la actualidad tienen el SM, por ello la NCEP ATP-III intenta que los criterios a diagnosticar sean fáciles de evaluar en la práctica clínica y con estos optimizar el diagnóstico y el tratamiento (9-11).

En un estudio realizado en 2008 por la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) con una muestra de 3601 pacientes, la prevalencia según la definición del NCEP ATP III fue de 34% entre todos los participantes, 33.7% entre los hombres y 35.4% entre las mujeres, con base a los criterios de la IDF, la prevalencia fue 39.0% entre todos los participantes, el 39.9% entre los hombres y 38% entre las mujeres. La definición de la IDF condujo a estimaciones más altas de prevalencia en todos los grupos demográficos, especialmente entre los hombres estadounidenses de origen mexicano. Las dos definiciones clasificadas de manera similar ~93% de los participantes como tener o no tener el síndrome metabólico (10).

Jaramillo y colaboradores en 2013, hacen un recuento de la prevalencia en Latinoamérica y reportan resultados variados por la naturaleza del instrumento de medición, en lo que coincide con los demás autores es que la presencia del SM se ve agravada con la edad, siendo los adultos mayores los que son afectados por esta constelación de síntomas (12). Lo que se convierte en una realidad es que el SM en países en vía de desarrollo como México, que tiene

una prevalencia importante, motivo por el cual los sistemas de salud adquieren una doble responsabilidad, puesto que continúan con problemáticas como infecciones y desnutrición, además de incluir problemas de mal nutrición que son los principales promotores de los criterios de diagnóstico de este síndrome (10, 11).

Se ha establecido que la alta prevalencia de SM podría ser debido a la combinación de factores genéticos, ambientales y dietéticos, por ello en pueblos con mayor predisposición genética como la etnia asiática, en el caso de México y países latinoamericanos se predispone al alto consumo de carbohidratos y lípidos que sumado a la genética detonan la prevalencia de obesidad y SM (4, 11).

1.1.3 Fisiopatología del SM

La fisiopatología del SM es compleja al ser un trastorno endocrinológico complejo ya que existe predisposición genética o diversos factores exógenos, como se muestra en la figura número 1 (13).

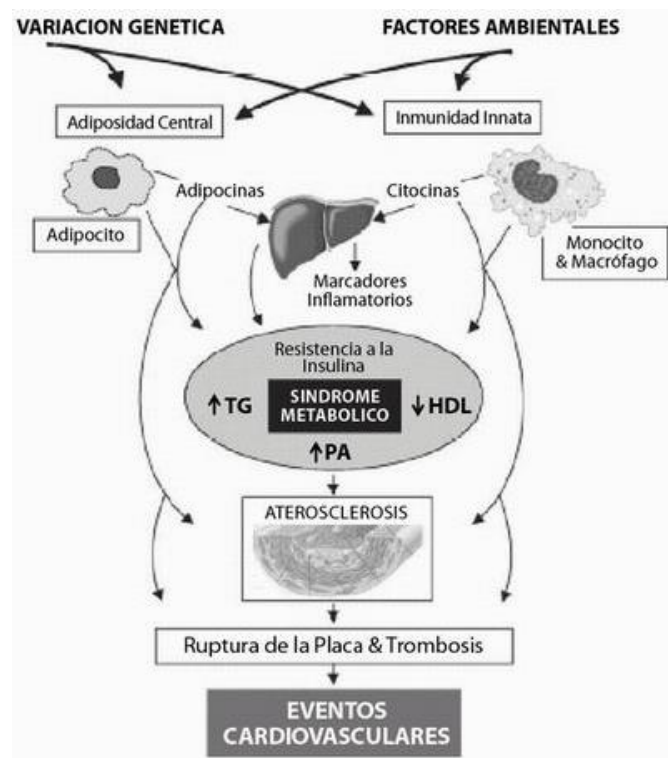


Figura 1 Esquema de la fisiopatología del SM (13).

Esquematación de los factores genéticos y ambientales causantes del SM, así como la fisiopatología que causa ejemplificando las consecuencias y procesos que activa.

La resistencia a la insulina se convierte en una parte importante en la fisiopatología del SM debido a que la función de esta hormona provoca una desregulación de los niveles de glucosa en sangre (4, 13, 14) y con ello contribuir a los principales desordenes metabólicos y sus consecuencias (4).

La glucosa siendo la fuente primordial de energía celular es absorbida y asimilada gracias a la acción de la insulina, hormona secretada por la células β del páncreas, al no poder obtener energía gracias a este carbohidrato la célula esta continúan la secreción generando un círculo vicioso (12). Al existir esta resistencia los niveles en sangre se ven alterados, así como las funciones celulares dependientes de glucosa se ven disminuidas, por lo cual se incrementa la señalización celular que provoca la liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo (15).

Por otra parte, la leptina aminora la sensación de apetito por lo cual aumenta la utilización de ácidos grasos como fuente emergente de energía, generando la consecuencia principal del almacenamiento intracelular de triglicéridos y con ello la disminución en la recepción de glucosa hepática y muscular, motivo por lo cual se logran niveles importantes de inflamación sistémica, estrés oxidativo y termogénesis (3).

Existen distintos factores de desarrollo del SM entre ellos la disminución de masa muscular que es acompañada de la reducción de la tasa metabólica, por ello el aumento de tejido adiposo determina la excreción de citocinas proinflamatorias y la reducción de adiponectina determinando con esto el estado inflamatorio, conduciendo a la disfunción del metabolismo lipoproteico generando con ello la aterogénesis y sus consecuencias (1, 16).

Otro factor importante en estos desequilibrios metabólicos es el estrés oxidativo, donde la gran producción de especies reactivas de oxígeno ocasionan daño mitocondrial, y se pierde la regulación de la muerte celular así como la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) que activa la cascada de señalizaciones para inducir a apoptosis (17). Con ello los macrófagos inician la formación de la placa aterogénica al intentar fagocitar el exceso de c-LDL, que debido a su alto contenido de ácidos grasos polinsaturados son susceptibles a reacciones químicas, generando con esto la células espumosas, que al agruparse dañan de

manera considerable al endotelio generando así más radicales libres que continúan generando estrés oxidativo (18).

1.1.3 Obesidad

La obesidad se define como el aumento en el porcentaje de grasa corporal total, la cual se caracteriza en el aumento de número y tamaño de los adipocitos y es producto de un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto de ellas (19).

Esta patología comprende una serie de factores biológicos, psicológicos y sociales motivos que la hacen un fenómeno complejo. Existen varios métodos indirectos para medir la obesidad los más utilizados son la circunferencia de cintura y el índice de masa corporal (IMC) que tiene correlación con la grasa corporal alta y se calcula de dividir el peso en kilogramos sobre la talla en metros cuadrados dando diferentes clasificaciones (Tabla 2) (19); También es importante mencionar que el aumento en la grasa corporal y visceral además de ser un factor para desarrollar diabetes, es conocido que el aumento se relaciona íntimamente con el desequilibrio con el metabolismo de lípidos lo que predispone en el desarrollo de enfermedad cardiovascular entre otras (cuadro 4) (20).

Tabla 2. Clasificación de la obesidad por IMC.

IMC (kg/m ²)	Clasificación
< 18.5	Bajo Peso
18.5 - 24.9	Normal
25.0 - 29.9	Sobre peso
30.0 - 34.5	Obesidad (Clase I)
35.0 - 39.9	Obesidad (Clase II)
>40.0	Obesidad (Clase III)

IMC: Índice de masa corporal, Fuente: Panorama de la obesidad en México (21).

Esta patología es denominada la epidemia del siglo XXI, al demostrarse que el exceso en el peso corporal es el sexto factor de riesgo de defunción en el mundo pues mueren cerca de 3.4 millones de personas adultas a consecuencia del sobrepeso y la obesidad, además de las cifras que desencadenan sus principales consecuencias, como la DM2 y las cardiopatías (21).

Solo en los Estados Unidos de Norteamérica el 30% de la población adulta padece problemas de sobrepeso u obesidad, pues es diez veces más alto que países desarrollados de oriente, en el caso específico de México para finales de la década actual se prevé que con el pasar de los años se ocupen los primeros lugares en la prevalencia de esta patología así mismo que esta se presente en edades más tempranas, estos datos son apoyados de la información de las principales encuestas de obesidad, salud y nutrición que reportan que de 1980 a la fecha se ha triplicado el número de personas con dicho padecimiento (22).

Tabla 3. Principales comorbilidad y complicaciones de la obesidad.

Cardiovascular	Metabólico
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad cardiovascular aterosclerótica 	<ul style="list-style-type: none"> • DM2
<ul style="list-style-type: none"> • Dislipidemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Intolerancia a la glucosa
<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión 	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperuricemia
<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia cardiaca congestiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la insulina
<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia venosa 	<ul style="list-style-type: none"> • SM
<ul style="list-style-type: none"> • Embolia pulmonar 	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencia de vitamina D
Neurológico	Musculo esquelético
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad vascular cerebral 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteoartritis
<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión intracraneal idiopática 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitación de la movilidad
<ul style="list-style-type: none"> • Demencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Lumbalgia
Psicológico	Cáncer
<ul style="list-style-type: none"> • Depresión 	<ul style="list-style-type: none"> • Mama
<ul style="list-style-type: none"> • Bajo autoestima 	<ul style="list-style-type: none"> • Colon
<ul style="list-style-type: none"> • Inadecuada calidad de vida 	<ul style="list-style-type: none"> • Próstata
<ul style="list-style-type: none"> • Trastornos de la alimentación 	<ul style="list-style-type: none"> • Uterino

Fuente: Catennasi 2009 (23).

1.1.4 Dislipidemia

Las dislipidemias asociadas al síndrome metabólico son altamente aterogénicas y se caracterizan por, hipertrigliceridemias, altos niveles séricos de colesterol total, disminución en los niveles de c-HDL y aumento en los niveles de c-LDL (Tabla 4), siendo las 2 primeras alteraciones las que se evalúan de rutina en la práctica clínica. Respecto a los niveles séricos de triglicéridos los valores de referencia deben ser de 150 mg/dL, puesto que niveles arriba de estas cifras pueden provocar consecuencias como aterosclerosis y problemas cardiovasculares potenciado por problemas genéticos y hábitos alimentarios poco saludables, en el caso del aumento de colesterol total, al igual que los triglicéridos no es una patología sino un descontrol metabólico que puede desencadenar enfermedades y la concentración debe estar por abajo de 200 mg/ dL de sangre y en el caso de las c-HDL deben de estar presentes en un 20 o 25 % del colesterol total, así mismo la combinación de niveles altos de triglicéridos y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad, dan lugar a la creación de placas aterogénicas que son factor de riesgo para la presencia de enfermedad cardiovascular (24).

Tabla 4. Valores óptimas, deseables y de riesgo de las fracciones lipídicas.

Fracción Lipídica	Valores (mg/dL)		
	Óptimo	Deseable	Riesgo
c-LDL	> 70	< 100	≥ 130
c-HDL	♂	≥ 60	> 40
	♀	≥ 70	> 50
Triglicéridos	≤ 100	< 150	≥ 150
Colesterol total	< 170	< 200	≥ 200

Fuente: De Santiago, 2004 (25).

1.1.4.1 Hipertrigliceridemia

Este indicador consiste es un aumento de los niveles séricos de los triglicéridos, un tipo de grasa que su estructura está conformada por glicerol y ácidos grasos, cuya función principal es la de proveer de energía (26).

El especial interés en este indicador es su asociación en el origen de patologías como la obesidad, la DM2, eventos cardiovasculares entre otras, que suelen acompañarse en la mayoría de las ocasiones con obesidad abdominal (26, 27).

Normalmente se localizan en las lipoproteínas plasmáticas, su producción hepática es influenciada por el ayuno y el consumo elevado de carbohidratos (28), teniendo un pico máximo de las 3 a las 6 horas de haber ingerido alimentos, y disminuyendo este pico de las 8 a las 10 horas, por lo que su medición es importante y vital para el diagnóstico de distintas patologías siendo el valor de referencia en ayuno valores menores a <150 mg/dL (7, 27, 28).

1.1.4.2 Hipercolesterolemia

El colesterol es uno de los componentes primordiales de las células de todo mamífero, ya que cuenta con diversas funciones de vital importancia, su fuente puede ser exógena al ingerir algunos productos de origen animal, a su vez también se produce de manera endógena, al ser sintetizado en el hígado y algunos órganos como el intestino. Cuando existen valores anormales, ya sea por su alto consumo o algún problema en su metabolismo, se almacena como éster de colesterol (25).

Los valores normales en la concentración plasmática son de >200 mg/dL, valores por arriba se definen como hipercolesterolemia que está asociado a niveles elevados de c-LDL y niveles reducidos de c-HDL (19, 25).

1.1.5 Presión Arterial

También conocida como tensión arterial, es el resultado de la presión que ejerce la sangre en las paredes de los vasos sanguíneos, actualmente existe una amplia evidencia de la relación directa entre al aumento de presión arterial con el riesgo cardiovascular, se ha relacionado a la resistencia a la insulina con la alta en presión arterial, por ello en el año 2003 el Séptimo Comité Nacional Conjunto de Hipertensión arterial determinó que las cifras para diagnosticar

pre-hipertensión arterial eran de 120/80 mm/Hg, y para hacer el diagnóstico inminente de hipertensión propuso valores $\geq 130/85$ mm/Hg (29).

1.1.6 Hiperglicemia

El principal objetivo de los sistemas de salud es retazar o mejorar la morbilidad y mortalidad de la diabetes, la cual está relacionada directamente con el alto nivel de glucosa en sangre a consecuencia de la ingesta de carbohidratos en la dieta y/o la deficiencia en cantidad y calidad de insulina, razón por la cual el riesgo de la enfermedad cardiovascular es elevado. En el año 2003 la IDF fijó como valor normal la cifra de 100 mg/dL de glucosa en sangre y como valor predictivos que oscilan entre 110 y 126 mg/dL, sin embargo al evaluar la glicemia se convierte en un ejercicio complicado pues es poco sensible pero muy específico y parece ser más útil la medición tras una carga de 75 g de glucosa (30).

Las consecuencias de la diabetes están íntimamente relacionadas con su clasificación (Tabla 5), la diabetes tipo 1, se caracteriza por la nula secreción de insulina a consecuencia de la incapacidad de las células β del páncreas para secretar insulina; la DM2 consecuencia del déficit progresivo en la falta de secreción o acción de la insulina sobre la base de una insulino-resistencia; diabetes gestacional diagnosticada específicamente en el embarazo por la deficiencia en la secreción de insulina (31).

Tabla 5. Clasificación de la diabetes mellitus según la Asociación americana de la diabetes (32).

Diabetes mellitus Tipo 1	<ul style="list-style-type: none"> a. Autoinmune b. Idiopática
Diabetes mellitus Tipo 2	<ul style="list-style-type: none"> a. Predomina la resistencia a la insulina b. Predominan los defectos en la secreción de insulina a. Defectos genéticos en la función de las células β b. Defectos genéticos en la acción de la insulina c. Enfermedades del páncreas exocrino d. Endocrinopatías
Otros tipos específicos de diabetes mellitus	<ul style="list-style-type: none"> e. Inducidas por fármacos o sustancias químicas f. Infecciones g. Formas infrecuentes de diabetes autoinmunes h. Otros síndromes en ocasiones asociadas a la diabetes
Diabetes mellitus gestacional	

Fuente: Conget, 2002 (32).

1.1.7 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre los radicales libres y la capacidad antioxidante del organismo por neutralizarlos (18, 33, 34). Con el tiempo, este desequilibrio puede dañar los tejidos y por consiguiente el funcionamiento a los órganos. El estrés oxidativo y la inflamación crónica se ha reportado que está asociada con el incremento de la obesidad y el síndrome metabólico ya que éstos contribuyen en gran medida a trastornos metabólicos, se han reportado una conexión entre los componentes del síndrome metabólico y su diagnóstico pues en estudios se ha observado una correlación entre el estrés oxidativo y la acumulación de grasa, además el estrés oxidativo se ha observado en todos los

componentes individuales del síndrome metabólico así como en la enfermedad cardiovascular (34).

1.2 Ingesta de antioxidantes como auxiliar al tratamiento de enfermedades crónico no transmisibles

Una gran parte de las patologías que presenta el humano en la actualidad tienen como génesis la inadecuada alimentación y por ende una mal nutrición, siendo estas las principales causas de mortalidad en niveles locales y globales, asimismo las patologías cardiovasculares y diversos tipos de cáncer como las dos primeras causas de muerte, donde las especies reactivas de oxígeno han sido asociadas con su desarrollo (35, 36), por lo cual, la deficiencia significativa de la ingesta de antioxidantes en la alimentación del ser humano representa uno de los factores íntimamente relacionados con el incremento de la actividad degenerativa que tienen las especies reactivas de oxígeno en las diferentes células y tejidos (36, 37).

De la misma manera se ha relacionado una menor incidencia de enfermedades crónico no transmisibles en aquellas personas que han iniciado un incremento en el consumo de frutas y vegetales con alto contenido de varios antioxidantes; los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñando una función fundamental en la prevención en el desarrollo de éstas enfermedades, logrando un efecto protector a la salud (38, 39). A su vez, el consumo en exceso de antioxidantes podría ser contraproducente e interferir e invertir las funciones protectoras de la apoptosis y aumentar el crecimiento tumoral (36).

1.3 Granada (Punica granatum L)

El fruto de granada pertenece a la familia Punicaceae y su significado etimológico proviene de 2 vocablos, *punica*: manzana y *grainy*: granoso, lo que literalmente se denominaría una manzana granosa, este fruto proviene de un árbol pequeño llamado granado con 3 a 6 metros de altura, este puede llegar a vivir hasta 200 años y se conforma por ramas espinudas, hojas lanceoladas, y flor en forma tubular acampanada (40, 41).

El fruto es de forma globosa de color característico según las variedades, coronado por un cáliz, en el interior se encuentra dividido en pequeñas cámaras divididas por una tela fina llamada pericarpio, donde se encuentra un cúmulo de granos o arilos con jugo de sabor ácido agrio y un color rojo intenso, que varía depende la variedad del fruto y el cual contiene en su interior la semilla del fruto (Figura 2).

Es originario del sur de Asia y cultivado en la región del mediterráneo en Europa, en América su cultivo significativo se da en Estados Unidos específicamente en los estados de California y Arizona (42).

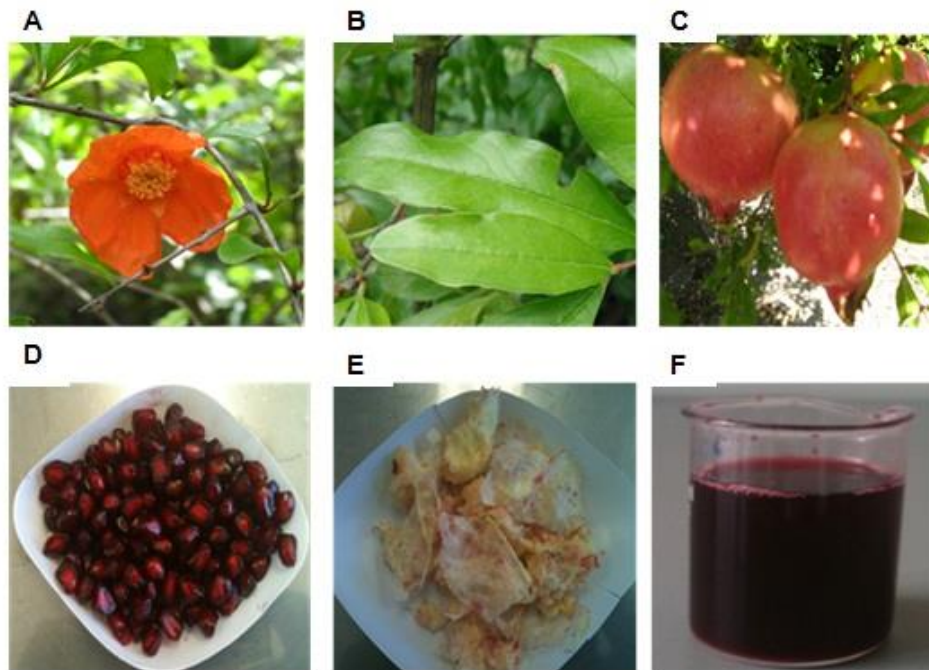


Figura 2. Componentes de la granada.

a. Flor, b. Hoja, c. Fruto, d. Arilos, e. Pericarpio, f. Jugo (43).

En México su cultivo no es abundante a pesar de que el árbol es de amplia adaptabilidad, productibilidad y gran calidad de las variaciones del mismo, esto a consecuencia de que su consumo es poco habitual pues es de temporada, su consumo se limita a ser guarnición de platillos típicos o ensaladas o bien como golosina. Se cultiva en 14 de los 32 Estados de la República, y en el año 2015 se reportó una producción cercana a las 4774 toneladas siendo

los estados de Oaxaca, Guanajuato e Hidalgo los que reportan mayor producción, con un 70% de la producción nacional (44). En específico, el estado de Hidalgo reportó una productividad de 888 toneladas de este fruto y el municipio de Tasquillo fue el que tuvo la producción más alta (Tabla 6) (45).

En los últimos años existe un aumento importante en la producción de granada mundial y es de gran importancia que divulguen las propiedades nutraceuticas de este fruto para así lograr que la demanda aumente y con ello la creación de nuevos productos a base de granada (42).

Tabla 6. Seguimiento de producción de granada (2011-2015) de Estados y municipios de Hidalgo (45).

Estados	Producción 2011	Producción 2012	Producción 2013	Producción 2014	Producción 2015
Oaxaca	1,362.88	1,224.04	1,471.57	1,393.76	1439.49
Guanajuato	524.00	1,076.50	933.00	902.25	942.60
Hidalgo	<u>983.00</u>	<u>911.80</u>	<u>963.10</u>	<u>936.70</u>	<u>888.24</u>
Morelos	S/D	90.00	254.50	196.00	318.00
Jalisco	57.84	55.50	58.00	171.02	213.16
Municipios					
Tasquillo	<u>546.00</u>	<u>529.20</u>	<u>504.00</u>	<u>552.00</u>	<u>470.40</u>
Chilcuahutla	240.00	200.0	260.00	180.00	242.00
Meztitlan	75.00	60.00	61.50	63.00	60.00
Tecozautla	32.00	36.00	54.00	53.70	53.74
San Agustín Mezquititlan	66.00	66.60	60.40	60.00	32.10

Fuente: SAGARPA, 2016 (46).

Diversos reportes en la última década se han reportado diferentes propiedades del fruto y sus constituyentes incluyendo: anti-oxidante, anti-hipertensivo, anti-cancerígenas y anti-inflamatorias, antimicrobianas, entre otras (40, 47-51).

El fruto en su mayoría está constituido por agua, y es particularmente rico en compuestos polifenólicos, azúcares y en menor proporción grasas y proteínas, también contiene una pequeña porción de fibra, además contiene minerales como el potasio, calcio, fósforo e hierro, incluyendo vitaminas liposolubles como las del complejo B y la vitamina C, El sistema mexicano de alimentos equivalentes reporta para una pieza de granada un aporte nutrimental de 44 kcal, 0.9 g de proteína, 0.3 g de lípidos, 15.5 g de carbohidratos y 2.4 g de fibra (52).

La cantidad de compuestos polifenólicos encontrados y su capacidad antioxidante son más altos en comparación con el vino tinto y el té verde, e incluso por arriba del arándano. Recientemente, se ha sugerido que el fruto tiene efecto anti-aterogénico motivo por lo cual existen diversos estudios enfocados para la prevención y tratamientos de enfermedades inflamatorias, coronarias y crónicas no transmisibles (47, 51, 53, 54).

El análisis químico de los componentes del jugo muestra un alto contenido de elagitaninos, específicamente pulicalaginos (51), también los compuestos fenólicos se han observado en este fruto, los principales son los ácidos gálico y elágico (figura 3) que son de gran importancia para las propiedades benéficas a la salud además de otros flavonoides (49).

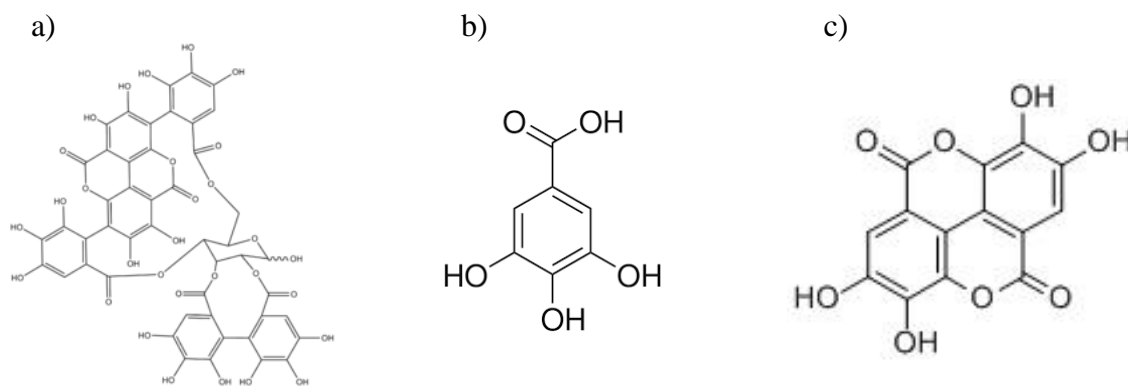


Figura 3. Estructura química de los principales compuestos antioxidantes de la granada, a) Pinicalagina, b) Acido gálico y c) Acido elágico.

El jugo de granada ha sido estudiado *in vitro* en su gran mayoría sobre enfermedades crónicas no transmisibles, pero no es hasta a principios de la década de los noventa que se realizan los primeros estudios clínicos, dando un gran interés en el estudio de cada una de sus funcionalidades ya sea del jugo de granada o de cada uno de los componentes del fruto (42, 55, 56), esto apoya en parte, el hecho de que este fruto se ha empleado con fines medicinales sin hasta ahora fundamentando así su seguridad alimentaria puesto que se han consumido durante siglos sin presentar hasta el momento mostrar algún efecto adverso. Los estudios de componentes de granada en animales a concentraciones y niveles de uso común en la medicina tradicional dan como resultado la ausencia de efectos tóxicos, motivo por el cual

existe una explosión de interés en las numerosas propiedades terapéuticas de la granada en la última década (57-59).

1.3.1 Efectos benéficos del consumo de granada

El alto contenido en agua y potasio así como la baja concentración de sodio, le proporcionan propiedades diuréticas y depurativas, y en conjunto con la concentración de ácido cítrico promueve la eliminación de ácido úrico y sus sales a través de la orina, por ello el consumo de tal fruto contribuye al tratamiento de artritis gotosa, litiasis renal por sales de ácido úrico, obesidad o hipertensión (60).

La propiedad anti-inflamatoria del fruto probablemente se debe a la presencia de taninos, las cualidades antisépticas y antiinflamatorias se deben a la presencia de ácido cítrico y málico (61). También la granada tiene actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos como por ejemplo: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces. cerevisiae* (62). Los compuestos polifenólicos le otorgan elevada capacidad antioxidante, estudios recientes sugieren que dichos compuestos pueden disminuir el proceso de envejecimiento y el desarrollo de enfermedades crónico no transmisibles como las cerebrovasculares, cardiovasculares, cáncer y patologías asociadas (39, 61). También se ha descrito el efecto antiateroesclerótico del jugo, en humanos y ratones (53, 60, 62).

1.4 Microencapsulación de compuestos

Los alimentos pueden ser afectados por la luz, la humedad, el calor, etc., o por condiciones propias de su composición química (63). La microencapsulación, es uno de los métodos más utilizados para la conservación de las propiedades químicas y biológicas de compuestos bioactivos (64).

Este es un método de conservación de alimentos en la cual se encapsulan en pequeñas partículas sólidas con variedad de formas a través de una membrana o matriz que por lo regular son polímeros tales como: goma arábiga, dextrina, almidón entre otras a través de diversas técnicas entre las cuales están: el secado por aspersión (Figura 4), extracción y recubrimiento por aspersión, coacervación, polimerización interfacial e incluso molecular, siendo el secado por aspersión la técnica más común en la microencapsulación de jugo de frutas por razones de costos y viabilidad, este es un proceso físico en el cual se convierte un fluido en material sólido haciéndolo pasar por una cámara de secado caliente (63).

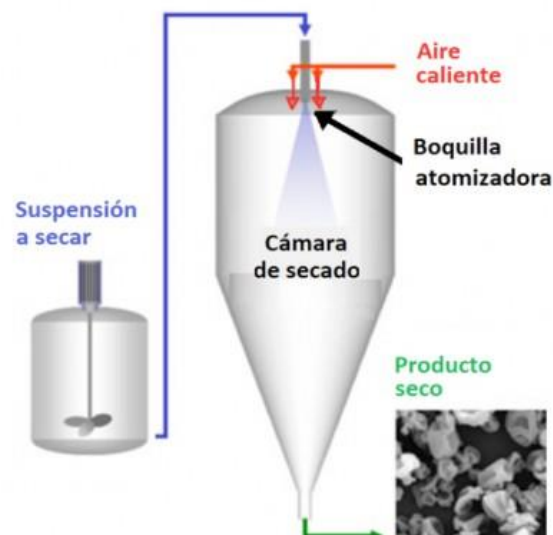


Figura 4. Diagrama de Secado por Aspersión. Donde el flujo del líquido es atomizado y éste es secado por aire caliente.

Con ello se intenta que alimentos o fármacos no pierdan fácilmente su actividad biológica, en algunos casos la actividad biológica de algunos compuestos como los fenoles es de muy corto plazo por las condiciones ambientales o la degradación durante el procesamiento de los alimentos, ocasionando la pérdida parcial o total de esta actividad (65). La ventaja de este proceso es que los componentes se liberan gradualmente de la matriz o pared que los contiene para así obtener mejores productos con mayores características sensoriales y nutricionales (66).

II JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento en la morbilidad y prevalencia mundial de enfermedades crónicas no transmisibles y derivadas de la mala nutrición relacionada con el síndrome metabólico, en edades más tempranas, es necesario buscar alternativas en el su tratamiento o manejo de la enfermedad. La granada es un fruto con alta cantidad y diversidad de compuestos polifenólicos, los cuales se han estudiado y sugieren tener propiedades funcionales ya mencionadas. Aunque México, no es uno de los principales productores ni consumidores del fruto a nivel mundial, el estado de Hidalgo es uno de los principales productores a nivel nacional, pese a ello su consumo es bajo dentro del mismo estado, pues se limita a platillos típicos o como golosina, y esto probablemente debido a que es un fruto de temporada. Es por ello, que en este proyecto se evaluó *in vivo* un microencapsulado único a base de jugo de granada (MEJGR) en humanos con síndrome metabólico, a fin de determinar si dicho microencapsulado conserva sus propiedades funcionales después del proceso biotecnológico de elaboración, tal y como se ha demostrado en el jugo fresco. De tener resultados favorables puede ser una alternativa viable en el tratamiento del síndrome metabólico, porque no solo es un polvo estable, sino tiene una vida de anaquel mayor que un fruto fresco teniendo así, el producto estaría disponible en cualquier época del año.

III HIPÓTESIS

La suplementación diaria de 4 g diarios de microencapsulado de jugo de granada roja (MEJGR) durante 3 meses, en pacientes con SM disminuye significativamente los valores en los criterios de su diagnóstico, aminorando los efectos del síndrome.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la suplementación diaria, durante 3 meses de 4 g de MEJGR sobre los indicadores de diagnóstico de SM según la ATP III.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la cantidad de polifenoles totales y capacidad antioxidante en el MEJGR por medio del método de Folin-Ciocalteu y ABTS^{•+} DPPH.
2. Determinar la dosis letal media (DL₅₀) de MEJGR en rata Wistar.
3. Evaluar el efecto de la suplementación de un MEJGR sobre la disminución de circunferencia abdominal en humanos con SM por medio de los indicadores de circunferencia abdominal e índice de masa corporal.
4. Determinar el efecto de la suplementación de un MEJGR en humanos con SM sobre la disminución en los indicadores bioquímicos de SM (Glucosa, Triglicéridos, Colesterol Total, c-HDL y c-LDL) por medio de kits enzimáticos.
5. Determinar el efecto de la suplementación de un MEJGR sobre la disminución en los niveles de tensión arterial en humanos con SM.
6. Identificar el efecto de la suplementación de un MEJGR en el índice aterogénico de Pacientes con SM.

V MATERIALES Y MÉTODO

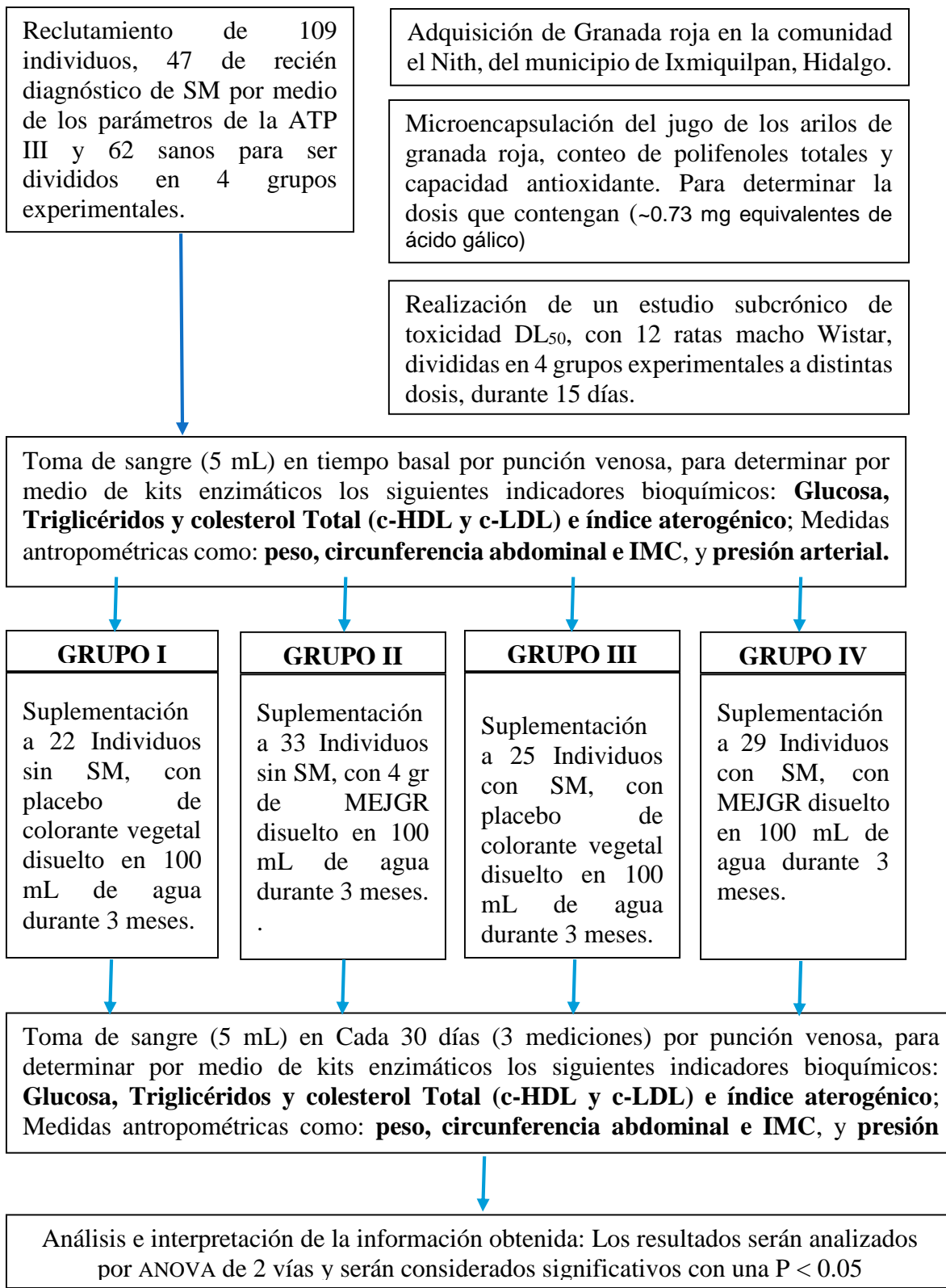


Figura 5. Diagrama metodológico

5.1 *Diseño de estudio*

El presente estudio es un ensayo clínico prospectivo longitudinal.

5.2 *Factibilidad y aspectos éticos*

El presente proyecto se sometió antes de su ejecución, al Comité de Ética de Investigación del ICSa, UAEH de acuerdo a los artículos 13-27 del título segundo capítulo I (de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos), también de los artículos 34-39 del título segundo capítulo III (de la investigación en menores de edad o incapaces) y de los artículos 65-71 título tercero capítulo II (de la investigación farmacológica) de la ley general de salud en materia de investigación para la salud y según lo establece la Declaración de Helsinki: "El protocolo de investigación debe presentarse a un comité de ética en la investigación para que dicho comité lo considere, comente, asesore y apruebe antes de que comience el estudio" (67) y a los lineamientos de la Conferencia Internacional de Armonización (del inglés *International Conference of armonization*) para las Buenas Prácticas Clínicas (CH-E6-R1) (68).

5.3 *Ubicación espacio-temporal*

La toma de medidas antropométricas y de sangre se llevó acabo en la escuela secundaria Técnicas Numero 38 y en la Universidad Privada del Centro en Pachuca, Hidalgo, el procesamiento y análisis de las muestras biológicas en el Laboratorio de Nutrigenómica del Área Académica de Nutrición del instituto de ciencias de la salud de la Universidad Autónoma del Astado de Hidalgo.

5.4 *Determinación de tamaño de muestra*

El muestreo de este proyecto fue a conveniencia, ya que no existen estudios precisos que determinen una prevalencia de síndrome metabólico en México, además de no ser un estudio epidemiológico sino, un ensayo clínico, aleatorizado, controlado, doble ciego empleando un desarrollo tecnológico único la muestra a considerar fue de 109 sujetos.

5.5 *Recursos humanos y financieros*

El presente estudio fue realizado por el estudiante de maestría José Morán León, bajo la dirección de Gabriel Betanzos Cabrera y como colaboradores la Dra. Guadalupe López Rodríguez, M en NH Amanda Peña Irecta (q.e.p.d.), el estudiante de maestría LN. José Antonio Guerrero Solano y la Pasante de la Licenciatura en Nutrición Belinda Patricia Velázquez Morales. Dicho proyecto fue financiado por el CONACYT (PDC Problemas Nacionales PDCPN2013-01).

5.6 *Criterios de selección*

Los sujetos de estudio fueron Seleccionados a través de una carta de consentimiento informado (Ver anexo 9.5) y en el caso de ser menores fue a través de la autorización de sus padres o tutores (firma de la carta de consentimiento informado). Los sujetos fueron seleccionados bajo los siguientes criterios:

5.6.1 *Criterios de inclusión*

1. Hombres y mujeres que tengan de 13 a 59 años de edad.
2. Sujetos que estudien o trabajen en las escuelas, secundaria técnica Núm. 38 y la Universidad privada del centro.
3. Personas que sean diagnosticadas con SM al presentar al menos 3 criterios según el ATP III.

5.6.2 *Criterios de exclusión*

1. Personas que al inicio y/o durante el estudio tomen medicamentos que modifiquen modificar los indicadores de diagnóstico de SM.
2. Personas a las cuales no se les pueda tomar las muestras sanguíneas y/o antropométricas de seguimiento.
3. Individuos los cuales no pueda dar continuidad a la suplementación del MEJGR.

5.6.3 Criterios de eliminación

- Personas que por alguna razón dejen de tomar el suplemento no sigan la suplementación del microencapsulado de jugo de granada.
- Personas que no asistan la toma de la muestra sanguínea de seguimiento.
- Personas que por alguna razón abandonen el estudio.
- Sujetos que reporten algún efecto adverso.

5.7 Descripción general del estudio

5.7.1 Obtención de la materia prima para el MEJGR

Se obtuvieron 480 kg de granada de la comunidad “El Nith” del municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo. Se lavó el fruto, posteriormente se peló y desgranó fruto, obteniéndose 98 kg de arilos, posteriormente se transportó a la empresa Granding Internacional S: A de C: V. Ubicada en Exuberancia Núm. 10, Col. Esmeralda, Jiutepec, Morelos, México. C.P: 62555; para la elaboración del microencapsulado, el cual se hizo en condiciones asépticas bajo normas microbiológicas haciéndolo apto para consumo humano.

5.7.2 Cuantificación de polifenoles totales

La determinación del contenido de compuestos polifenólicos totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (69). El fundamento se basa, en una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se medirá a 765 nm con la ayuda de un espectrofotómetro e indica la cantidad total de polifenoles expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) o equivalentes de catequina (66, 70). Y con ello se determinó la dosis que contenía (~0.73 mg equivalentes de ácido gálico) y esta fue equivalente a 4 g.

5.7.4 Estudio subcrónico de toxicidad

Se realizó un estudio subcrónico de toxicidad que previamente fue puesto a consideración por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CIECUAL) (Anexo 3). Donde se administró durante 15 días MEJGR a 12 ratas Wistar de 280g \pm 30g divididas en 4 grupos experimentales dicha administración se realizó de la siguiente manera: Grupo 1(control) 2.5 ml de agua, grupo 2(dosis baja) 448 mg de MECJGR (dosis correspondiente a 1600mg/kg de peso) , grupo 3(dosis media) 812 mg de MECJGR (dosis correspondiente a 2900mg/kg de peso) , grupo 4(dosis alta) 1400 mg de MECJGR (dosis correspondiente a 5000mg/kg de peso) todas aforadas a 2.5 ml.

5.7.3 Suplementación de los sujetos con MEJGR

Por otra parte, se reclutaron 109 personas, 55 sujetos sin SM y 54 pacientes con SM recién diagnosticados bajo los criterios de la NCEP-ATP III (definición modificada para la edad en el caso de adolescentes), que por voluntad propia y totalmente informados del proceder de este experimento aceptaron participar, constatándolo por medio de una carta de consentimiento informado (anexo 5) y la autorización de los padres o tutores. Se suplemento con la dosis equivalente a ~0.73 mg (4 g) equivalentes de ácido gálico de MEJGR disuelto en 100 ml de agua vía oral diariamente durante 90 días.

5.7.4 Medición de indicadores de diagnóstico de SM

Se tomaron indicadores antropométricos y bioquímicos, al estado basal (tiempo basal) y cada 30 días (4 mediciones) que son talla, peso, circunferencia de cintura y determinación de masa grasa para lo cual existió una previa estandarización a cargo de la M en NH Amanda Peña Irecta, empleando una báscula (Mca. Omrom, mod. BC-545), estadímetro de pared (Mca. Seca, mod. 206), cinta antropométrica (Mca. Seca, mod. 201); Para el indicador de presión arterial se utilizó un baumanómetro digital de pulsera (Mca. Omrom, Bannokburn, USA). En el caso de las mediciones de indicadores bioquímicos (Glucosa, triglicéridos, colesterol total y c-HDL) se extrajeron 5 mL de sangre periférica por medio de punción venosa y se determinaron sus parámetros por medio de kits enzimáticos (Mca. Wiener lab., Alemania) y

un lector de micro placa (Mca. Bio-Tec, junior microplaca reader, USA) (71), en el caso de c-LDL se calculó por medio de la ecuación de Friedewald que es utilizada a partir de conocer los datos de colesterol total, c-HDL y triglicéridos ($c\text{-LDL} = \text{Colesterol total} - (c\text{-HDL} + \text{Triglicéridos}/5)$) (72) y en el caso del índice aterogénico se calculó por medio de ($\text{índice aterogénico} = \text{Colesterol total} / c\text{-HDL}$) (73).

5.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos empleado en la presente investigación son los siguientes: pruebas de t de *Student* para la comparación de medias y pruebas de ANOVA, mediante el *software GraphPad Prism*, versión 4.0. Los resultados son expresados como la desviación estándar de la distribución de la muestra media. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Conteo de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante

Se realizó el conteo de polifenoles por medio de la técnica Folin-Ciocalteu y la evaluación de su capacidad antioxidante por medio de ABTS⁺ DPPH^{*}, el MEJGR fue sometiendo diálisis parcial *in vitro* mostrando los siguientes datos.

Tabla 7. Contenido polifenolico y capacidad antioxidante del microencapsulado de jugo de arilos de granada roja.

Muestra	Fenoles mg eag/L	DPPH μmol et/L	ABTS mg aa/L
Jugo granada	1872.81	11310.83	540.9
Microencapsulado con extracción	213.01	1885.48	47.37
Microencapsulado dializado	24.52	2751.37	167.37

eag: Equivalentes de ácido gálico, et: Extracción total, aa: Ácido ascórbico, Fuente: Elaboración propia.

El conteo de polifenoles del MEJGR da como resultado una reducción considerable en comparación con el jugo fresco, ya que dicho jugo reporta una cantidad de 1872.81 mg eag/L y el microencapsulado 213.01 mg eag/L cantidad que resulta ser el 11.4 % del total mostrado por el jugo. En el caso de la evaluación de la capacidad antioxidante se reporta 18885.48 μmol et/L en la MEJGR con extracción y 2751.37 μmol et/L en el MEJGR dializado, mostrando un aumento del 45%, hecho que presumiblemente le contribuyen una adecuada vida de anaquel y le proporcionan estabilidad al producto (63, 74).

También es atribuible a el adecuado micoencapsulamiento de los componentes fenolicos, por lo cual al ser dializado, este proceso destruye la matriz polimérica permitiendo que dichos compuestos logren su accionar antioxidante (74).

6.2 Estudio Subcrónico de toxicidad

Con la finalidad de demostrar la inocuidad del MEJGR, este estudio realizó una prueba de toxicidad, buscando una DL_{50} , los indicadores que se evaluaron fueron peso y consumo de alimento, la figuras 6 muestran el monitoreo de 8 mediciones cada 2 días (16 días) del consumo de alimento y peso de los 4 grupos experimentales, en el caso del alimento este se ve en ascenso debido a la demanda de los animales por su desarrollo siendo el grupo de dosis alta el que demandaba más alimento, 66 g, dato que apoya el monitoreo de peso ya que este aumenta en el mismo grupo arrojando un promedio de 327.7 ± 45 g.

La prueba pretendía reportar muertes en alguna dosis del estudio, pero esto no es posible, ya que ningún animal pereció, ya que ocupando una dosis de 5000 mg/kg de peso no se reporta toxicidad alguna, por lo cual el producto no es toxico a esta a esta dosis siendo la dosis más alta probada y se presume que puede ser suplementado a humanos sin consecuencias previamente comprobadas (75, 76).

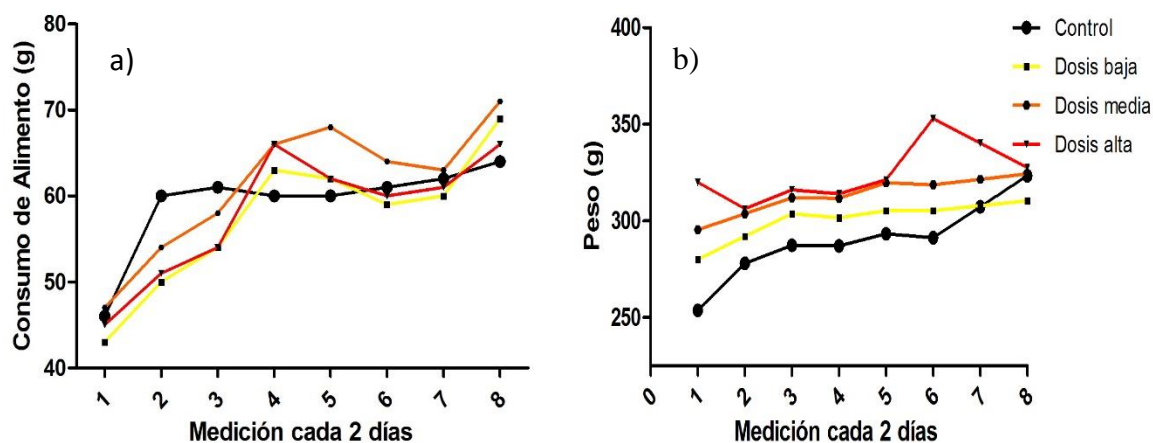


Figura 6. Mediciones de prueba DL_{50} , realizada cada 2 días. a) Medición de consumo de alimento, b) Medición de peso

6.3 Descripción de la muestra estudiada

La muestra estudiada en el este estudio, presento las siguientes características cuantitativas, dichas mediciones (Tabla 8) fueron el instrumento para el análisis estadístico y la determinación de su significancia.

Tabla 8. Descripción de la muestra estudiada en tiempo basal.

		CTRL/PLACEBO	SM/PLACEBO	CTRL/MEJGR	SM/MEJGR
TOTAL		29	27	33	27
Sexo	♂	13	5	7	14
	♀	16	22	24	13
Edad (años)		26.6±13.7	34.2±16.9	25.3±11.8	30.6±13.7
Peso (kg)		67.76±16.72	83.87±15.29	65.65±18.10	88.26±13.76
Talla(m)		1.62±0.09	1.57±0.08	1.59±0.08	1.62±0.08
IMC		25.74±5.33	33.07±5.84	25.54±6.05	33.21±3.61
Grasa (%)		33.77±13.39	45.11±11.98	35.58±12.77	42.48±7.72
Circunferencia abdominal(cm)		84.66±12.35	102.00±13.75	86.27±15.80	103.55±10.03
Presión arterial (mm/hg)	sistólica	115.31±7.85	122.52±14.72	111.06±11.69	123.18±13.99
	diastólica	74.76±8.85	79.72±9.31	72.12±8.47	81.77±9.12
Glucosa(mg/dl)		73.35±13.13	102.61±43.14	83.81±43.01	99.25±48.61
Triglicéridos(mg/dl)		144.92±71.15	169.32±50.68	129.18±62.90	204.06±90.06
c-HDL(mg/dl)		53.54±13.59	42.07±9.42	57.26±9.97	35.77±9.71
c-LDL (mg/dl)		113.00±53.46	160.21±67.55	114.96±61.56	187.05±62.41
Colesterol total (mg/dl)		195.53±47.66	236.14±68.66	198.05±60.71	263.63±63.59
Índice aterogénico		4.14±2.15	6.05±2.75	3.71±1.85	8.03±3.33
Indicadores de SM		0.90±0.76	2.98±0.34	1.00±0.78	3.34±0.70

En dicha tabla se describen numéricamente todas las variables medidas en este experimento en tiempo basal, estos datos apoyan el diagnóstico de SM, con la medición de sus 5 parámetros, así como los parámetros que están íntimamente relacionados con este síndrome.

A su vez se muestra el cambio que se tuvo tras los 3 meses de suplementación (Tabla 9) donde solo se muestran las mediciones a las cuales se le dieron seguimiento según la metodología ya expuesta.

Tabla 9. Descripción de la muestra estudiada en tiempo final.

	CTRL/PLACEBO	SM/PLACEBO	CTRL/MEJGR	SM/MEJGR
TOTAL	29	27	33	27
Peso (kg)	68.43±16.46	83.93±15.22	65.71±17.65	88.04±14.03
IMC	26.02±5.27	33.09±5.79	25.57±5.81	33.09±3.34
Grasa (%)	33.56±13.17	45.07±14.57	36.59±13.50	42.23±8.48
Circunferencia abdominal(cm)	83.50±11.54	99.88±12.22	82.45±13.68	101.55±9.16
Presión arterial (mm/hg)	sistólica	112.97±9.97	121.40±13.91	110.27±8.25
	diastólica	73.00±6.85	75.64±7.94	71.21±7.26
Glucosa(mg/dl)	80.73±27.85	106.60±52.28	81.18±22.68	92.61±19.61
Triglicéridos(mg/dl)	142.88±75.27	164.60±74.11	128.61±81.11	200.02±95.26
c-HDL(mg/dl)	53.23±14.88	44.44±9.91	62.00±8.87	49.29±11.57
c-LDL (mg/dl)	121.63±63.27	149.28±79.06	84.99±56.94	108.97±50.42
Colesterol total (mg/dl)	203.44±61.94	226.64±79.91	172.72±57.29	198.26±50.92
Índice aterogénico	4.39±2.47	5.53±2.74	2.90±1.22	4.19±1.33
Indicadores de SM	0.84±0.85	2.44±0.99	0.64±0.71	2.00±1.18

En la tabla anterior se puede observar la disminución en indicadores como presión arterial sistólica y diastólica, así como el aumento en el c-HDL, indicadores que impactan en el diagnóstico del SM logrando que como consecuencia disminuya, hechos que a continuación se explican y discuten a detalle.

6.4 Circunferencia abdominal

Los resultados referentes a circunferencia abdominal no muestran diferencias significativas, en cada una de las comparaciones no se reportan datos conténtenles, la medias no reportan cambios que confieran propiedades reductoras de circunferencia abdominal al MEJGR ya que se muestra a los 2 grupos tratados con MEJGR sin modificaciones, al igual que los grupos tratados con placebo, hecho que permite visualizar la homogeneidad del comportamiento de este indicador.

Los resultado mostrados en este estudio son similares a los resultados que reporta Soca *et al* en 2012, en donde se realizó un suplemento de antioxidantes a base de jugo de aronia adicionado con glucomanano y suplementó durante 4 semanas en 150 pacientes con

características de SM sin obtener diferencias significativas y refiere diferencias en la disminución de obesidad central, pues se atribuye una modificación en el perfil lipídico y no en la pérdida de tejido adiposo abdominal (77), también señalan que la pérdida significativa de tejido adiposo a causa de las modificaciones en la dieta después de 6 meses, y Ross refiere 14 semanas con modificación en la dieta y actividad física para poder encontrar significancia en la pérdida de grasa abdominal (78).

Algunos estudios, sugieren la necesidad de realizar futuros estudios clínicos para poder relacionar el consumo del fruto en la reducción de obesidad central (49, 79, 80), en nuestro caso las disminuciones de la circunferencia abdominal encontradas, esta sin llegar a ser significativa, es un resultado importante que se pueda atribuir el efecto del MEJGR; sin embargo, no se puede atribuir únicamente a este producto y sus componentes; debido a que no existió cambio alguno en la dieta ni control en la actividad física realizada por los individuos, hechos que sin duda podrían intervenir en la pérdida de grasa abdominal (81, 82).

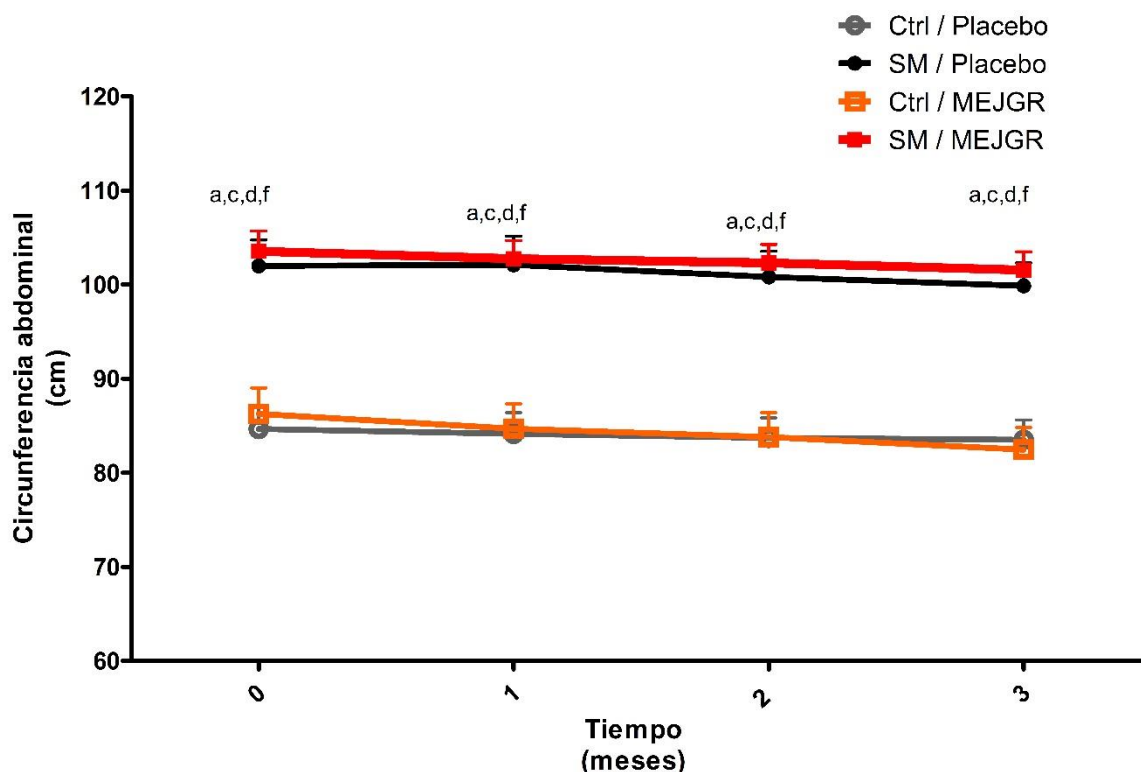


Figura 7. Medición mensual de circunferencia de cintura, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.5 Presión Arterial Sistólica

Con respecto a la presión sistólica se puede observar una tendencia constante a disminuir conforme al tiempo de tratamiento, esta disminución fue significativa al comparar los grupos SM / Placebo y Ctrl / MEJGR. Asimismo, los datos de los grupos controles no se modifican durante el experimento, es importante resaltar que el grupo SM/MEJGR es el que presenta la mayor disminución sin alcanzar una norma tensión (Figura 7).

Esta disminución es evidente desde el tiempo 2 y hasta el final del estudio, resaltando que hubo un aumento en esta presión en la segunda medición en el grupo Ctrl/Placebo para dar paso a una normalización en su medición en el tiempo 3 y final, todas las mediciones culminan el experimento con cierta igualdad al inicio de este, por lo cual no se muestran más cambios que reportar.

Estos datos coinciden con el estudio realizado con 13 hombres hipertensos que fueron suplementados con 10 ml de jugo de granada al día, dando como resultado una reducción en la presión arterial sistólica, de 125.38 ± 11.80 mmHg a 116.15 ± 7.94 mmHg, lo que refiere una disminución en este indicador de cerca de 7% (83, 84).

Stowe en 2010 señala que el efecto del consumo de granada sobre la presión arterial sistólica es a consecuencia de la inhibición de la enzima activadora de angiotensina II (85), por otra parte en 2001 Aviram et al. Llevó a cabo un ensayo con 10 personas (7 hombres y 3 mujeres) a los cuales se les proporcionó 50 ml de jugo fresco de granada con un valor equivalente a 1.5 mmol de polifenoles, durante 2 semanas., al final del experimento se encontró que los valores de presión arterial fueron de 147 ± 10 mmHg, comparados con los valores iniciales que fueron de 155 ± 7 mmHg, y que fueron estadísticamente significativos (55).

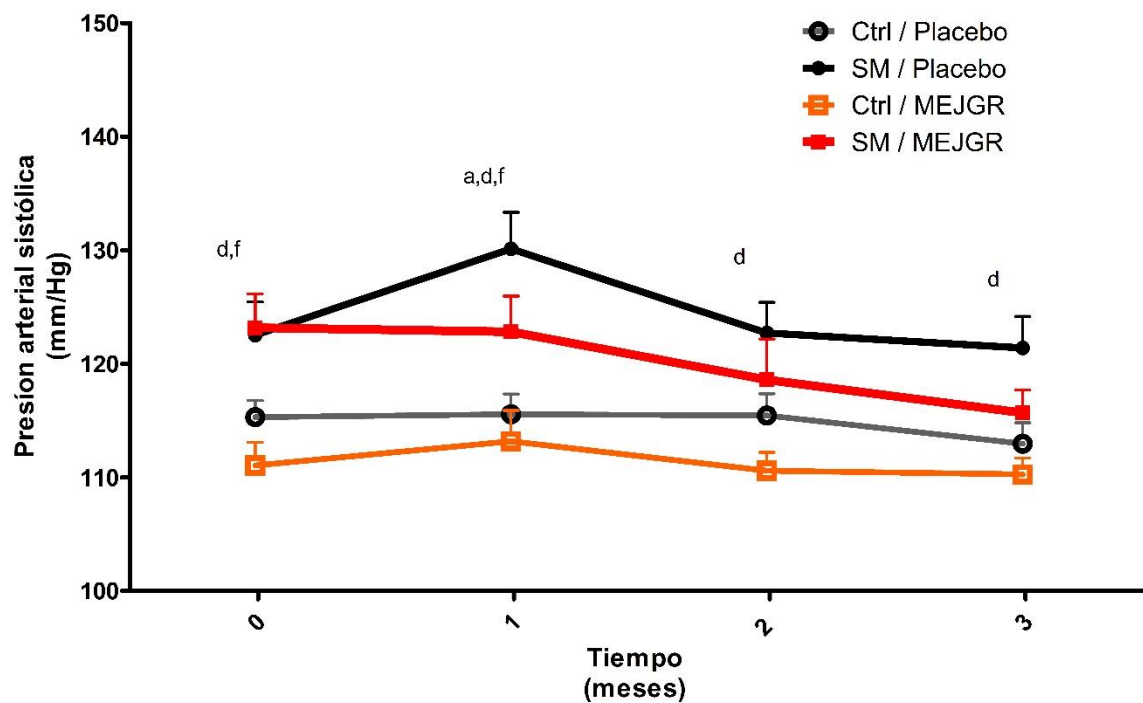


Figura 8. Medición mensual de presión arterial sistólica, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.6 Presión Arterial Diastólica

En lo que refiere a la presión arterial diastólica se encontraron diferencias significativas después de un mes al comparar los grupos CTRL/Placebo vs SM/Placebo con la peculiaridad de no volverse a evidenciar, en el caso de la medición en el segundo mes existen diferencias en la comparación de los siguientes grupo CTRL/ M.E.J.G.R y SM/M.E.J.G.R al ver reducida esta presión en el segundo grupo (Figura 9). En esta comparación se muestra un comportamiento similar debido a que existe una disminución en la presión arterial sistólica en aproximadamente 8.5% de 81.77 ± 9.12 mm/Hg a 74.86 ± 8.44 mm/Hg.

Estos datos son similares a los reportados en el estudio realizado por Sedigheh donde suplementaron a 21 individuos entre 30 y 67 años de edad con jugo de granada fresco duran 2 semanas y lograron observar una disminución en la presión diastólica en el grupo

experimental (11 Individuos), 80.00 ± 8.94 mm/Hg a 76.36 ± 6.74 mm/Hg. El autor sugieren que el efecto es debido al alto contenido de polifenoles en el fruto específicamente a las antocianinas y ácido elágico (83).

En 2014 Aviram et al realizó un ensayo clínico con 15 pacientes con enfermedad vascular donde suplementó con jugo de granada a diez pacientes durante 1 año y a los 5 restantes durante 3 años, y reporta cambios de este indicador sin llegar a ser estadísticamente significativo, ya que en los pacientes que fueron suplementados por un año tuvieron valores al inicio de 81 ± 3 mmHg en el tiempo basal y al final de 81 ± 2 mmHg y así para los pacientes de 3 años inician con 78 ± 4 mm/Hg y concluyen con 77 ± 3 mm/Hg (53, 55, 56).

Grupos de investigación que obtuvieron datos similares a los obtenidos por el presente trabajo, sugieren que los polifenoles logran la disminución de la presión arterial en general pues es un coadyuvante importante a la oxidación del c-LDL (55, 56, 83); Es importante resaltar que en el presente estudio se trabajó con 109 individuos sin encontrar diferencias significativas, en contraste con los estudios mencionados en donde incluso el tamaño de la población fue mucho menor, esto es posiblemente debido a que no es el mismo efecto de un jugo fresco que el microencapsulado proporcionado, y que la dosis de 4g diarios por 90 días no fue suficiente para tener valores significativos, sin embargo, los valores mostraron una tendencia a la baja, lo que sugiere que dosis mayores podrían arrojar valores.

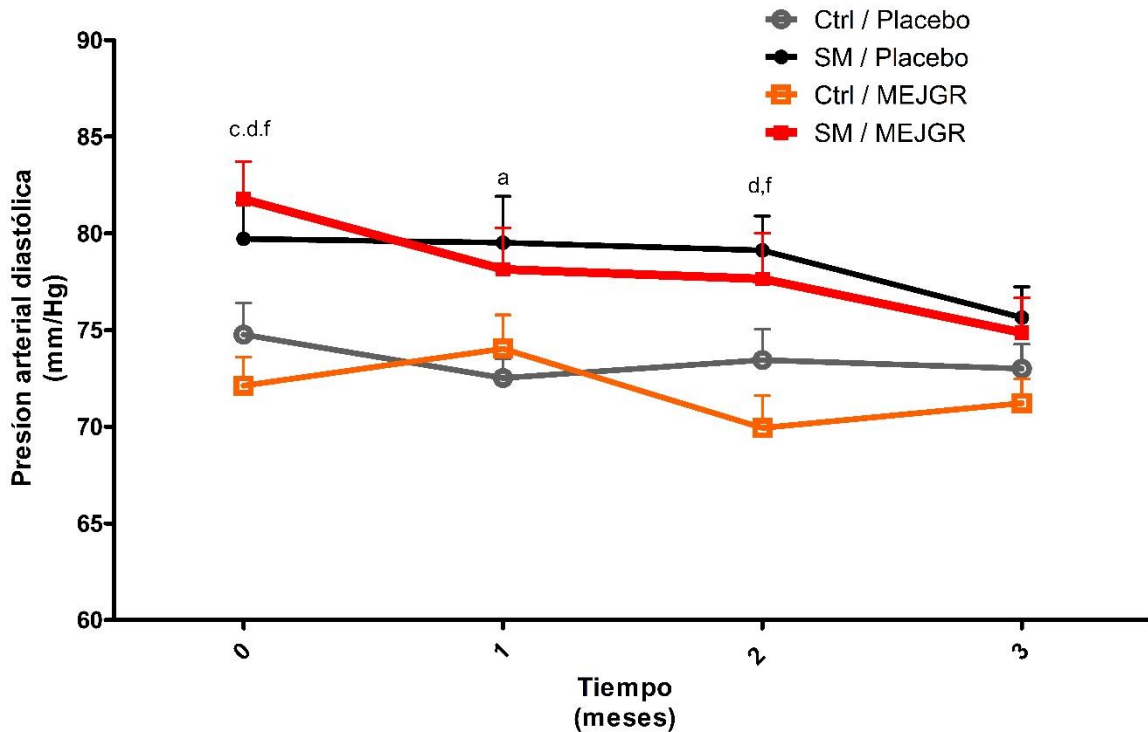


Figura 9. Medición mensual de presión arterial diastólica, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.7 Glucosa

Los valores de glucosa fueron variables a lo largo del ensayo, la razón de este comportamiento se pudo deber muy probablemente a que no hubo restricción en la dieta. No obstante, cabe destacar que el grupo SM/MEJGR mostró una disminución significativa en los niveles de glucosa. Caso contrario ocurrió en el grupo SM/Placebo donde hubo un aumento considerable en la última medición. Asimismo, el grupo Ctrl/MEJGR se mantuvo constante en los valores de glucosa. Estos datos sugieren que los componentes del microencapsulado son los responsables de esta disminución.

Al hacer un análisis de los resultados se encontró una disminución sin alcanzar a ser significativa, se observa una disminución en los valores, el cual fue menor al compararse con el grupo SM/Placebo.

En estudios al igual que en el presente trabajo, se han reportados diversos resultados con el indicador de glucosa.

En 2014 Banihani realizó un ensayo clínico donde se suplementó 1.5 mL por kg de peso corporal de jugo de granada durante 8 semanas fresco a 85 pacientes con DM2, el grupo suplementado redujo los niveles de glucosa, dicho efecto se atribuyó a el aumento en la función de las células β del páncreas y la disminución de la resistencia a la insulina, así como una modificación importante en las vías metabólicas oxidativas y respuesta de los lípidos (86).

Rosentbland *et al* en 2005 suplementó a 20 pacientes con DM2 50 mL de jugo de granada durante 3 meses, al final del estudio no se encontraron diferencias significativas (87, 88).

Distintos estudios realizados en modelos animales determinan un disminución no significativa de glucosa esto asociado a la reducción de insulina en suero, debido al contenido de 2 componentes importantes de este fruto el ácido gálico y el ácido elágico, datos importantes que contrastan a los resultados arrojados por este estudio, probablemente se deba a que el contenido de polifenoles se encontraba inmerso en las paredes poliméricas del MEJGR y sea necesite aumentar el tiempo y/o dosis de suplementación para obtener significancia en este indicador bioquímico, a su vez todos los autores coinciden en que el consumo de la Granda y sus derivados no arrojan ningún efecto adverso tras su consumo en corto tiempo (50, 89).

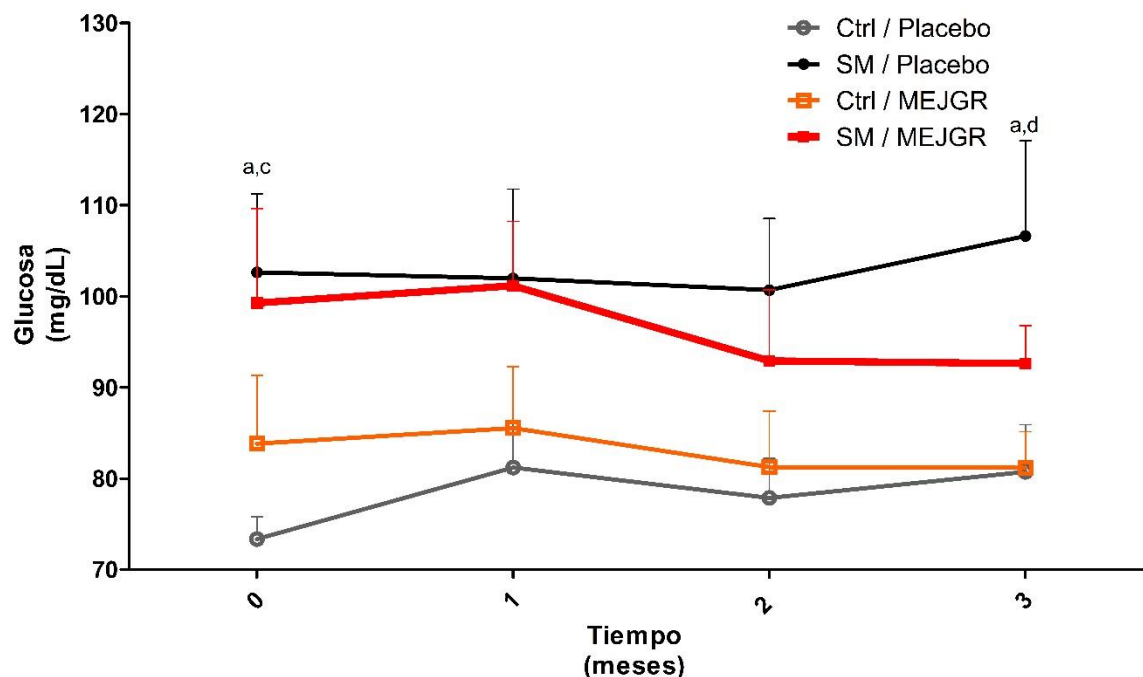


Figura 10. Medición mensual de glucosa, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.8 Triglicéridos

Los indicadores de triglicéridos muestran una clara disminución de los niveles al primer y segundo mes de suplementación, sin embargo; en el tercer mes hubo un repunte (Figura 10). Mientras que el resto de los grupos tuvieron en general valores constantes.

Este resultado sugiere que el metabolismo de lípidos es más activo en este grupo de estudio y que el microencapsulado potencia dicha metabolización. Porque al igual que en otros grupos hubo una disminución en los niveles especialmente en los tiempos 1 y 2.

Asgary en 2013 condujo un estudio con 21 pacientes con hipertensión a los cuales suplementó 150 ml de jugo de granada diariamente durante 2 años, al igual que en este

trabajo, hubo un incremento importante en los niveles de triglicéridos al inicio y al final (149.09 ± 50.44 mg/dL al inicio 171.18 ± 78.92 mg/dL) al finalizar, datos que concuerdan tiene cierta similitud con los de este trabajo, pues en este estudio no encuentra diferencia significativa, atribuyendo estos resultados a que el efecto de la granada es gracias a los punicalaginos y estos son parcialmente hidrolizados en el estómago (83).

Por su parte, estudios con aceite de la semilla de la granada realizado por Mirmiram en 2010, donde se suplementó el aceite de semilla de granada (el cual es rico en ácido punícico) a 51 pacientes (25 en tratamiento y 26 con placebo) diagnosticadas con hiperlipemia, durante 4 semanas, reportando los siguientes datos para el grupo suplementados en tiempo basal 301.88 ± 127.75 mg/dL y en tiempo final 240.63 ± 122.50 mg/dL, y en el grupo placebo reporta de inicio 317.63 ± 156.63 mg/dL y finaliza con 273 ± 139.13 mg/dL, demostrando disminución sin ser significativo (90).

Por último en un meta-análisis realizado por Amirhossein en 2016, concluyó que no existen cambios importantes en la disminución de los niveles de triglicéridos, no obstante, se resalta que de alguna manera, el papel de los polifenoles de la granada como protectores para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (27).

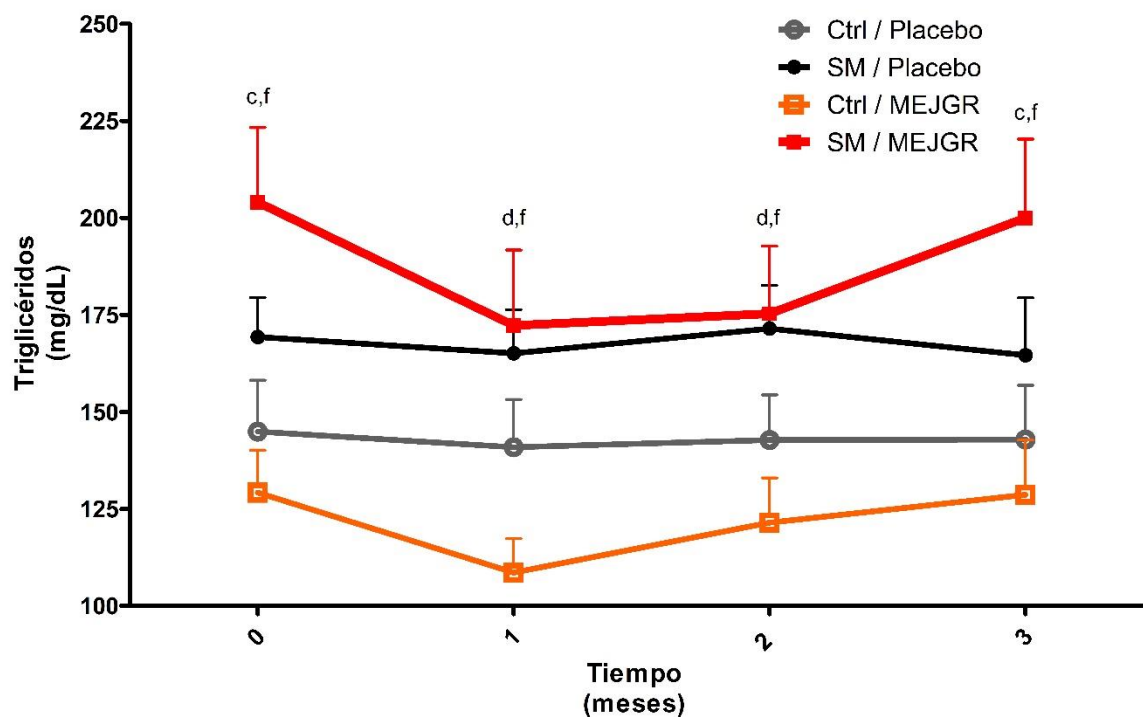


Figura 11. Medición mensual de triglicéridos, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.9 c-HDL

Los niveles de c-HDL fueron uno de los indicadores en donde se encontraron diferencias importantes. Como se observa en el grupo SM/MEJGR se obtuvieron valores iniciales de 35.77 ± 9.71 mg/dL hasta alcanzar valores de 49.29 ± 11.57 mg/dL, estos valores fueron estadísticamente significativos en comparación con el grupo SM/Placebo, el cual incluso tuvo un incremento notable, mientras que en el resto de los grupos, los valores se mantuvieron constantes (Figura 12).

Estos resultados concuerdan con la revisión realizada por Amirhosseinen en 2016 donde se sugiere que la suplementación de polifenoles o algún compuesto antioxidante eleva los niveles de c.HDL (27, 83).

No obstante, no se encontraron diferencias significativas cuando Michael en 2019 realizó un estudio en a 289 pacientes con enfermedad coronaria fueron suplementados diariamente con 240 mL de jugo fresco de granada por 18 meses (91).

También en 2016 Hoseinni realizó un estudio a doble ciego con 48 pacientes con obesidad, donde se suplementaron con 1000mg de extracto de jugo de granada durante 30 días y se midieron biomarcadores de estrés oxidativo y perfil lipídico. En el estudio se encontró aumento de c-HDL, este aumento fue directamente relacionado con el alto contenido de ácido gálico y tánico, ya que estos compuestos aumentaron la expresión de Peroxisoma proliferador activado del receptor (PPAR- α), así como las enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos (92).

Por otra parte, Kutan en 2010 realizó suplementación por 3 meses con polifenoles extraídos del té verde (300mg), algunos cítricos (60 mg) y de la grada (50mg), en 114 pacientes con DM2, para así de esta manera realizar una comparación en el tratamiento del estrés oxidativo, para ello, se realizaron mediciones bioquímicas donde se incluyeron c-HDL, al final del estudio, se encontró un aumento de este, los datos en conjunto demostraron que los productos ricos en polifenoles tienen un efecto antagónico al estrés oxidativo e inhiben la peroxidacion de lípidos (33).

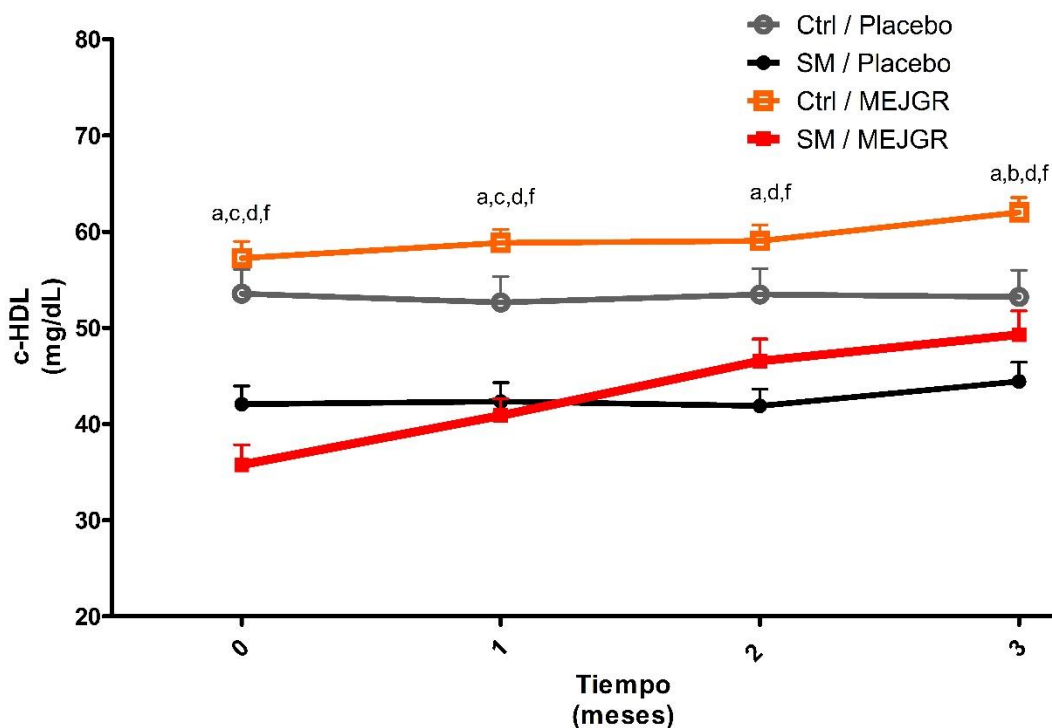


Figura 12. Medición mensual de c-HDL, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.10 Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico

Se analizaron el número de los indicadores de SM de los diferentes grupos estudiados sin encontrarse cambios importantes ya que el grupo CTRL/Placebo inicia con una media de 0.90 ± 0.76 indicadores de SM y concluye con 0.84 ± 0.85 indicadores de SM y el grupo SM/Placebo inicia con 2.98 ± 0.34 indicadores de SM y culmina 2.44 ± 0.99 indicadores de SM, en lo que corresponde a los grupos con SM el que fue tratado con placebo es constante durante el estudio, mas no así del grupo SM/MEJGR pues este inicia con un promedio de 3.34 ± 0.70 indicadores de SM y finaliza en 2.00 ± 1.18 , datos que permite observar una disminución que supera al grupo SM/placebo (Figura 13).

Estos datos se reproducen en los análisis hechos en adultos exclusivamente con la misma tendencia, donde la pendiente supera los 3 criterios de diagnóstico de SM, dicho

comportamiento es en adultos en general y adulto hombre, puesto que en el caso de adulto mujer no se logra superar al grupo SM/placebo, pero si logra salir de la intersección con el punto tres que determina el diagnóstico de SM.

Estos resultados coinciden con Medjakovic en 2013, en el sentido que los polifenoles juegan un papel importante en el tratamiento de la obesidad, DM2 y perfil lipídico, estos compuestos antioxidantes han demostrado activar el PPAR- α en sus distintos tipos, y este al tener efecto directo en la reducción de los niveles de glucosa en sangre y la mejora de la sensibilidad a la insulina permiten el aumento del C-HDL, lo que lo convierte en un alimento funcional en el tratamiento del SM, apoyando los datos obtenido en este estudio (93).

Si bien los resultados para estos indicadores que forman parte de los criterios de diagnóstico son inconsistentes, todos coinciden en que aminoran las consecuencias del estrés oxidativo. Tal como se ha demostrado en modelos in vivo e in vitro con los polifenoles presentes en el jugo y la semilla (48).

En este la figura 12 panel A es visible la reducción del SM muestra su comportamiento en medida de los indicadores de su diagnóstico, y ya que diversos autores menciona las propiedades benéficas de los antioxidantes presentes en el fruto de la granada y especifican cada una de sus partes, para este MEJGR se utilizaron el jugo y la semilla por ello es que la explicación de su reducción se posiblemente a que PPAR es uno de los principales receptores son precursores de la oxidación de ácidos grasos y siendo que Triglicéridos y C-HDL son lípidos considerados para el diagnóstico de SM una alteración positiva en ellos permiten que el paciente reduzca el número de criterios que padece, contribuyendo a mejorar su homeostasis (16, 34, 81).

De la misma forma se propone que otros factores están implícitos en el la regulación de los criterios de diagnóstico de SM, entre ellos los receptores de estrógeno, estos relacionados en

PPAR son importantes moduladores metabólicos y son bondades antiinflamatorias y antiateroescleróticas.

Faulds y sus colaboradores explican la señalización de los receptores de estrógenos y los polifenoles presentes en este producto, también propone la regulación de la Paroxonoaza 1 atribuyendo a esta su efecto antiateroesclerótico, así como la inhibición de enzimas como la aromatasa y deshidrogenasa 17-b-dridroxiesteroide (94).

Uno más de los resultados expresado en este trabajo es la reducción de la presión arterial y esta se relaciona íntimamente con los procesos inflamatorios, por ello el MEJGR logra la aminoración de un criterio de diagnóstico más y logra sumar a las medias para la reducción del mismo, este proceso inflamatorio contribuye a el aumento en la presión arterial, por ello al tener propiedades antiinflamatoria este producto colabora a la reducción del SM (95).

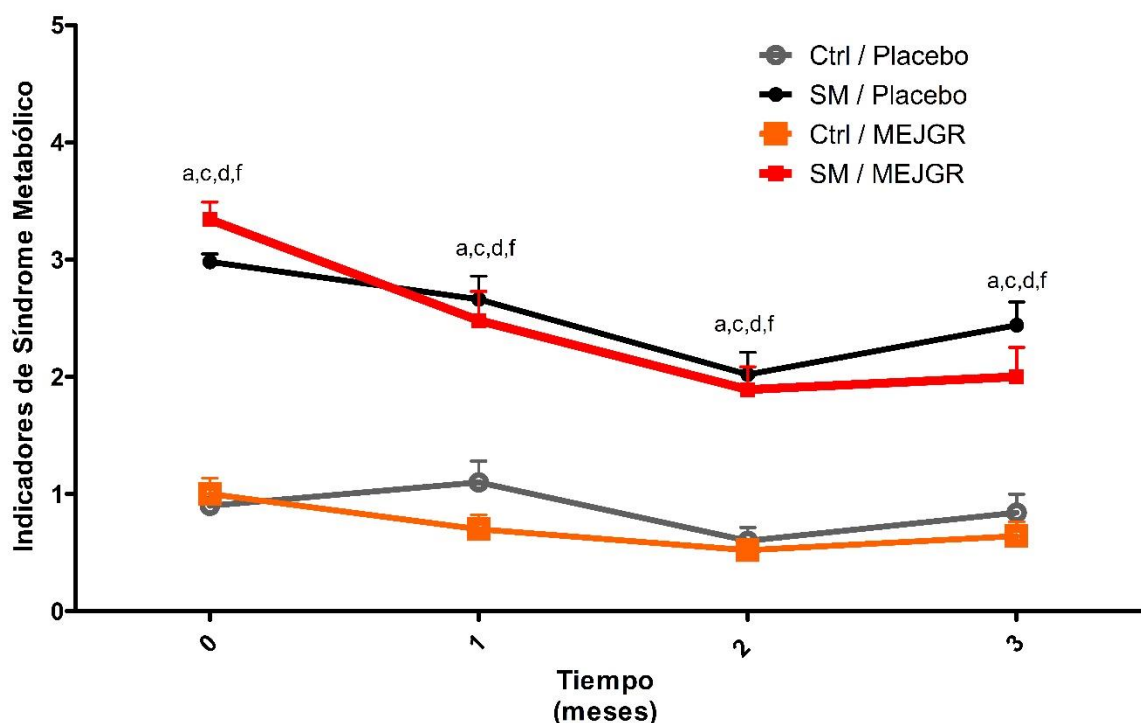


Figura 13. Seguimiento de los indicadores de diagnóstico de SM, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

6.11 *Índice Aterogénico*

En lo que respecta al índice aterogénico, se encontró una disminución significativa en el grupo SM / MEJGR (Figura 14 A) ya que en el tiempo inicial este grupo indica 8.03 ± 3.33 mg de colesterol/ mg c-HDL y finaliza el estudio con un valor de 4.19 ± 1.33 mg de colesterol/ mg c-HDL, lo que se aleja de los valores de riesgo que son 4.5 mg de colesterol/ mg c-HDL (96) como mínimo en mujeres, esta disminución es constante en cada uno de los tiempos.

Dentro del análisis realizado a los demás grupo muestran una disminución similar al análisis en el estudio general, dando paso a poder reportar que existe disminución de este índice al ser tratados con antioxidantes.

Estos datos son similares a los reportados en otro estudio donde fueron tratados con antioxidantes como por ejemplo el estudio realizado por Stampfer en 1980, donde suplementaron con vitamina E a 87245 durante 4 años y reduciendo la posibilidad de riesgo coronario en un rango de 45 a 40 % , en dicho estudio responsabilizan a la vitamina en la oxidación del c-LDL, hecho que influye en el cociente del índice aterogénico (97).

Con respecto a polifenóles de ha mencionado de su factor de protección hacia la enfermedad cardiovascular, de hecho se ha mencionado su factor protector en etapas tempranas de estas patología, postulan el mejoramiento de la función endotelial así como la prevención de la inflamación y la regulación del metabolismo lipídico, por medio de la oxidación de la c-LDL (98).

Un par más de estudios también sugiere alteración en los indicadores de lipoproteínas tras haber consumido Jugo fresco de granada fresco por distintos intervalos de tiempo. Por su parte Davidson suplemento a 146 pacientes entre 45 y 74 años de edad 240 ml de jugo durante 18 meses, y Aviram suplemento durante 1 año a 10 pacientes reportando datos similares en la peroxidación de lípidos (56, 91).

Estos hechos sugieren que al ser suplementados con el MEJGR por su aporte de polifenoles este producto pueda funcionar como coadyuvante a la peroxidación de c-LDL y por consecuencia ver modificado el cociente del índice de Castelli.

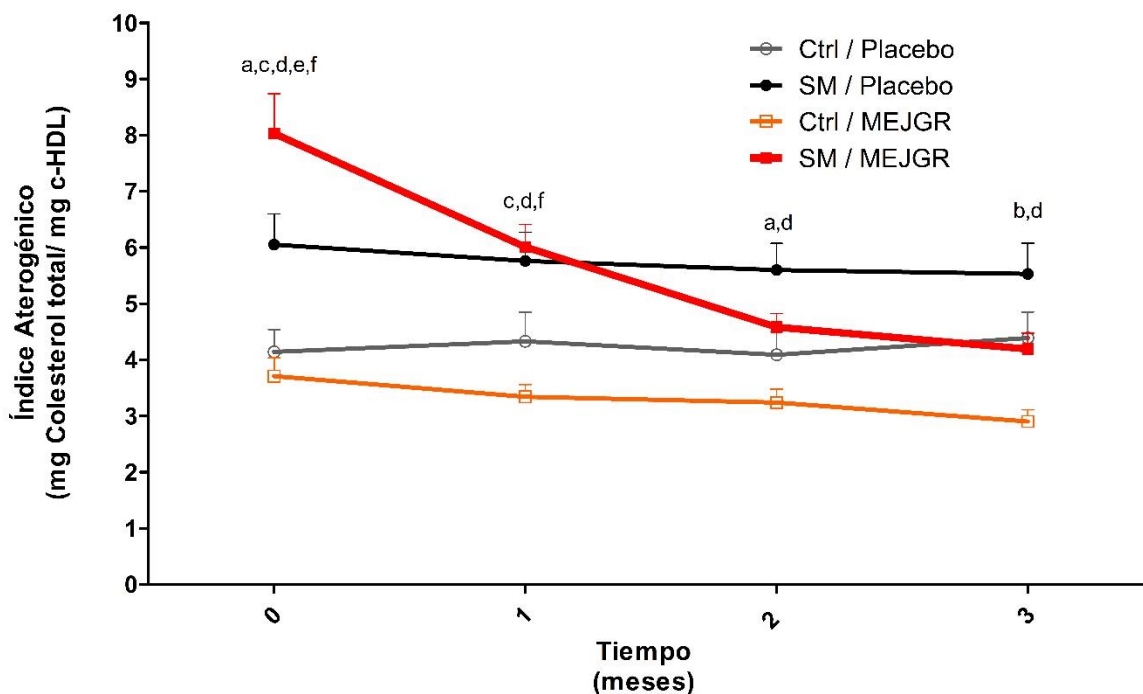


Figura 14. Seguimiento del índice aterogénico, tras la suplementación de 4 g de MEJGR durante 3 meses. Las diferencias significativas entre control y tratamiento se describen: a= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/Placebo; b= comparación entre el Ctrl/Placebo y Ctrl/MEJGR; c= comparación entre el Ctrl/Placebo y SM/MEJGR; d= comparación entre el SM/Placebo y Ctrl/MEJGR; e= comparación entre el SM/Placebo y SM/MEJGR; f= comparación entre el Ctrl/MEJGR y SM/MEJGR.

VII CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del presente estudio son:

1. La suplementación diarias durante 3 meses de MEJGR a pacientes con SM ayuda a la reducción significativa en los valores de los criterios de diagnóstico.
2. El MEJGR, conservar una adecuada capacidad antioxidante del jugo fresco tras pasar por el proceso de microencapsulación.
3. La DL_{50} de MEJGR es mayor a 5000mg/kg de peso.
4. No existes cambios significativos en las mediciones antropométricas (IMC, Circunferencia abdominal y peso) después de haber suplementado diariamente 4 g de MEJGR durante 3 meses en sujetos con SM.
5. En los indicadores bioquímicos para el diagnóstico de SM la suplementación tuvo efectos significativos en triglicéridos y c-HDL.
6. La presión arterial sistólica disminuye significativamente después de la suplementación diaria durante 3 meses del MEJGR en sujetos con SM, no así sobre la presión diastólica.
7. Existe una la disminución del índice aterogénico en pacientes con SM, después de haber suplementado diariamente 4 g de MEJGR durante 3 meses en sujetos con SM.

PERSPECTIVAS:

En espera de futuro estudios que apoyen este trabajo con el uso de un producto biotecnológico a base de jugo de granada, queda a consideración el uso de diferentes agentes encapsulantes, cantidad y tiempo a suplementar para apoyar la conclusiones aquí mostradas.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52. PubMed PMID: 16157765.
2. Grundy SM. A constellation of complications: the metabolic syndrome. *Clinical cornerstone*. 2005;7(2-3):36-45. PubMed PMID: 16473259.
3. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28. PubMed PMID: 15836891.
4. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal*. 2005;149(1):33-45.
5. Betanzos G, Delgado L, López YG. Características del Síndrome Metabólico.
6. Guarnizo Leiva JN. Síndrome metabólico en personas con obesidad abdominal en el personal administrativo del Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Loja 2016.
7. American Heart A, National Heart L, Blood I, Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiology in review*. 2005 Nov-Dec;13(6):322-7. PubMed PMID: 16708441.
8. Meisinger C, Koletzko B, Heinrich J. Metabolic syndrome: older than usually assumed, but still too young to die. *Clinical chemistry*. 2006 May;52(5):897-8; author reply 8-9. PubMed PMID: 16638959.
9. Wachter-Rodarte N. II. Epidemiología del síndrome metabólico. *Gac Méd Méx*. 2009;145(5).
10. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the US. *Diabetes care*. 2005;28(11):2745-9.
11. Mohan V, Mohan D. El síndrome Metabólico en los países en desarrollo. *Diabetes Voice*. 2006;51:15-7.
12. Jaramillo PL, Sánchez R, Díaz M, Cobos L, Brice A, Carrillo JZP, et al. Consenso latinoamericano de hipertensión en pacientes con diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. *Revista Med*. 2013;21(1):115-37.
13. Bruce K, Byrne C. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgraduate Medical Journal*. 2009;85(1009):614-21.
14. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome more than the sum of its parts? *Circulation*. 2003;108(13):1546-51.
15. Einhorn M, FACP, FACE, Daniel. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome*. *Endocrine Practice*. 2003;9(Supplement 2):5-21.
16. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1043-5. PubMed PMID: 15845877. Pubmed Central PMCID: 3764501.
17. Lee PJ, Choi AM. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;35(4):341-50.
18. Maritim A, Sanders a, Watkins rJ. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003;17(1):24-38.

19. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):2087-94. PubMed PMID: 15277390.
20. McTigue KM, Harris R, Hemphill B, Lux L, Sutton S, Bunton AJ, et al. Screening and interventions for obesity in adults: Summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2003 Dec 2;139(11):933-49. PubMed PMID: WOS:000186884800008. English.
21. Dávila-Torres J, González-Izquierdo JdJ, Barrera-Cruz A. Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(2):121-256.
22. Villa AR, Escobedo MH, Méndez-Sánchez N. Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gac Méd Méx*. 2004;140(2):S21-6.
23. Catenacci VA, Hill JO, Wyatt HR. The obesity epidemic. *Clinics in chest medicine*. 2009;30(3):415-44.
24. Spencer K, Crossley JA, Aitken DA, Nix AB, Dunstan FD, Williams K. The effect of temporal variation in biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimesters of pregnancy on the estimation of individual patient-specific risks and detection rates for Down's syndrome. *Annals of clinical biochemistry*. 2003 May;40(Pt 3):219-31. PubMed PMID: 12803832.
25. De Santiago Nocito A. Definición, clasificación y epidemiología de las dislipemias. *Atención Primaria de Calidad*.17.
26. Salor Moral D. Contribución al estudio de la hipertrigliceridemia como criterio diagnóstico del síndrome metabólico. 2013.
27. Sahebkar A, Simental-Mendía LE, Giorgini P, Ferri C, Grassi D. Lipid profile changes after pomegranate consumption: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine*. 2016.
28. Md PRB, Md DPW, McNeal C. Secondary Hypertryglyceridemia. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
29. Jones DW, Hall JE. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension*. 2004 Jan;43(1):1-3. PubMed PMID: 14676222.
30. Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):286-8. PubMed PMID: 12119239.
31. Ramírez V, María K. Contexto familiar como factor predisponente para desarrollar diabetes mellitus tipo 2, en el Centro de Salud N° 2 2016.
32. Conget I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de cardiología*. 2002;55(5):528-35.
33. Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H, Altuntas Y. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of endocrinological investigation*. 2010;33(2):118-24.
34. Veigas NM, Dharmalingam M, Marcus SR. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in Asian Indians. *Journal of Medical Biochemistry*. 2011;30(2):115-20.
35. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(2):647s-52s.

36. Zamora JD. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*. 2007;34(1):17-26.
37. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, et al. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of internal medicine*. 2004 Nov 22;164(21):2335-42. PubMed PMID: 15557412.
38. Keith ME, Jeejeebhoy KN, Langer A, Kurian R, Barr A, O'Kelly B, et al. A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(2):219-24.
39. Tapiero H, Tew K, Nguyen Ba G, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2002;56(4):200-7.
40. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2008 Jun;13(2):128-44. PubMed PMID: 18590349.
41. Teixeira da Silva JA, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*. 2013 8/27;160(0):85-107.
42. Coop G, O. Efecto protector del jugo de granada (*Punica granatum L.*) sobre complicaciones de la diabetes Queretaro, Queretaro: Universidad Autónoma de Queretaro 2011.
43. Betanzos-Cabrera G, Izquierdo-Vega J, Álvarez-Cervantes P. Efecto de un microencapsulado de jugo de granada roja en ratones cd-1 diabéticos y alimentados con una dieta aterogénica Effect of a microencapsulated of red pomegranate juice in diabetic cd-1 mice and fed with an atherogenic diet. 2015.
44. Silva EM, Jacobo CM, Peralta LR, Mayorga BÁ. Efecto de condición del fruto y temperatura de almacenamiento en la calidad de granada roja* Effect of fruit condition and storage temperature on pomegranate quality. *Rev Mex Cienc Agríc Vol 2 Núm 3 p 303-470* 1 de mayo-30 de junio, 2011. 2011:449.
45. Servicio de información agroalimentaria y pesquera M. México D.F2012 [cited 2013 10/09/2013]. Available from: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351.
46. SAGARPA S. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Base de datos en línea Consultado en septiembre del. 2016.
47. Basu A, Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition reviews*. 2009 Jan;67(1):49-56. PubMed PMID: 19146506.
48. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Sendra E, Sayas-Barbera E, Perez-Alvarez JA. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Res Int*. 2011 Jun;44(5):1217-23. PubMed PMID: WOS:000296797900013. English.
49. Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010 Nov;9(6):635-54. PubMed PMID: WOS:000283375300004. English.
50. Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:789764. PubMed PMID: 23737845. Pubmed Central PMCID: 3657449.

51. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000 Oct;48(10):4581-9. PubMed PMID: 11052704.
52. Pérez-Lizaur AB. Sistema mexicano de alimentos equivalentes. Dietas normales y terapéuticas: los alimentos en la salud y la enfermedad (6a. 2014:15.
53. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. 2000 May;71(5):1062-76. PubMed PMID: 10799367.
54. Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(12):1744-56.
55. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):195-8.
56. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 2004;23(3):423-33.
57. Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2003 Dec;89(2-3):295-300. PubMed PMID: 14611895.
58. López-Mejía O, López-Malo A, Palou E. Granada (*Punica granatum* L): una fuente de antioxidantes de interés actual.
59. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(6):635-54.
60. García-Viguera C, Pérez-Vicente A. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alimentación Nutrición y Salud*. 2004;11(4):113-20.
61. Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I, Lee KJH, Bori I, Fukushima Y, et al. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II in vitro. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1993;82(5):487-92.
62. Alvarez-Cervantes P. Evaluación de la actividad antibacteriana de un microencapsulado de jugo de granada roja (*Punica granatum* L.). Pachuca, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2014.
63. Schrooyen PM, Meer R, Kruif CD. Microencapsulation: its application in nutrition. *P Nutr Soc*. 2001;60(04):475-9.
64. Dziezak JD. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. *Food Technol-Chicago*. 1988 Apr;42(4):136-&. PubMed PMID: WOS:A1988M957500009. English.
65. Perez-Alonso C, Cruz-Olivares J, Barrera-Pichardo JF, Rodriguez-Huezo ME, Baez-Gonzalez JG, Vernon-Carter EJ. DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *J Food Eng*. 2008 Apr;85(4):613-24. PubMed PMID: WOS:000251843400014. English.
66. Huertas RAP. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 2010;63(2):5669-84.
67. Karlberg JP, Speers MA. Revisión de ensayos clínicos: una guía para el Comité de ética. Hong Kong: Centro de Ensayos Clínicos, Universidad de Hong Kong. 2010.

68. Salud Sd. Lineamientos para las Buenas Prácticas Clínicas (ICH-E6-R1) www.cofepris.gob.mx2014 [cited 2014 23/11/2014]. Available from: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/Protocolos%20de%20Investigacion/Lineamientos%20Bioequivalencia/Lineamientos%20BPC%2031052012.pdf>.
69. Salinas-Moreno Y, Pérez-Alonso JJ, Vázquez-Carrillo G, Aragón-Cuevas F, Velázquez-Cardelas GA. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia*. 2012;46(7):693-706.
70. Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(10):4032-40.
71. Hossin FLA. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) peels and its extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2009;8(8):1251-7.
72. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 1972;18(6):499-502.
73. Neri Salvatierra AC, Quispe González JC. Determinación de colesterol total, colesterol HDL e índice aterogénico en personas adultas de ambos sexos que acuden al policlinico de Río seco Distrito El Porvenir, Enero 2011.
74. Rodríguez González I. Evaluación de las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión de antioxidantes de polen apícola: Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.
75. Favari-Perozzi L, Nava-Álvarez R, Meléndez-Camargo ME. Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2007;38(3):19-25.
76. Rodríguez Amado R, Lafourcade Prada A, Pérez Rondón L. Hojas de *psidium guajava* L. *Revista Cubana de Farmacia*. 2013;47(1):127-35.
77. Soca PEM, Pérez IP, Escofet SN, Torres WC, Pena AN, De León DP. Ensayo clínico aleatorio: papel de la dieta y ejercicios físicos en mujeres con síndrome metabólico. *Atención Primaria*. 2012;44(7):387-93.
78. Ross R, Janssen I, Dawson J, Kungl AM, Kuk JL, Wong SL, et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: a randomized controlled trial. *Obesity research*. 2004;12(5):789-98.
79. Vasques AC, Rosado L, Rosado G, Ribeiro RdC, Franceschini S, Geloneze B. Indicadores antropométricos de resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2010.
80. Kardum N, Petrović-Oggiano G, Takic M, Glibetić N, Zec M, Debeljak-Martacic J, et al. Effects of Glucomannan-Enriched, Aronia Juice-Based Supplement on Cellular Antioxidant Enzymes and Membrane Lipid Status in Subjects with Abdominal Obesity. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
81. Sorrentino G, Crispino P, Coppola D, De Stefano G. Efficacy of lifestyle changes in subjects with non-alcoholic liver steatosis and metabolic syndrome may be improved with an antioxidant nutraceutical: a controlled clinical study. *Drugs in R&D*. 2015;15(1):21-5.
82. Hernández-Jiménez S. Fisiopatología de la obesidad. *Gaceta Médica de México*. 2004;140(2):27.
83. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. *ARYA Atheroscler*. 2013;9(6):326-31.

84. Drain PK, Evert J, Gardner P. Bring global health and global medicine home--in reply to Ventres and Page and to Asgary. *Academic medicine : journal of the Association of American Medical Colleges*. 2013 Jul;88(7):908-9. PubMed PMID: 23799432.
85. Stowe CB. The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complementary therapies in clinical practice*. 2011;17(2):113-5.
86. Banihani S, Makahleh S, El-Akawi Z, Al-Fashtaki R, Khabour O, Gharibeh M, et al. Fresh pomegranate juice ameliorates insulin resistance, enhances β -cell function, and decreases fasting serum glucose in type 2 diabetic patients. *Nutrition Research*. 2014;34(10):862-7.
87. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):363-71.
88. Díaz-Rubio ME, Pérez-Jiménez J, Martínez-Bartolomé MÁ, Álvarez I, Saura-Calixto F. Regular consumption of an antioxidant-rich juice improves oxidative status and causes metabolome changes in healthy adults. *Plant foods for human nutrition*. 2015;70(1):9-14.
89. Orak HH. Evaluation of antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice and its sour concentrate processed by conventional evaporation. *International journal of food sciences and nutrition*. 2009;60(1):1-11.
90. Mirmiran P, Fazeli MR, Asghari G, Shafiee A, Azizi F. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British journal of nutrition*. 2010;104(03):402-6.
91. Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, et al. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *The American journal of cardiology*. 2009;104(7):936-42.
92. Hosseini B, Saedisomeolia A, Wood LG, Yaseri M, Tavasoli S. Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary therapies in clinical practice*. 2016;22:44-50.
93. Medjakovic S, Jungbauer A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. *Food & function*. 2013;4(1):19-39.
94. Rodriguez-Mateos A, Vauzour D, Krueger CG, Shanmuganayagam D, Reed J, Calani L, et al. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of toxicology*. 2014;88(10):1803-53.
95. Ramos VC, Sanz-Rosa D, de las Heras Jiménez N, Gil EC, Ortega MM, Juliá VL. Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2004;21(7):347-54.
96. HDL F, Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, et al. Cocientes lipoproteicos: significado fisiológico y utilidad clínica de los índices aterogénicos en prevención cardiovascular. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*. 2010;22(1):25-32.
97. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New England Journal of Medicine*. 1993;328(20):1444-9.
98. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovascular therapeutics*. 2010;28(4):202-15.

IX ANEXOS

9.1 Certificado de calidad del microencapsulado de granada roja



Granding International SA CV

Exuberancia # 10 Col. Esmeralda. Jiutepec, Mor. MEXICO 62555
Tel / Fax (777) 319-7747. e-mail: granding1@prodigy.net.mx

Laboratorio de Control de Calidad CERTIFICADO DE CALIDAD

Nombre: GRANADA
Cliente: Dr. Gabriel Betanzos
Nombre científico: *Punica granatum*
Forma farmacéutica: Extracto seco
Lote: MEF001943913
Fecha de producción: 23 de Octubre de 2013
Fecha de caducidad: 3 años a partir de la fecha de producción, siguiendo las condiciones de almacenamiento señaladas.
País fabricante: México
Material vegetal usado: Fruto de la granada
Solvente de extracción: Mezclas hidro-alcohólicas
Excipientes: Maltodextrina
Conservadores: Ninguno

Propiedades organolépticas:
* Apariencia: Polvo
* Color: Rosa pastel
* Olor: Herbáceo característico
* Prueba del Tamiz: 98.02 % pasa por malla 40

Propiedades fisicoquímicas:
** pH relativo (10% en agua): 3.67
** Densidad de peso: 0.5040 g/mL
** Pérdida por secado: 3.13 %

Pruebas de solubilidad del Principio Activo:

* Diluciones al 1% (p/v)

En alcohol etílico al 96 %	En alcohol etílico al 70%	En agua desmineralizada
Poco favorable	No favorable	Favorable

Informe microbiológico:

Determinación	Resultado (UFC/g)	*** Límites (UFC/g)	Método utilizado en el análisis
Bacterias aerobias	<10	10 ³	NOM-092-SSA1-1994
Hongos y Levaduras	<10	10 ³	NOM-111-SSA1-1994
<i>Escherichia coli</i>	<10	10	NOM-113-SSA1-1994
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ninguna	NOM-114-SSA1-1994

* Referencia: Conforme a estándar interno.


** Referencia: Métodos utilizados conforme a la FEUM, 7^a edición.

*** Referencia: Farmacopea Hebollana de los Estados Unidos Mexicanos, 2001.

Condiciones de almacenamiento: Manténgase en lugar fresco y seco, libre de humedad a temperatura ambiente y bien cerrado.

Nota: Los resultados aquí presentados son del extracto seco a granel.
No deben copiarse o reproducirse sin previa autorización escrita.

ATENTAMENTE


L. F. Dalila González Maldonado
CEDULA 5967536 UAEM
Responsable Control de Calidad

9.2 Solicitud al comité institucional de ética para el cuidado y uso de los animales de laboratorio



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
DGSA- BIOTERIO
CIECUAL

FORMATO DE SOLICITUD AL CIECUAL

Subdirección, Departamento o área de trabajo: Instituto de Ciencias de la Salud, Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud. Laboratorio de nutrigenómica, UAEH

Responsable del Proyecto: Tesista: L.N José Antonio Guerrero Solano. Director de tesis: Dr. Gabriel Betanzos Cabrera.

Fecha de solicitud: 13-feb-14

TITULO: "Evaluación del efecto de un microencapsulado de los arilos de la granada roja (*Punica granatum L.*) en un modelo animal de síndrome metabólico".

E mail:
gsnutricional@gmail.com
gbetanzo@uaeh.edu.mx

Teléfono y fax: Tel. 7711543470

Antecedentes nacionales o Internacionales del Experimento:

El síndrome metabólico (SM) es definido como una constelación de factores de riesgo que, en conjunto, son predictores de enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes tipo 2 (DT2); en México se ha reportado una prevalencia de 13.6% a 26.6%. Por otra parte, la granada es una fruta estudiada por sus múltiples beneficios a la salud, el jugo de tal fruto en fresco presenta un gran contenido de polifenoles, elagitaninos y antocianinas. Así mismo en estudios *in vivo* e *in vitro* de los componentes de la granada han mostrado efectos benéficos sobre el SM (hipoglucemiantes, hipolipemiantes, hipotensivos, entre otros). A pesar de sus efectos benéficos comprobados, en México se cultiva en contadas regiones (incluido Hidalgo como uno de los principales productores) y su consumo se limita a la temporada en que se da la cosecha. Por otra parte la microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son introducidas en una matriz polimérica con el objetivo de impedir su pérdida, protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes o impedir que sufran reacciones de oxidación.

Justificación

Es conocido que el fruto de granada, tiene efectos terapéuticos tales como anti-inflamatorio, antioxidante, antiaterogénico, antihipertensivo, anticancerígeno entre otros. Por otra parte, es un fruto de escaso consumo, sólo en temporada, por lo que es necesario ampliar su disponibilidad y proteger los compuestos bioactivos del fruto mediante la microencapsulación y de esta manera fomentar un consumo cotidiano en cualquier temporada del año. De esta manera en el trabajo presente se pretende evaluar el jugo microencapsulado en un modelo de SM inducido con sacarosa al 30% en ratas Wistar, para determinar si el microencapsulado mantiene sus propiedades biológicas después del proceso tecnológico realizado.

Objetivos:

Objetivo General

Evaluar el efecto de un microencapsulado de los arilos de granada roja (*Punica granatum L.*) en un modelo animal con síndrome metabólico inducido.

Objetivos específicos

- 1) Inducir y generar síndrome metabólico en ratas Wistar alimentadas con alta concentración de sacarosa.
- 2) Determinar la capacidad de captura de radicales libres del microencapsulado utilizando el ensayo de ABT⁵⁺ y DPPH⁺ así como la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteau.
- 3) -Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) del microencapsulado en ratas Wistar.
- 4) Evaluar en un modelo *in vivo* la administración intragástrica diaria del microencapsulado a ratas Wistar a las cuales se les indujo el síndrome

	<p>metabólico, a través de la medición de: colesterol total, cHDL, LDL, triglicéridos, glucosa e insulina, presión arterial sistólica sanguínea, peso y grasa intra-abdominal.</p> <p>5) -Medir la expresión del gen <i>PON1</i> por PCR en tiempo real en ratas Wistar con síndrome metabólico que recibieron y no administración de microencapsulado por varias semanas.</p> <p>6) -Con la finalidad de observar correlación expresión con actividad, medir la actividad enzimática en suero sanguíneo por un método semi-automatizado en ratas Wistar con síndrome metabólico que recibieron y no administración de microencapsulado por varias semanas.</p> <p>7) Evaluar el efecto de un microencapsulado de los arilos de granada roja (<i>Púnica granatum</i> L) sobre la masa corporal y masa grasa abdominal mediante somatometría.</p>								
<p>Materiales y Métodos del ensayo: Se obtendrá granada roja (<i>Púnica granatum</i> L.) de temporada (año 2013) de la comunidad del Nith, Ixmiquilpan, Hidalgo la cual será cosechada personalmente para asegurar la calidad del fruto. Se lavará y seleccionará el fruto maduro para posteriormente extraer los arilos del mismo y obtener el jugo para ser procesado de manera inmediata para la realización de la microencapsulación por secado por aspersión. La técnica de microencapsulación se hará bajo la Patente Nacional con expediente MX_a_2012_001392 desarrollada por el Dr. Santiago Filardo Kerstup, en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos 1, en el Área Académica de Química de la Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo (UAEH). Se realizará una prueba previa de DL₅₀ del microencapsulado de los arilos de granada roja utilizando para la misma 15 ratas Wistar macho de entre 180 y 200 g de peso. El microencapsulado se administrará después de 5 días, diariamente por vía oral por cánula intragástrica utilizándose una sola dosis por grupo. La sustancia de ensayo se disuelve o suspende en una solución acuosa. (El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo. En los roedores, el volumen no debe superar 1 mL/100 g de peso corporal).</p>	<table border="1"> <tr> <td>Especie: <i>Rattus norvegicus</i></td> <td>Cantidad: 15 DL₅₀ 56 estudio</td> </tr> <tr> <td>Línea: <i>Wistar</i></td> <td>Sexo: Macho</td> </tr> <tr> <td>Categoría:</td> <td>Edad: 8 semanas</td> </tr> <tr> <td>Peso: 180- 200 g</td> <td>Fecha de Inicio: Febrero de 2014</td> </tr> </table>	Especie: <i>Rattus norvegicus</i>	Cantidad: 15 DL ₅₀ 56 estudio	Línea: <i>Wistar</i>	Sexo: Macho	Categoría:	Edad: 8 semanas	Peso: 180- 200 g	Fecha de Inicio: Febrero de 2014
Especie: <i>Rattus norvegicus</i>	Cantidad: 15 DL ₅₀ 56 estudio								
Línea: <i>Wistar</i>	Sexo: Macho								
Categoría:	Edad: 8 semanas								
Peso: 180- 200 g	Fecha de Inicio: Febrero de 2014								

Se realizarán 3 grupos de 5 animales cada uno denominados de dosis baja (DB) dosis media (DM) y dosis alta (DA). El número de animales de cada jaula no deberá interferir con la observación clara de cada animal. Dieta estándar y agua *ad libitum*. Para cada grupo, Se administrará una dosis de 10, 100 y 1000 mg / kg de peso corporal. El periodo de observación será por 2 meses ya que es el tiempo que durará el experimento principal.

Procedimiento. Los animales estarán en ayunas desde una noche antes de la administración. Tras el periodo de ayuno, los animales se pesarán y se administrará el microencapsulado por alimentación forzada mediante una cánula de intubación adecuada. Después de la administración, las observaciones se realizarán y se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. **Observaciones clínicas:** Un examen clínico cuidadoso se hará una vez al día. Las observaciones incluirán cambios en la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, del aparato respiratorio, circulatorio, sistema nervioso autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Temblores, tremor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Si así es el caso, el momento de la muerte debe registrarse con la mayor precisión posible. El peso de cada animal debe determinarse semanalmente antes de administrar la sustancia de ensayo. Los cambios en el peso se calcularán y registrarán cuando la supervivencia del animal supere un día. Al final de la prueba los animales supervivientes se pesarán y se sacrificarán humanitariamente a continuación. **Patología:** El examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas también deben ser considerados, ya que puede proporcionar información útil. **Datos y reportes:** Los datos se resumirán en un cuadro que indique, para cada lote, el número de animales al comienzo del ensayo, el momento de la muerte de cada animal en los diferentes niveles de dosis, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la necropsia. Los animales que se sacrifiquen humanitariamente debido a la angustia relacionada con el compuesto y el dolor se registran como muertes relacionadas con el compuesto. La DL₅₀ se determinará por el método de Bliss, y el de Litchfield y Wilcoxon.

Posteriormente se obtendrán 56 ratas Wistar macho de 8 semanas de edad y de entre 180 y 200 g de masa corporal obtenidos del Bioterio del ICSa, UAEH. Una vez adquiridos los murinos, se mantendrán a temperatura y ciclos de luz controlados. Se alimentarán durante todo el estudio con producto comercial no purificado Harlan Teklad® 18% proteína (Madison, WI, USA). 16 animales serán hidratados con agua *ad libitum* durante todo el estudio, 40 de éstos serán hidratados con agua con sacarosa al 30% para inducción de SM. A las 20 semanas de sometimiento a dicha inducción se comprobará el estado patológico de SM de las 40 ratas por medio de toma de presión arterial sistémica por electroesfingomanómetro, medición de glucosa sanguínea (Accu-trend® de Roche) Medición de Colesterol HDL y LDL (Kit enzimático), Triglicéridos (Kit enzimático) y masa corporal (balanza ADAM compact balance AQT-250, USA). De ser positivo el estado patológico de SM, estas mediciones fungirán como tiempo cero del estudio y a partir del mismo se formarán 7 grupos de 8 roedores cada uno denominados [Control (C), Control con microencapsulado (CC), SM sin microencapsulado (SM), SM con microencapsulado sin granada (SMM-G) y SM con microencapsulado con granada a tres diferentes dosis [SMMG1 (10 mg/kg peso), SMMG2 (100 mg/kg peso) y SMMG3 (1000 mg/kg peso)] Importante recalcar que las dosis están sujetas a cambios de acuerdo a los resultados de la DL₅₀ previa. También se tomará en cuenta para establecer las dosis de microencapsulado de los últimos tres grupos el **conteo de polifenoles** que se realizará por el método de Folin-Ciocalteu, donde se fundamenta en su carácter reductor. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfotungstácico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W₅O₂₃) y molibdeno (Mo₅O₂₃). La absorbancia del color azul desarrollado se medirá a 765 nm con la ayuda del espectrofotómetro e indica la cantidad total de polifenoles expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) o equivalentes de catequina y con ello determinar la dosis que contengan (~0.73 mg equivalentes de ácido gálico). Se realizarán las mediciones ya descritas cada 7 días durante un periodo de 8 semanas resultando así un tiempo total de 28 semanas.

Para la determinación bioquímica de Triglicéridos, Colesterol LDL, HDL y glucosa, se extraerán muestras de sangre (150 µL) por corte de cola y se analizará por medio de kit enzimático. Se realizará cada 7 días durante 8 semanas emulando el estudio de Carvajal-Sandoval, Guadalupe- Baños., El Hafidi, M., Pérez, I., Zamora, J., Virgilia-Soto, G. Glycine intake decreases plasma free fatty adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004.

Para los signos vitales se describe un equipo que permite obtener parámetros fisiológicos en ratas, por medio de métodos incruentos y minimizando las molestias al espécimen, aquéllos son: Electrocardiograma (ECG), presión sistólica (PS) y presión diastólica (PD). El sistema se adapta a una caja especial de acrílico a la que se le añadió una base plana (de acrílico) que contiene cuatro electrodos separados para obtener el electrocardiograma monopolar o diferencial, de donde se extrae la frecuencia cardíaca. Mediante una cámara inflable que abraza la cola, se mide la presión arterial y se obtienen las oscilaciones del pulso sanguíneo.

Para medir la expresión del gen *PON1* al final del experimento se sacrificará a los animales por cámara de eutanasia, se extraerá el hígado de cada uno empleando un estuche de disección, una vez extraído éste se almacenará a -70°C para la posterior extracción del RNA total. Aislamiento de ARN total. El ARN total será obtenido por la técnica de TRIzol[®], en la cual 0.1 g de muestra de hígado se homogeneizará en 1 mL de TRIzol[®] (Invitrogen). Para la separación de las fases, se adicionará 0.2 mL de cloroformo (J.T. Baker, México) se agitará y se centrifugará (Microcentrifuga Hettich Zentrifugen, MIKRO 22 R) por 15 min a 10500 rpm de 2 a 8°C . Para la precipitación del ARN se utilizará 0.5 mL de alcohol isopropílico (Sigma Aldrich, USA) se agitará, se incubará durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugará por 10 min a 10500 rpm de 2 a 8°C . Posteriormente se realizará un lavado del ARN con 1 mL de Etanol al 75% en H₂O DEPC libre de RNAsa (USB corporation, Cleveland, OH, USA), se mezclará y se centrifugará por 5 min a 8000 rpm de 2 a 8°C . Por último se disolverá el ARN en 30 μL de agua DEPC libre de RNAsa. Diseño de oligonucleótidos para PCR: Se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1) para el gen de la *PON1* utilizando el programa DNAMAN[®] Versión 3.0, con base en la secuencia nucleotídica del ARNm de la *PON1* de rata (*Ratus norvegicus*) obtenido de la base de datos de GeneBank[®]. Así mismo se utilizó como gen de referencia Glicerilaldehído 3P-deshidrogenasa (*GAPDH*) cuyos oligonucleótidos fueron amablemente proporcionados por Dr. Juan Carlos Cancino Díaz (Instituto Politécnico Nacional).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Simbolo del gen	Secuencia	Temperatura (°C)	Producto esperado
<i>PON1</i> -Reverse	5'-GCAGCTATATCGTTGTAGCTAG-3'	55.0	335 pb
<i>PON1</i> -Forward	5'-GGACTAACTTTCTTTAGCACTG-3'	55.0	335 pb
<i>GAPDH</i> -Reverse	5'-GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'	55.0	350 pb
<i>GAPDH</i> -Forward	5'-GTCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'	55.0	350 pb

Perfil de expresión por RT-PCR: Una vez obtenido el ARN total, se realizará una reacción de transcriptasa reversa (RT) con un volumen final de 20 μL utilizando como reactivos: 1 μL muestra de ARN total, 1 μL Oligo dT (Invitrogen), 1 μL dNTP 10 mM (Invitrogen), 10 μL H₂O estéril. Se incubó a 65°C por 5 min en un termociclador (TECHNE, TC-512, UK Barloworld Scientific Ltd.). Al finalizar el ciclo, se pasará la reacción inmediatamente a hielo para provocar un choque térmico. Posteriormente se agregará 4 μL de Regulador 5x First Strand (Invitrogen) y 2 μL de DTT 0.1M (Invitrogen, Canadá). Se incubará 2 min a temperatura ambiente y se agregará 1 μL de la enzima Transcriptasa Reversa MMLV-RT (Invitrogen), antes de incubar la reacción por 50 min a 37°C seguido de 13 min a 70°C . Una vez que obtenido el ADNc se realizará una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen total de 50 μL utilizando los siguientes reactivos: 5 μL de Regulador 10x PCR (Invitrogen, Brasil), 1.5 μL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen, Brasil), 1 μL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 μL de Oligonucleótido 1 y 1 μL de Oligonucleótido 2, 39 μL de H₂O estéril y 0.5 μL de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). Posteriormente se procederá a incubar el tubo de reacción en el termociclador 35 ciclos de 1 min 94°C , 1 min 55°C , 1 min 72°C , con desnaturalización inicial de 5 min 94°C y extensión final de 5 min 72°C . Los productos de la PCR serán sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando como regulador TAE1x (AMRESCO[®], Ohio, USA) y como marcador de fluorescencia Bromuro de Etidio (BrEt). Las muestras correrán en una cámara para electroforesis (Thermo EC Minicell[®] EC320) a 85 V. Se realizará la fotodocumentación de los geles utilizando una cámara de rayos UV (EpiChem³Darkroom, UVP BioImaging Systems). Finalmente se analizó la intensidad de las bandas con software LabWorks[®] para conocer los niveles de expresión mediante conteo de pixeles.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos serán sometidos a estadística descriptiva con medidas de tendencia central, los mismos se expresarán como la media [con sus respectivas desviaciones estándar (DE)] de cada una de las variables. La diferencia entre las medias para cada variable será estimada por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y para evaluar diferencias entre las medias se aplicará una prueba de comparación de medias por Tukey-b, teniendo como variable dependiente el factor de tratamiento, y como variables independientes la presión arterial, glucosa, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, masa corporal, expresión de la *PON1* y grasa abdominal por tiempo transcurrido. El análisis estadístico será realizado con el software computacional SPSS[®] (Statistical Package for Social Studies) Ver. 18.0 para Windows, con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

<p><i>Factibilidad y aspectos éticos</i> El presente estudio se elaborará en cumplimiento con lo estipulado en los artículos 121- 126 del título séptimo (de la investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación) del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y en apego a la normativa ética del bioterio de la UAEH.</p> <p><i>Recursos humanos, físicos y financieros</i> El presente estudio será realizado por el maestrante con la colaboración de LN. José Morán León y el Dr. Gabriel Betanzos Cabrera, director de proyecto. Se llevará a cabo en las instalaciones del ICSa y financiado con fondos del director de tesis y propios.</p>		
---	--	--

**Método estadístico u otro empleado para el cálculo del número de animales que utilizara:
Número de animales**

Muestreo por conveniencia, se propone utilizar 8 animales partiendo de la premisa de que 5 animales mínimo por grupo suponen datos son suficientes para producir una curva de respuesta a la dosis y, en lo posible, permitir una determinación válida.

CLINICA	SI	NO	Frecuencia en que necesitara los datos	NUTRICION	
Signos Vitales	X		Una vez semanal durante 8 semanas	Dieta	Estándar
Peso	X		Diario en la DL ₅₀ , Casual en periodo de inducción de SM y una vez semanal durante 8 semanas a iniciar la suplementación con microencapsulado	Horario	
Consumo de Agua	X			cantidad	<i>Ad libitum</i>
Consumo Alimento	X			Observaciones:	
Jaula Metabólica		X			
Resumen Clínico conductual		X			
Condiciones ambientales			Frecuencia en que necesitará los datos		
Temperatura			20 +/- 2° C		
Humedad Relativa			45		
Cambios de Aire			18-20 veces por hora		
Iluminación			12 horas luz por 12 horas oscuridad		

Observaciones:

PROCEDIMIENTO QUE UTILIZARA

PROCEDIMIENTO	SI	NO	Frecuencia	Observaciones
Immunización		X		
Administración de medicamentos	X		Diariamente, durante 2 meses	La inoculación consistirá de un extracto natural de granada
Inoculación de agentes biológicos				
Sustancias peligrosas (xenobiótico)		X		
Cirugía		X		
Obtención de muestras		X		
Obtención de tejidos		X		
Selección del Punto Final	X		Criterios para su definición:	

				Los animales que muestren signos graves y duraderos de angustia o dolor deberán ser sacrificados de forma humanitaria.
Eutanasia	X			Método: Cámara de eutanasia para el ensayo previo y el estudio principal.
FECHA	RESULTADO	SI	NO	OBSERVACIONES
	Aprobado	X		Si se aprueba el protocolo, sin embargo, se debe incluir la información que falta en procedimientos experimentales.
	Negado			
INVESTIGADOR			PRESIDENTE DEL CIECUAL	DIRECTOR BIOTERIO
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera			Dra. Minarda De la O Arciniega	Quím. Álvaro Cerón Beltrán

9.3 Documentos de gestión de población



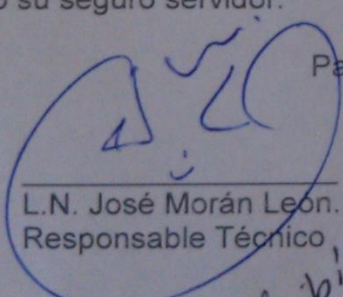
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ICESA
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Prof. Nicolás Belem Lara
Director de la Escuela Secundaria Técnica Núm. 38.
PRESENTE

Por medio del presente me dirijo a usted para enviarle un cordial saludo, asimismo, para hacerle una atenta solicitud:

El que suscribe, L.N. José Morán León Estudiante de la maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud, del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, solicita a usted su autorización para poder realizar el Proyecto de Investigación Titulado: **“Evaluación de la suplementación de un microencapsulado del jugo de los arilos de granada roja (*Punica granatum* L) en pacientes con síndrome metabólico”**(protocolo adjunto), para el cual solicitamos el acceso a las instalaciones de la Escuela Secundaria técnica Núm. 38, ya que dicho proyecto tiene por objetivo evaluar los beneficios a la salud de un producto biotecnológico desarrollado por nuestro grupo de investigación a base de jugo de granada en 200 pacientes con síndrome metabólico; para lo cual se tomarán medidas de peso, talla, circunferencia de cintura y 10 mL de muestra sanguínea. Se harán 8 tomas quincenales, en el caso de la bioquímica sanguínea se extraerán 10 mL de sangre total, asimismo, se suplementará diariamente un microencapsulado de granada roja (polvo color rosado) disuelto en agua durante 120 días. Sin otro motivo por el momento y en espera de su respuesta afirmativa, me despido y quedo como su seguro servidor.

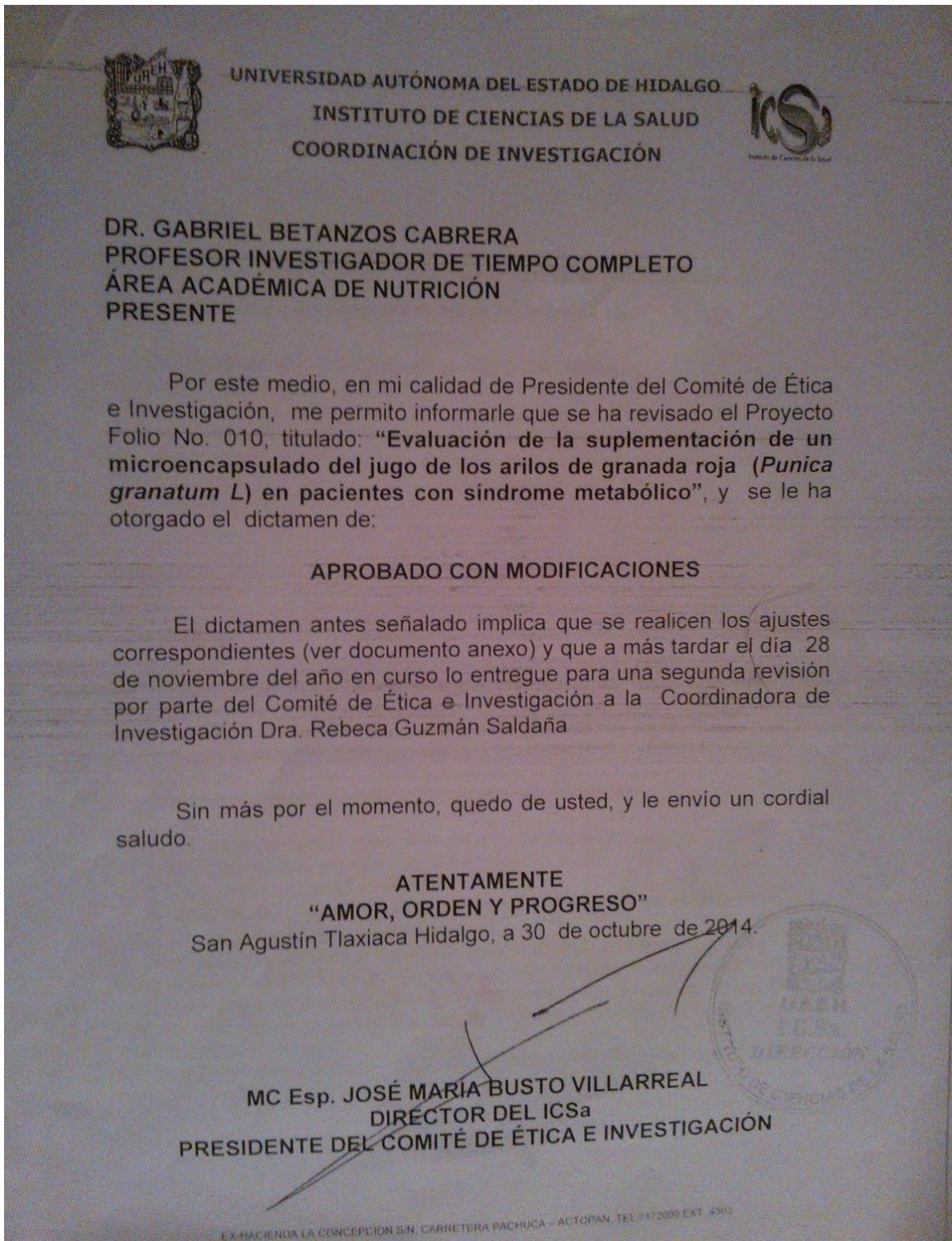
Pachuca, Hidalgo a 07 de julio de 2014
ATENTAMENTE


L.N. José Morán León.
Responsable Técnico

*Recibi original
07/07/14*

Vo.Bo.
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera
Director de tesis y Profesor Investigador de Tiempo completo
Área Académica de Nutrición, ICESA, UAEH.

9.4 Respuesta del Comité de investigación del ICSa de la UAEH



9.5 Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
 ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD
Proyecto: Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum L.*) en pacientes con síndrome metabólico.



Consentimiento Informado para participar en estudios de investigación clínica			
Título:	Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de granada roja (<i>Punica granatum L.</i>) en pacientes con síndrome metabólico.		
Responsable técnico:	L.N. José Morán León		
Sede:	Laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.		
<p>El presente proyecto tiene por objetivo evaluar los beneficios a la salud de un producto biotecnológico desarrollado por nuestro grupo de investigación a base de jugo de granada en 200 pacientes con síndrome metabólico; para lo cual se tomarán medidas de peso, talla, circunferencia de cintura y 10 mL de muestra sanguínea. Se harán 8 tomas quincenales, en el caso de la bioquímica sanguínea se extraerán 10 mL de sangre total, asimismo, se suplementará diariamente un microencapsulado de granada roja (polvo color rosado) disuelto en agua durante 120 días.</p> <p>De ser positiva su participación y contar con la aprobación y consentimiento del padre o tutor, de forma personal y confidencial se le entregará resultados de niveles de glucosa, colesterol total, presión arterial y diagnóstico nutricional de forma totalmente gratuita, los resultados de este estudio serán manipulados de manera ética y con fines de difusión y divulgación científica.</p> <p>Yo he leído detenida y detalladamente la información de este documento, mis dudas han sido respondidas de una manera clara y adecuada; por lo cual acepto las responsabilidades y obligaciones que implica ser parte de este proyecto.</p>			
_____ Nombre y firma del participante	_____ Firma de Autorización del Padre o Tutor del participante	_____ Nombre y firma y del testigo	_____ Responsable técnico
Fecha: / /2014		Folio de identificación:	

Responsable Técnico: L.N. José Morán León Celular: (+52 1) 771 163 4062

Correo: jasmorloe@hotmail.com

Laboratorio de Nutrigenómica, 4ta etapa, ICSa, UAEH, Carretera Actopan-Tilcuautila, Ex Hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. C.P. 42086