

Objetivo II: Biodisponibilidad humana y propiedades antiinflamatorias de los polifenoles de mango

(Comparación delgado y obeso durante 24 h, y 10 y 42 días)

Informe Final



Dr. Susanne Talcott (smtalcott@tamu.edu) and

Dr. Stephen Talcott (stalcott@tamu.edu)

Texas A&M University, Department of Nutrition and Food Science

1500 Research Parkway A

Centeq Research Plaza, Room 220F

College Station, TX 77843-2253

220K Centeq A

1500 Research Parkway

Teléfono: 979-458-1819

MS 2253

College Station, TX 77843-2253

Email: smtalcott@tamu.edu

Fax: 979-862-7944

Web: <http://nfsc.tamu.edu>

Resumen ejecutivo

Significado: Los mecanismos moleculares de los beneficios para la salud de los polifenoles de mango no están bien investigados. Los estudios in vitro no pueden investigar el papel de los metabolitos de los compuestos de mango. Con el fin de evaluar el papel de los metabolitos del mango en los beneficios para la salud, estamos investigando qué metabolitos se forman cuando comemos mango. Los resultados de este estudio muestran que hay cantidades significativas de metabolitos bioactivos de taninos de mango formados por el microbioma intestinal. Hay diferencias significativas entre las personas delgadas y obesas. Esto indica que no todos pueden beneficiarse por igual del consumo de mango y esto puede explicar las diferencias en los resultados que se observan en los ensayos de eficacia con mango. Los hallazgos de este estudio son muy significativos para entender cuánto mango deben consumir los individuos y que el consumo prolongado es más favorable para obtener beneficios. Esto ayudará al National Mango Board hacia el desarrollo de recomendaciones de ingesta de mango fresco.

En este objetivo se realizaron los siguientes estudios:

- 1. Estudio farmacocinético durante 10 días**
- 2. Estudio farmacocinético durante 42 días comparando sujetos delgados y obesos y continuos con consumo interrumpido**

- Farmacocinética de metabolitos de polifenoles de mango en plasma y orina
- Biomarcadores para el metabolismo microbiano
- Biomarcadores para la inflamación en sujetos delgados y obesos

1. Estudio farmacocinético durante 10-días:

La absorción de polifenoles de mango fue investigada en un estudio farmacocinético de 10 días en individuos sanos y delgados. Los resultados muestran que cantidades significativas de derivados de ácido gálico y derivados de pirogalol (metabolito microbiano) están presentes en la orina. Esto indica que los metabolitos se absorbieron en el torrente sanguíneo y esto incluye los metabolitos microbianos que se generaron en los intestinos por el microbioma intestinal. Después de 10 días, la excreción de los metabolitos de polifenoles de mango aumentó significativamente en todos los sujetos. Esto indica que un consumo prolongado aumenta la absorción de los metabolitos de polifenoles y el beneficio para la salud resultante puede ser mayor en comparación con un solo consumo.

2. Estudio farmacocinético durante 42-días comparando sujetos delgados y obesos y continuos con consumo interrumpido

a. Farmacocinética de metabolitos de polifenoles de mango en plasma y orina

Se evaluó la absorción, el metabolismo y la excreción de ácido gálico, glucósidos de galloyl y gallotaninos de frutos de mango en sujetos delgados y obesos que consumieron mango continuamente durante 42 días y se compararon con una cohorte de control que consumió mango solo los días 1 y 42. Voluntarios (n = 36, IMC 22-34) consumieron 400 g de pulpa de mango diariamente durante 42 días. Se observaron aumentos significativos (p <0,05) en su excreción urinaria de 24 h de ácido 3-O-sulfato de 4-O-metilgálico, sulfato de metilpirogolol, sulfato de pirogalol y sulfato de catecol. También se observaron aumentos en las concentraciones plasmáticas (AUC0-8h) de los metabolitos individuales. En general, las concentraciones de metabolitos fueron significativamente menores en los individuos obesos versus delgados y esto indica que los individuos obesos pueden tener dificultades en metabolizar y absorber los metabolitos de polifenoles. Como se esperaba, en la cohorte de control (n = 11, IMC

<25) que consumieron mango sólo en dos días diferentes, no continuos, días 1 y 42, no se encontraron aumentos en la excreción urinaria de 24 h o en las concentraciones plasmáticas de ninguno de los metabolitos de galloyl detectados en los días 1 y 42. El consumo de mango repetido y prolongado puede mejorar del metabolismo y la excreción basado en el aumento del metabolismo de los polifenoles por el microbioma intestinal.

La mayor generación de metabolitos microbianos bioactivos puede tener implicaciones significativas para los beneficios de salud derivados del consumo de mango. Parece que el consumo continuo de mango produciría el mayor beneficio basado en una mayor exposición a los metabolitos de polifenoles de mango.

b. Biomarcadores para el metabolismo microbiano

Después de seis semanas de consumo de mango, las concentraciones plasmáticas de metabolitos de galloyl aumentaron en todos los sujetos. El plasma en sujetos delgados contenía niveles 2,4 veces mayores de polifenoles en comparación con sujetos obesos, incluyendo los derivados microbianos de pirogalol. Como se muestra en qPCR, los niveles de microbiota productora de pyrogallol, *Aspergillus oryzae* y *Lactococcus lactis* fueron significativamente más bajos en sujetos obesos en comparación con los sujetos delgados en la línea de base, pero los niveles aumentaron en sujetos obesos para coincidir con los sujetos delgados después de seis semanas. Los niveles de *Bifidobacterium Spp.* no se modificaron significativamente, sino que se correlacionaron directamente con la cantidad de metabolitos de galloyl encontrados en el plasma ($p = 0,0243$, $r = 0,36$, correlación de Spearman). Los niveles de *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Clostridium leptum*, microbiota asociada con la obesidad, fueron significativamente mayores en sujetos obesos en comparación con los sujetos delgados en la línea de base, pero disminuyeron después de seis semanas de ingestión de mango para igualar los niveles observados en sujetos delgados. En sujetos obesos, las concentraciones plasmáticas de los marcadores de inflamación (AUC0-8h) de IL-8 y MCP-1 disminuyeron significativamente después de seis semanas, mientras que como se esperaba no hubo cambios en sujetos delgados. Las concentraciones plasmáticas (AUC0-8h) de IL-10 fueron significativamente mayores en sujetos delgados en comparación con sujetos obesos y correlacionadas con la cantidad de metabolitos encontrados en plasma ($p = 0,0218$, $r = 0,38$, correlación de Spearman). Estos resultados indican que los individuos obesos no presentan el mismo nivel de absorción adaptativa y metabolismo que los sujetos delgados, pero siguen beneficiándose de una disminución de citocinas pro-inflamatorias (IL-8 y MCP-1). Los cambios observados pueden deberse en parte a diferencias en la composición y metabolismo de la microbiota intestinal. Parece que el consumo continuo de mangos podría producir el mayor beneficio para las personas obesas y magras.

Beneficios para la industria del mango

Los beneficios potenciales de ácido gálico y pirogalol para la salud están bien documentados, pero hay poca información sobre los beneficios de sus metabolitos digestivos. La prevalencia de estos metabolitos en la orina y la falta de formas no conjugadas después del consumo del mango sugiere que los metabolitos del ácido y pirogalol gálico deben incorporarse en futuros estudios de eficacia de absorción, porque es probable que éstos puedan contribuir significativamente con beneficios para la salud.

Una mayor generación de metabolitos microbianos bioactivos puede tener implicaciones significativas para los beneficios a la salud provistos por el mango. Los derivados de galloyl del mango pueden tener un potencial terapéutico en la prevención y el tratamiento de la obesidad y los trastornos metabólicos. Se necesita más investigación para entender por qué los metabolismos y metabolitos son más bajos en sujetos obesos.

Las investigaciones realizadas resultaron en las siguientes comunicaciones de investigación:

Abstracts:

R Barnes, K Krenek, S Talcott, S Talcott. Profile of Gallic Acid Metabolites in Urine After the Intake of Mango (*Mangifera indica*, L.) cv. Keitt in Humans. Experimental Biology 2015, Boston

H Kim, R Barnes, C Fang, S Talcott, S Mertens-Talcott. Intestinal Microbiota and Host Metabolism Respond Differentially in Lean and Obese Individuals Following Six-Week Consumption of Galloyl Derivatives from Mango (*Mangifera Indica* L.) Pulp. Experimental Biology 2017, Chicago

C Fang, H Kim, R Barnes, S Talcott, S Mertens-Talcott. Daily Mango (*Mangifera Indica* L.) Consumption For 42 Days Differentially Modulates Metabolism And Inflammation In Lean And Obese Individuals. Experimental Biology 2017, Chicago

SU Mertens-Talcott, H Kim, S Talcott, R Barnes. Adaptation of Gallic Acid, Galloyl Glycoside, and Gallotannin Metabolism and Excretion after 42 Days of Mango (*Mangifera Indica* L.) Consumption. Experimental Biology 2017, Chicago

Manuscritos/publicaciones arbitradas:

R Barnes, K Krenek, S Talcott, S Talcott. Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and in vitro hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. Mol. Nutr. Food Res. 2016, 60, 542–550

En preparación:

R Barnes, H Kim, S Talcott, SU Mertens-Talcott. Adaptation of Gallic Acid, Galloyl Glycoside, and Gallotannin Metabolism and Excretion after 42 Days of Mango (*Mangifera Indica* L.) Consumption.

H Kim, R Barnes, S Talcott, SU Mertens-Talcott. Differential Microbial Gallotannin Metabolism and Excretion in Lean and Obese Subjects after 42 Days of Mango (*Mangifera Indica* L.) Consumption.

Chuo Fang, Hyemee Kim, Ryan C Barnes, Stephen T Talcott, Susanne U Mertens-Talcott. Daily Mango (*Mangifera Indica* L.) Consumption for 42 Days Differentially Modulates Metabolism and Inflammation in Lean and Obese Subjects.

Introducción:

Nuestro objetivo final es identificar y demostrar las propiedades químicas y bioquímicas de los mangos que permitirán comercializar mejor los mangos frescos. Esta investigación también sentará las bases para obtener reclamos legales y de comercialización relacionados con la composición y los beneficios para la salud del mango. Reconocemos que estas bases son fundamentales para construir un caso de trabajo sólido para estos objetivos futuros.

Antecedentes:

El mango es una fuente rica de polifenoles que ha demostrado ejercer propiedades anti-inflamatorias y anti-carcinógenas (1). El contenido polifenólico del mango se compone principalmente de ácido gálico, glucósidos de ácido gálico y galotaninas (2). Se informó previamente que el ácido gálico era absorbido del intestino delgado y metabolizado en el hígado, donde las enzimas endógenas de fase II catecol-O-metiltransferasa y sulfotransferasas lo conjugaban para producir predominantemente ácido 4-O-metilgálico y ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato (3). El ácido gálico no absorbido transitará al colon donde es catabolizado por las bacterias huésped para producir fenoles más pequeños, tales como pirogalol y catecol, que son absorbidos y metabolizados por el huésped (4). Sin embargo, las glucos y galotaninas de galloyl oligoméricas son demasiado grandes para ser absorbidas intactas en el intestino delgado y deben ser despolimerizadas por esterasas hidrolíticas que residen en el tracto

gastrointestinal o mediante hidrólisis no enzimática para generar ácido gálico bioaccesible (5). Así, la pulpa de mango es una fuente de varios compuestos de ácido pro-gálico con el potencial de producir metabolitos de galloyl y pyrogallol.

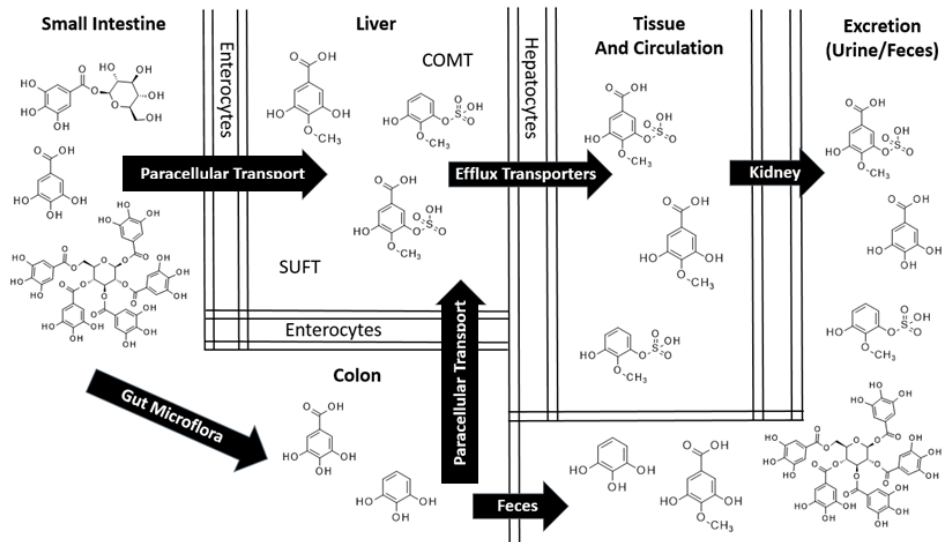


Figure 1 Estructuras químicas tentativas para los siete metabolitos de ácido gálico urinario caracterizados.

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus reuteri* y *Lactococcus lacti* son productores de tanasas bien conocidos presentes en la microbiota humana (6,7). Como resultado, estos son algunos de los principales metabolizadores de polifenoles de mango. Por lo tanto, la modulación de esta microbiota intestinal puede jugar un papel crítico en la absorción de los derivados del polifenol del mango. Ciertas enfermedades crónicas, como la obesidad y la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD por sus siglas en inglés), son bien conocidas por estar relacionadas con la composición de diferentes microbiota intestinal. Está demostrado que la biodisponibilidad y la farmacocinética de polifenoles y sus derivados se reduce significativamente en personas obesas (8). Por lo tanto, es importante investigar la absorción de los polifenoles del mango y su metabolismo en el sistema digestivo humano para determinar los beneficios generales para la salud que el mango puede ejercer. Además, es crucial determinar los efectos de los polifenoles en la microbiota intestinal y los marcadores antiinflamatorios, así como las diferencias entre los individuos delgados y obesos.

Objetivos: Los objetivos de esta investigación fueron evaluar a) los metabolitos urinarios producidos después del consumo de la pulpa de mango Keitt en un esfuerzo por caracterizar la biodisponibilidad de los polifenólicos mayores en mango durante un período de 10 días, así como b) el metabolismo y la excreción de ácido gálico y galloyl glucósidos y c) la modulación de la microbiota intestinal y los marcadores antiinflamatorios en individuos delgados y obesos después de 42 días de consumo de pulpa de mango Ataulfo.

Hipótesis: Se plantea la hipótesis de que el consumo de mango fresco conducirá a la absorción, metabolismo y excreción de ácido gálico y glucósidos de galloyl y que el consumo repetitivo de mango conducirá a un aumento en la concentración de metabolitos de ácido gálico debido a adaptaciones en el colon y el metabolismo xenobiótico. Además, la hipótesis de que la respuesta a la ingesta de mango será significativamente diferente entre las personas delgadas y obesas.

Significancia

El objetivo final es identificar y demostrar las propiedades químicas y bioquímicas de los mangos que permitirán comercializar mejor los mangos frescos. Esta investigación también sentará las bases para obtener reclamos legales y de comercialización relacionados con la composición y los beneficios para la salud del mango. Reconocemos que estas bases son fundamentales para construir un caso de trabajo sólido para estos objetivos futuros.

Enfoque del estudio:

Mango (cv. Keitt) 10 días de absorción de polifenoles: Once voluntarios sanos participaron en el estudio piloto de consumo de mango de 10 días. Después de un ayuno nocturno de al menos 12 horas, se hicieron recolecciones de orina (línea base) de cada participante. Cada participante recibió 400 g de mango para consumir y las recolecciones de orina se hicieron a 0-3, 3-6, 6-8 y 8-12 horas. Se registró el volumen de orina y se congeló inmediatamente una alícuota a -80 °C hasta el análisis. Los participantes recibieron 400 g de mango para consumir diariamente durante los próximos ocho días y el diseño del estudio se repitió de nuevo el día 10. El protocolo del estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB) de Texas A & M University. Todos los análisis se realizaron por HPLC-MS.

Consumo diario de mango (cv. Ataulfo) Pulpa durante 42 días: Los voluntarios sanos (n = 32, de 18 a 50 años) sin antecedentes clínicos de trastornos digestivos participaron en un estudio de consumo de mango de 42 días dividido en tres cohortes. La cohorte de control (n = 11) consumió 400 g de pulpa de mango sólo en los días 1 y 42. Las dos cohortes restantes consumieron 400 g de pulpa de mango diariamente durante 42 días y se dividieron en dos grupos: delgados y obesos. La cohorte de delgados (n = 12) tenía un Índice de masa corporal (IMC) de 18 a 25 y la cohorte de obesos (n = 9) tenía un IMC > 30. Tres días antes del inicio del estudio, los sujetos se abstuvieron de consumir alimentos que contenían ácido gálico o pro Polifenoles de ácido gálico, incluyendo mango, productos de uva, té, chocolate y bayas. Se recogieron muestras de orina basal antes del consumo de mango y post-prandial de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 y 12-24 h y en los días 1 y 42 de estudio. Se midió el volumen de salida de orina para cada colección, y 12 mL acidificados con 0,1 mL de ácido fórmico al 88% y pasados a través de un filtro de 0,45 µm fueron usados para un análisis de metabolitos por LC-MS. Las muestras de sangre de la línea base fueron recolectadas antes del consumo de mango y posprandiales a 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 y 8 h mediante un catéter de extracción de sangre en los días 1 y 42. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.000 Xg durante 5 min, y se acidificó el plasma con 25 µl de ácido fórmico. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta que se procesaron. En pocas palabras, se incubaron 50 µl de un galato de etilo, estándar interno, con 500 µl de plasma acidificado y luego se añadieron 75 µL de SDS al 10% para desnaturalizar las proteínas seguido por la adición de 400 µl de metanol al ácido fórmico al 0,1%. El plasma se sonicó durante 10 min, se centrifugó durante 5 min a 10.000 x g y se añadió con 50 µl de KCl saturado para eliminar SDS residual. Las muestras se mantuvieron a 4 °C durante 1 h antes de ser filtradas a través de un filtro de 0,45 µm antes del análisis de LC-MS. El protocolo del estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB) de Texas A & M University.

Análisis de LC-MS: Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa iónica LCT Deca XP Max MSn de Thermo Finnigan equipado con una fuente de ESI. Las separaciones se realizaron en fase inversa utilizando un Thermo Finnigan Surveyor HPLC acoplado a un detector Surveyor PDA y las separaciones de gradiente se realizaron usando una columna Phenomenex KinetexTM (Bannockburn, Ill) C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm) a temperatura ambiente. Las inyecciones se hicieron en la columna mediante el uso de un bucle de muestra de 50 µl. Para la separación de los metabolitos de orina, la fase móvil A: 0,1% de ácido fórmico en agua y la fase móvil B: 0,1% de ácido fórmico en metanol se hicieron funcionar a 0,4 ml / min. Se llevó a cabo un gradiente de 0% de fase B durante 2 min y se

cambió a 10% de fase B en 4 min, 10 a 15% de fase B en 8,5 min, 15% a 27% de fase B en 11 min, 27% a 90% de fase B en 15 minutos, el 90% se mantuvo a 0,5 min antes de volver a las condiciones iniciales. Para la separación de los metabolitos plasmáticos, la fase móvil A era ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B era ácido fórmico al 0,1% en metanol a 0,45 ml / min. Se llevó a cabo un gradiente de 0% de Fase B durante 2 min y se cambió a Fase B al 10% en 4 min, se mantuvo Fase B al 10% a 10 min, 10 a 40% Fase B en 25 min y Fase 40% a 65% B en 35 min, 65% a 85% Fase B en 41 min, 85% se mantuvo a 49 min antes de volver a las condiciones iniciales. La interfaz de electrospray funcionó en modo de ionización negativa. Las temperaturas de origen y capilar se fijaron a 325 °C, el voltaje de la fuente fue de 4,0 kV, el voltaje capilar se estableció a -47 V, y la energía de colisión para el análisis MS / MS se estableció a 35 eV. El instrumento funcionó con caudales de gas de vaina y gas auxiliar (N₂) ajustados a 10 unidades / min y 5 unidades / min, respectivamente. El instrumento se sintonizó para el ácido 4-O-metilgálico y los metabolitos se cuantificaron utilizando cromatogramas de iones extraídos de sus respectivos compuestos progenitores como patrones.

qPCR: El ADN bacteriano se extrajo de 100 mg de muestra fecal usando un procedimiento de fenol-cloroformo que batió las bolas. Se llevaron a cabo otros pasos de extracción y purificación de ADN utilizando un mini kit de taburetes QIAamp ADN (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los siguientes ensayos de qPCR para grupos bacterianos seleccionados se realizaron para determinar los niveles de productores de tanosa y la microbiota intestinal relacionada con la obesidad. La decisión de apuntar sólo a un subconjunto de grupos bacterianos se basó en el trabajo anterior del autor (9). Las condiciones de PCR en tiempo real, las secuencias de cebadores y la temperatura de hibridación se siguieron como se describe en (10). Los datos de qPCR se expresaron como cantidad logarítmica de ADN normalizado ala cantidad de registro de ADN bacteriano total (Universal F341 y R518) (10).

Ensayo de perlas multiplex: Se cargó extracto de proteína (50 µg) para determinar la abundancia relativa de citoquinas (TNF α , IL-1 β , IL-6) utilizando los kits de multiplexación (Millipore, Billerica, MA). El análisis de multiplex se llevó a cabo por el Luminex L200 instrumento (Luminex, Austin, TX), y los datos fueron analizados utilizando el software Luminex xPONENT 3 (11).

Análisis estadísticos: Las diferencias significativas para los metabolitos en la orina se calcularon a partir de la suma de sus excreciones a lo largo de 24 h utilizando la prueba t de Student en el programa Sigma Plot (SPSS, Chicago, IL). Las diferencias significativas entre las cohortes se calcularon utilizando ANOVA. El análisis farmacocinético no compartimental se realizó mediante el complemento Microsoft Excel de PkSolver. Los resultados se informan a la media \pm error estándar de la media.

Resultados

Mango (cv. Keitt) 10 Día Polyphenol Absorción

Este estudio investigó la presencia de metabolitos de polifenoles de mango en la orina porque cualquier polifenol de mango que ha sido absorbido eventualmente será excretado a través de la orina. Por primera vez siete metabolitos urinarios procedentes de ácido gálico y pirogalol se caracterizaron y cuantificaron tras el consumo de mango (Figura 1).

De los 7 metabolitos encontrados en los compuestos de orina se cree que M2 y M3 han sido absorbidos en el intestino delgado. Esto es debido al hecho de que ambos todavía tienen el ácido o (COOH) todavía unido a ellos. Los compuestos M1 y M4-M7 faltan este grupo. Se piensa que este grupo ácido se utiliza como fuente de carbono por microflora en el colon. Todos estos compuestos son diferentes de los compuestos progenitores que se encontraron en el fruto. Después de 10 días de consumo de mango, no se encontró diferencia significativa (p

<0,05) en la excreción de los metabolitos urinarios M2 y M3 entre los días 1 y 10 (Figura 2). En general, el análisis de orina reveló que el 43 al 54% de la administración oral de ácido gálico fue absorbido, metabolizado y eliminado como M2 y M3.

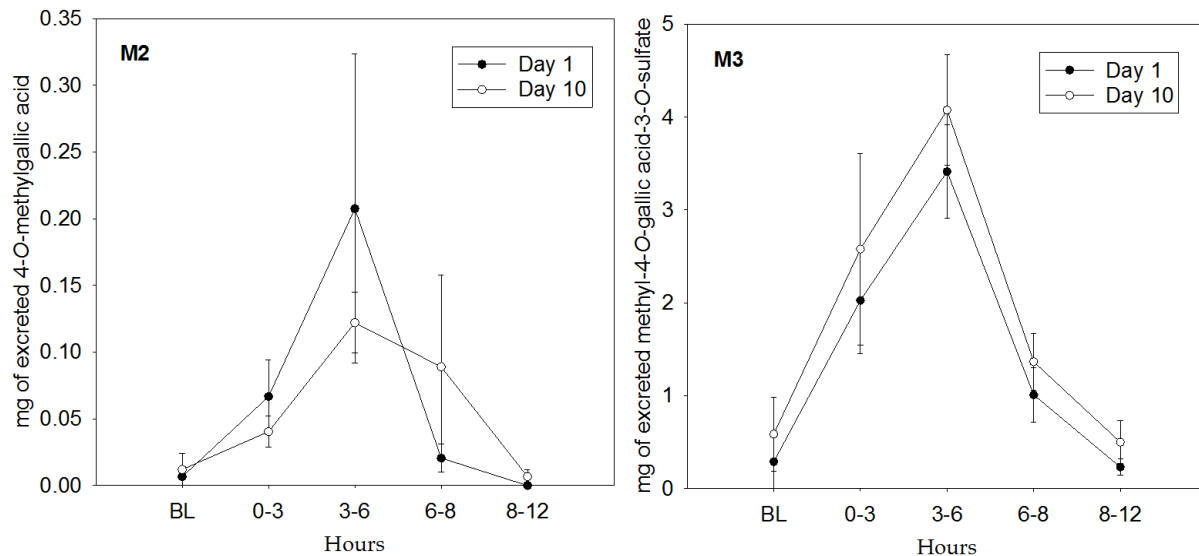


Figure 2. Excreción en mg de los metabolitos El ácido 4-O-metilgálico (M2) y el ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato (M3) al inicio (BL), 0-3, 3-6, 6-8, Y 8-12 h después del consumo de 400 g de mango cv. Keitt durante los días 1 y 10.

Los cinco metabolitos restantes (M1 y M4-M7) se caracterizaron como conjugados de pirogalol. El pirogalol no se encuentra naturalmente en el mango, pero se sabe que es producido a partir de ácido gálico que reacciona con las enzimas expresadas por la microbiota intestinal donde puede ser absorbida y metabolizada(12,13). Dentro de las 12 h después de la ingesta de pulpa de mango, M5 y M6 constituyeron la mayoría de los metabolitos urinarios excretados y juntos promediaron 64.3% y 65.5% para el día 1 y 10 respectivamente. La excreción urinaria de los cinco metabolitos tuvo una tendencia a aumentar en el día 10 en comparación con el día 1 con aumentos significativos ($p < 0,05$) para los metabolitos M5 y M6 (Figura 3). La cantidad total de M5 excretada aumentó de $28,5 \pm 2,84$ mg a $55,4 \pm 7,10$ mg, en los días 1 y 10 respectivamente, y la cantidad total de M6 excretado aumentó de $23,6 \pm 1,56$ mg a $47,7 \pm 3,39$ mg.

Consumo diario de mango (cv. Ataulfo) Pulpa durante 42 días

Se evaluó la excreción urinaria de los metabolitos de fase II derivados del derivado de galloyl tras el consumo de 400 g de pulpa de mango Ataulfo en sujetos delgados y obesos que consumieron mango diariamente durante 42 días y en comparación con una cohorte de Control que sólo consumió mango los días 1 y 42. Siete ácido gálico y pirogalol basada en la fase II de los metabolitos se identificaron tentativamente en la orina de m / z previamente informado (Figura 1). Los 400 g de pulpa suministrados a los sujetos contenían un total de 259 mg de derivados de galilo, de los cuales 95,4 mg no eran taninos, incluyendo ácido gálico (3,64 mg) y monogalloylglucosa (91,7 mg) y los restantes 164 mg eran galotaninas que variaban en Grado de polimerización de 5-10 grupos galoyl. La pulpa de mango contiene una mayoría de polifenoles de ácido pro-gálico y pueden comprender más del 50% de los fitoquímicos totales presentes (14). Cinco de los siete metabolitos, el ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato (M3), pirogalol-O-sulfato (M5), catecol-O-sulfato (M6) y dos isómeros de metilpirogalol-O-sulfato I y II (M4, M7) se midieron en la orina hasta 24 h post-prandial. En la cohorte de delgados, se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la excreción de todos los metabolitos cuantificables (Figura 4). Específicamente, la excreción acumulada de 24 h de M3 aumentó de

10,6 ± 2,38 a 36,13 ± 5,53 mg, M5 de 14,3 ± 1,50 a 57,8 ± 5,37 mg, M4 de 8,58 ± 1,16 a 40,3 ± 9,51 mg, M7 de 8,40 ± 1,43 a 50,3 ± 8,00 y M6 de 21,7 ± 2,90 a 96,3 ± 12,8 mg entre los días 1 y 42,

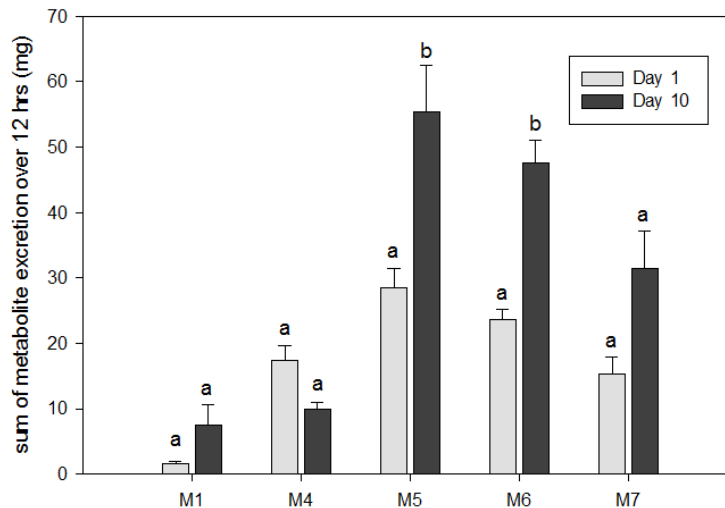


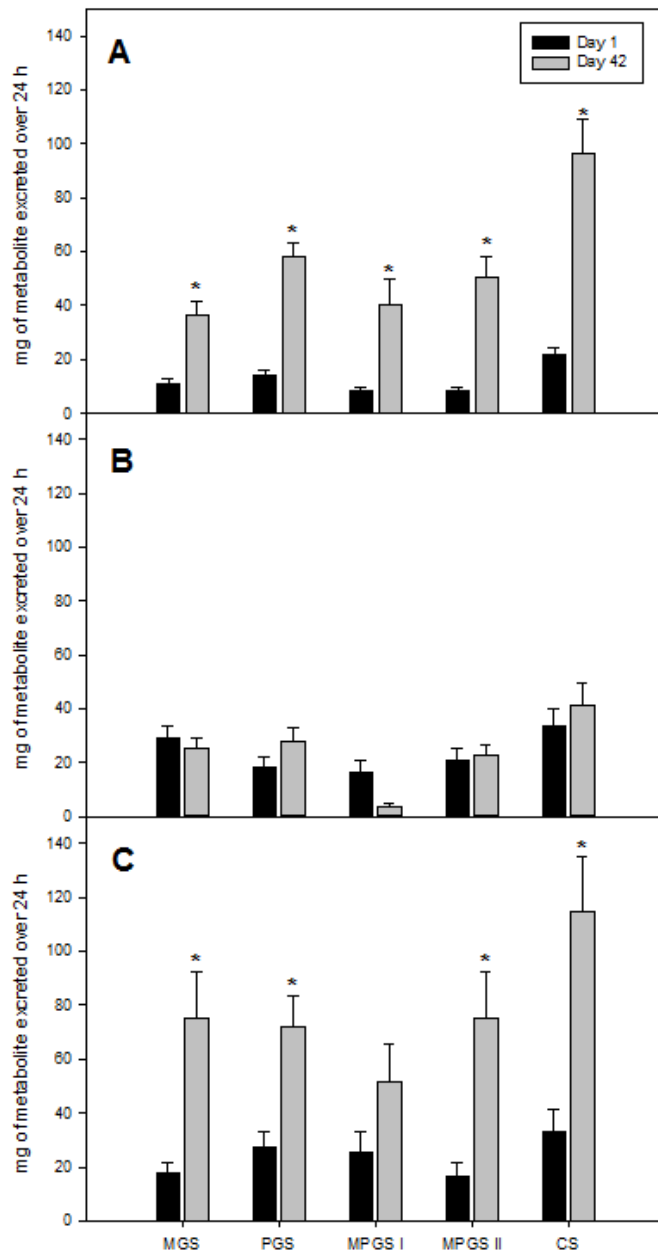
Figure 3. La suma de la excreción de metabolitos en mg para los metabolitos pirogalol-1-O-glucurónico (M1), O-metilpirogallol-O-sulfato (M4, M7), pirogalol-O-sulfato (M5), desoxipiragalol-O-sulfato (M6) después del consumo de 400 g de mango cv. Keitt

respectivamente. El mismo aumento en la excreción urinaria de 24 h se observó en la cohorte de obesos para todos los metabolitos cuantificables excepto M4, que se encontró que tenía un aumento insignificante de $22,1 \pm 5,70$ a $45,7 \pm 11,1$. En la cohorte Control, no se observó diferencia en la excreción urinaria para los metabolitos de galloyl con la excepción de M4, que fue menos excretada al día 42 comparado con el día 1 (Figura 4; $p < 0,05$).

Se ha planteado la hipótesis de que el aumento del metabolismo y excreción de galloyl se debe a cambios en la composición de la microbiota intestinal de los sujetos. Se ha demostrado previamente que la ingesta polifenólica repetitiva afectará la composición de la microbiota intestinal de los huéspedes, como un aumento en el tamaño de la población de las especies de bacterias probióticas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. (15,16) El día 1 de este estudio, la excreción urinaria total de todos los metabolitos de galloyl correspondió al 24,3% de los 259 mg de derivados de galloyl consumidos en la cohorte de delgados y el 45,2% en la cohorte de obesos. Los galotaninos son mal absorbidos por el intestino delgado en comparación con polifenoles de menor peso molecular, como el ácido gálico, y se supone que se transfieren al colon y se hidrolizan por la microbiota para crear ácido gálico, pirogalol y catecol por organismos tales como *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus galloyliticus*. (17) Hipotetizamos que el día 1 los sujetos no serían completamente adeptos a la hidrólisis de galotaninos, pero con el tiempo la microbiota se aclimató selectivamente para utilizar los galotaninos como fuente de energía y produjo mayores concentraciones de metabolitos de galloyl absorbibles. Los aumentos significativos en la excreción urinaria total en las cohortes Delgada y Obesa desde el Día 1 al Día 42 apoyan la hipótesis ya que la excreción urinaria de 24 horas de derivados de galloyl aumentó a 107 y el 130% de la dosis de derivados de galloyl alimentados.

Cinco metabolitos de galloyl fase II, ácido 4-O-metilgálico (M2), ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato (M3), pirogalol-O-sulfato (M5), metilpirogallol-O- Y el catecol-O-sulfato (M6), se caracterizaron y semi-cuantificaron en plasma hasta 8 h post-prandial tras el consumo de mango Ataulfo (Tabla 9). En contraste con la mayor excreción urinaria observada en las

cohortes de Delgados y Obesos después de 42 días de consumir 400 g de mango no se observó aumento significativo basado en el AUC0-8h para los metabolitos individuales del plasma (Tabla 1). Sin embargo, se observó una tendencia de incrementos insignificantes para todos los metabolitos individuales en la cohorte de Delgados, junto con incrementos no



significativos para el sulfato de catecol-O-sulfato y ácido 4-O-metilgálico en la cohorte Obeso, donde los coeficientes de variación altos entre los sujetos (variaron desde 32 - 118%) mantuvo las comparaciones de ser significativo. Los altos coeficientes de variación se informan con frecuencia para las investigaciones de metabolómica polifenólica y se supone que se deben a diferencias en las composiciones de microbiota intestinal por sujeto.(18) La falta de acumulación significativa de ácido gálico o sus metabolitos en sangre observada tanto en este estudio como en otros es probablemente el resultado de su rápido metabolismo y excreción. No se sabe exactamente cómo la excreción rápida de estos metabolitos afecta los beneficios potenciales para la salud del consumo de glucósidos de ácido gálico y galotaninas. Aunque los estudios que han investigado la bioeficacia del consumo habitual de ácido pro-gálico y alimentos pro-pirogalol como las fresas, frambuesas, uvas y té han reportado beneficios como la reducción de biomarcadores pro-inflamatorios, sin embargo, los mecanismos exactos permanecen desconocidos. (19,20)

Figura 4. La suma de la excreción urinaria en mg para los metabolitos 4-O-ácido metilglásico-3-O-sulfato (MGS), pirogalol-O-sulfato (PGS), dos isómeros de metilpyrogallol-O-sulfato (MPGS) Y catecol-O-sulfato (CS) después del consumo de 400 g de mango cv. Ataulfo para los días 1 y 42 en la (A) Delgados y (C) Obesos cohortes que consumieron mango diariamente durante 42 días y la (B) Cohorte de control que consumió mango sólo en los días 1 y 42. A (*) designa una diferencia significativa Entre los días 1 y 42 para el respectivo metabolito.

Tabla 1. Área bajo la curva (AUC) de 0 a 8 h de metabolitos de fase II procedentes de ácido gálico y glucósidos de galloyl después del consumo diario de mango cv. Ataúlfo durante 42 días en Cohortes DelgadoLean y Obeso, y comparado con sujetos que consumieron mango solo en los días 1 y 42, Cohorte de Control.

Metabolitos	Control Cohorte AUC _{0-8h} (µg/L · h)		Delgado Cohorte AUC _{0-8h} (µg/L · h)		Obeso Cohorte AUC _{0-8h} (µg/L · h)	
	Dia 1	Dia 42	Dia 1	Dia 42	Dia 1	Dia 42
4-O-methylgallic acid (M2)	527 ± 108	515 ± 300	431 ± 233	1,430 ± 760	585 ± 227	504 ± 96.3
4-O-methylgallic acid-3-O-sulfate (M3)	4,440 ± 1,140	5,110 ± 1,450	3,390 ± 487	4,410 ± 728	1,120 ± 299	1,729 ± 457
pyrogallol-O-sulfate (M5)	5,010 ± 1,580	2,290 ± 317	5,120 ± 1,430	6,830 ± 1,880	1,380 ± 496	1,010 ± 397
methylpyrogallol-O-sulfate (M4)	4,680 ± 1,380	2,303 ± 298	2,710 ± 562	4,920 ± 1,260	3,550 ± 894	3,440 ± 1,130
catechol-O-sulfate (M6)	9,420 ± 3,350	7,790 ± 2,200	8,790 ± 1,920	11,800 ± 3,060	7,318 ± 1,980	10,720 ± 1,790

Tabla 2. Características basales y de 6 semanas de la antropometría y la presión arterial en sujetos suplementados con mango.

Variable	Grupo	Delgado (n=12)			Obseso (n=9)		
		Semana 0	Semana 6	p value	Semana 0	Semana 6	p value
Sexor	Mujer	25%			55.56%		
	Hombre	75%			44.44%		
Edad (Anos)	Promedio	25.58			27.78		
	SD	(4.23)			(8.30)		
Altura (cm)	Promedio	172.58			168.34		
	SD	(5.96)			(12.06)		
Peso (kg)	Promedio	68.19	68.57	0.70	98.47	98.08	0.31
	SD	(7.24)	(7.29)		(17.57)	(17.40)	
IMC (kg/m ²)	Promedio	22.87	22.94	0.49	34.60	34.49	0.33
	SD	(2.22)	(2.39)		(4.89)	(4.58)	
Pulso (BPM)	Promedio	71.33	66	0.08	77.78	75.67	0.39
	SD	(14.35)	(11.17)		(10.22)	(9.68)	
Temperatura Cuerpo (°C)	Promedio	36.72	36.66	0.29	36.46	36.44	0.40
	SD	(0.32)	(0.39)		(0.32)	(0.27)	
Saturación Oxígeno (%)	Mean	98.09	98.08	0.50	97.25	98	0.05
	SD	(0.94)	(1.08)		(1.16)	(1.22)	
Presión sanguínea Systolic (mmHg)	Promedio	119.83	115.4	0.05	119.22	123	0.78
	SD	(13.16)	(12.33)		(16.93)	(13.36)	
Presión sanguínea Diastolic (mmHg)	Promedio	74.08	76.67	0.73	83.89	80.78	0.20
	SD	(12.75)	(7.80)		(11.05)	(6.06)	

Seis semanas de consumo de mango disminuyeron la presión arterial sistólica (media ± DE: 119.83 ± 13.16 vs. 115.42 ± 12.33; p <0.05) en sujetos delgados, pero no tuvieron efecto significativo en sujetos obesos (Tabla 2).

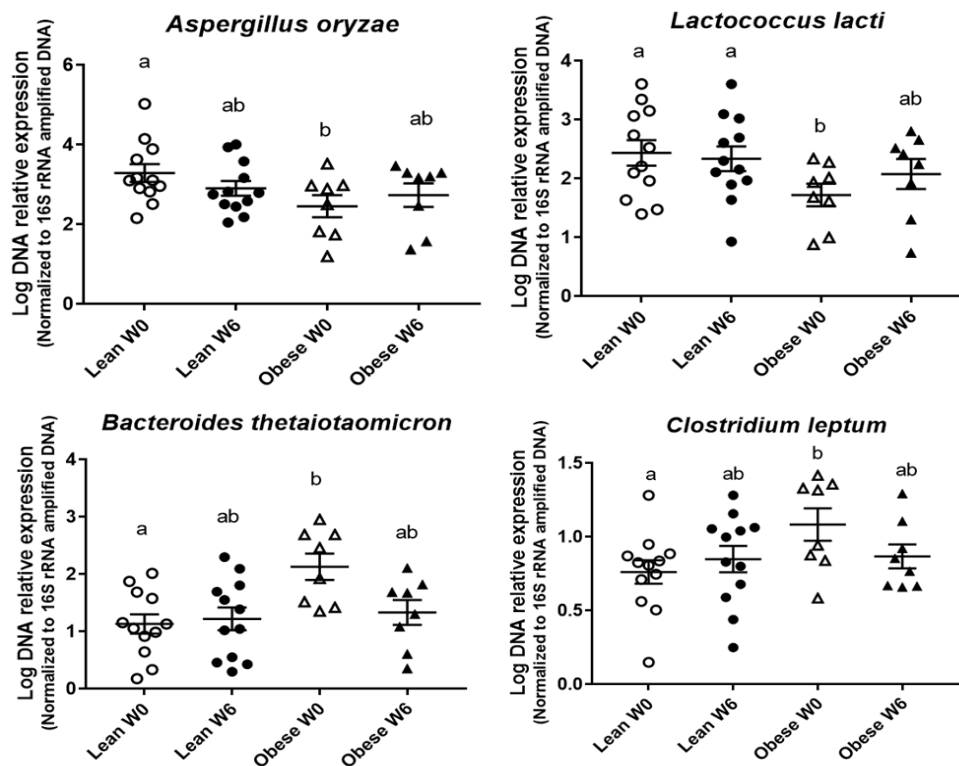


Figura 5. Efecto de la ingesta de mango sobre la composición de la microbiota en individuos delgados y obesos.

Los niveles de microbiota productora de pirogalol, *Aspergillus oryzae* y *Lactococcus lactis* fueron significativamente más bajos en sujetos obesos en comparación con los sujetos delgados en la línea de base, pero los niveles aumentaron en sujetos obesos para coincidir con los sujetos delgados después de seis semanas. Los niveles de *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Clostridium leptum*, microbiota asociada con la obesidad, fueron significativamente mayores en sujetos obesos en comparación con los sujetos delgados en la línea de base, pero disminuyeron después de seis semanas de ingestión de mango para igualar los niveles observados en sujetos delgados.

El nivel de hemoglobina A1c fue ligeramente mejor en sujetos obesos pero no en sujetos delgados. La reducción de la expresión de PAI-1, asociada con un menor riesgo de arteriosclerosis y trombosis, se observó en ambos grupos (En grupo pobre, media \pm DE: $30,93 \pm 18,12$ vs $23,69 \pm 17,58$, $p < 0,1$; ; $31,34 \pm 8,09$ frente a $24,93 \pm 12,20$, $p < 0,05$). Hubo una tendencia no significativa hacia niveles bajos de proteína C reactiva, y niveles elevados de IL-10 en ambos grupos (**Tabla 3**).

En sujetos obesos, las concentraciones plasmáticas (AUC0-8h) de IL-8 y MCP-1 disminuyeron significativamente después de seis semanas, mientras que no hubo cambios en sujetos delgados. Las concentraciones plasmáticas (AUC0-8h) de IL-10 fueron significativamente más altas en sujetos delgados en comparación con sujetos obesos y correlacionadas con la cantidad de metabolitos encontrados en plasma ($p = 0,0218$, $r = 0,38$, correlación de Spearman).

Tabla 3. Niveles plasmáticos de citocinas inflamatorias y hormonas metabólicas

Variable	Grupo	Delgado			Obeso			p value		
		Seman a 0	Seman a 6	P value	Sema na 0	Week 6	P value			
<i>Biomarcadores antiinflamatorios biomarkers</i>										
TNF- α (pg/mL)	Promedio SD	1.28 0.58	1.17 0.40	0.40	1.47 0.59	1.22 0.52	0.25	-0.11 0.65	-0.25 0.75	0.72
IL-1 β (pg/mL)	Ppromedio SD	0.01 0.03	0.08 0.11	0.06	0.02 0.03	0.07 1.47	0.13	0.06 0.12	0.06 0.12	0.91
IL-6 (pg/mL)	Promedio SD	0.80 0.63	0.94 0.50	0.18	0.63 0.24	0.65 0.23	0.60	0.13 0.48	0.02 0.38	0.75
IL-8 (pg/mL)	promedio SD	2.81 1.43	2.49 1.52	0.15	1.60 1.42	1.80 1.39	0.85	-0.33 1.30	0.20 0.69	0.10
IL-10 (pg/mL)	Promedio SD	3.43 1.72	4.25 2.98	0.32	1.83 0.92	2.02 0.49	0.20	0.81 2.49	0.19 0.81	0.78
IFN γ (pg/mL)	Promedio SD	0.40 0.22	0.60 0.41	0.06	0.20 0.24	0.32 0.35	0.10	0.21 0.49	0.12 0.37	0.89
MCP-1 (pg/mL)	Promedio SD	105.0 52.47	112.2 36.23	0.77	68.10 49.13	61.34 56.06	0.28	7.20 58.77	-6.76 32.71	0.39
<i>Biomarcadores cardiovasculares</i>										
C-React Protein (mg/L)	Promedio SD	2.96 4.32	1.43 1.16	0.23	17.73 19.37	14.96 15.82	0.37	-1.53 3.79	-2.77 14.39	0.92
<i>Biomarcadores hormonales</i>										
Ghrelin (pg/mL)	promedio SD	8.94 4.39	9.70 6.94	0.77	7.43 1.84	7.86 2.15	0.46	0.76 5.42	0.43 2.22	0.50
Adipone ctin (μ g/mL)	promedio SD	19.06 11.40	21.15 13.17	0.81	15.59 10.57	12.79 9.08	0.02	2.10 7.27	-2.80 2.82	0.04
Leptin (ng/mL)	Promedio SD	3.31 2.58	4.42 2.94	0.01	15.97 6.24	17.75 7.32	0.82	1.12 1.66	1.77 8.98	0.14
Resistin (ng/mL)	Promedio SD	20.59 5.01	19.69 1.37	0.35	32.68 15.22	33.75 21.88	0.63	-0.91 4.64	1.07 11.37	0.53
PYY (pg/mL)	promedio SD	23.56 15.58	24.64 12.38	0.55	15.32 10.46	22.11 9.05	0.90	1.07 17.86	6.79 13.86	0.36
PAI-1 (ng/mL)	Promedio SD	30.93 18.12	23.69 17.58	0.09	31.34 8.09	24.93 12.20	0.05	-7.24 14.82	-6.41 8.19	0.93
C-Peptide (ng/mL)	Promedio SD	0.46 0.39	0.51 0.23	0.63	0.81 0.32	1.04 0.48	0.04	0.05 0.41	0.24 0.37	0.48
GIP (pg/mL)	Promedio SD	4.99 4.11	9.46 6.37	0.04	10.82 9.54	9.87 7.12	0.42	4.47 7.70	-0.95 7.64	0.16
Glucose (pg/mL)	Promedio SD	73.16 8.64	72.06 8.83	0.26	77.57 9.60	80.51 13.88	0.73	-1.10 5.40	2.93 11.81	0.57
Insulin (pg/mL)	promedio SD	318.9 239.4	303.3 172.9	0.58	485.9 165.9	506.2 316.2	0.5	- 15.60 182.7	20.35 242.3	1.00
HbA1c (mmol/mol)	Promedio SD	12.28 4.49	11.65 5.07	0.62	17.53 6.09	14.35 7.04	0.06	-0.63 5.29	-3.17 6.23	0.26

Una prueba de rango firmada por Wilcoxon para comparaciones de diferencias apareadas se utiliza para comparar las mediciones de la semana 0 a la semana 6 dentro de cada grupo. Para cada variable se obtiene la diferencia semanal6-semana0 para cada sujeto. Una prueba exacta de Wilcoxon Mann Whitney se utiliza para comparar el grupo pobre con el grupo obeso. P <0,05 muestra una diferencia significativa dentro de / entre los grupos.

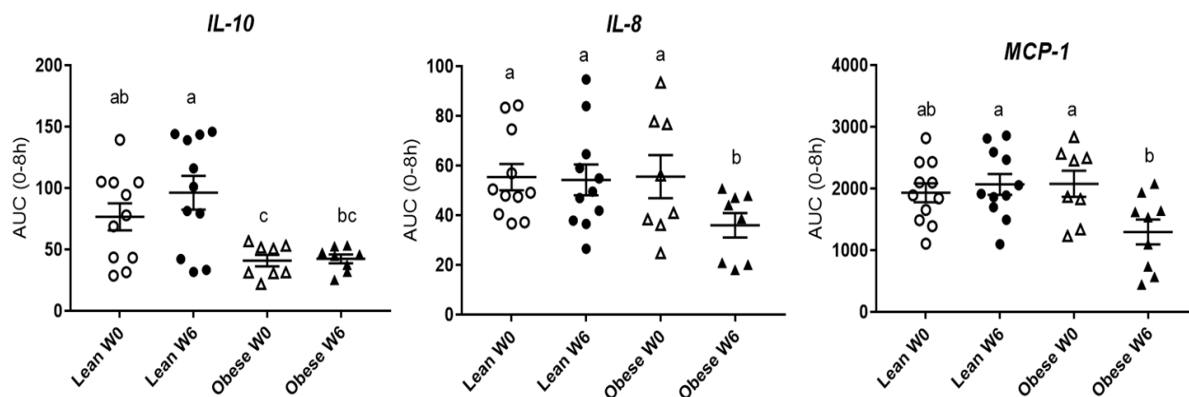


Figura 6. Efecto de la ingesta de mango en el AUC de marcadores inflamatorios en individuos delgados y obesos.

Resumen:

Tanto el ácido gálico como la monogaloiilglucosa son capaces de producir cantidades similares de los metabolitos de fase II, ácido 4-O-metilgálico y ácido 3-O-sulfato de 4-O-metilgálico. La presencia de ácido gálico y metabolitos de pirogalol en la orina humana tras el consumo de 400 g de mango Keitt indica la absorción, el metabolismo y la excreción de los derivados de galloyl de mango. El metabolismo del colon produjo cinco metabolitos adicionales de GA con pirogalol-O-sulfato y catecol-O-sulfato identificado como el más prevalente con significativamente más excreción después de 10 días de consumo de mango.

Se evaluó la excreción urinaria y las concentraciones plasmáticas de los metabolitos de fase II procedentes del mango ácido gálico, galoylglicósidos y galotaninos en sujetos obesos y delgados que consumían mango diariamente durante 42 días y comparados con los sujetos que consumieron mango solo los días 1 y 42. En las cohortes de delgados y obesos, se encontraron aumentos significativos en la excreción acumulativa de 24 horas de ácido 4-O-metilgálico-3-O-sulfato, metilpyrogallol-O-sulfato, pirogalol-O-sulfato y catecol-O-sulfato y se suponía que se debían a las adaptaciones en los sujetos de la microflora intestinal. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas individuales de estos metabolitos hasta las 8 h post-prandial. Se planteó la hipótesis de que los metabolitos de galloyl y pirogalol se excretan rápidamente y no se acumulan en el plasma. Los estudios que investigan los mecanismos de acción para los metabolitos de la fase II de galioil deben realizarse para ver si su bioeficacia se limita a un sitio específico de acción o a través de la regulación de las vías de señalización celular.

Los individuos obesos poseían niveles significativamente más bajos de microbiota intestinal productora de tanasa, así como niveles más altos de bacterias relacionadas con la obesidad en la línea de base que los individuos delgados. Después de 6 semanas de consumo diario de mango, los niveles de productores de tanasa no fueron significativamente diferentes en individuos obesos, pero ya no había una diferencia significativa entre los individuos delgados y obesos. Además, los marcadores inflamatorios no fueron significativamente diferentes después de 6 semanas de consumo de mango en comparación con la línea de base en individuos delgados. Sin embargo, los individuos obesos mostraron disminuciones significativas en la hemoglobina A1c y PAI-1, asociadas con un menor riesgo de arteriosclerosis y trombosis, y marcadores inflamatorios IL-8 y MCP-1 después de 6 semanas de consumo de mango en comparación con la línea de base.

Referencias

1. Noratto, G. D.; Bertoldi, M. C.; Krenek, K.; Talcott, S. T.; Stringheta, P. C.; Mertens-Talcott, S. U., Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *J Agric Food Chem* **2010**, *58*, 4104-12.
2. Krenek, K. A.; Barnes, R. C.; Talcott, S. T., Phytochemical composition and effects of commercial enzymes on the hydrolysis of gallic acid glycosides in mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Keitt') pulp. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 9515-21.
3. Pimpão, R. C.; Ventura, M. R.; Ferreira, R. B.; Williamson, G.; Santos, C. N., Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *British Journal of Nutrition* **2015**, *113*, 454-463.
4. Yasuda, T.; Inaba, A.; Ohmori, M.; Endo, T.; Kubo, S.; Ohsawa, K., Urinary Metabolites of Gallic Acid in Rats and Their Radical-Scavenging Effects on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 1444-1446.
5. Rodríguez, H.; Rivas, B. d. I.; Gómez-Cordovés, C.; Muñoz, R., Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry* **2008**, *107*, 664-670.
6. Ueda, S.; Nomoto, R.; Yoshida, K.; Osawa, R., Comparison of three tannases cloned from closely related *Lactobacillus* species: *L. Plantarum*, *L. Paraplantarum*, and *L. Pentosus*. *BMC microbiology* **2014**, *14*, 87.
7. Jiménez, N.; Esteban-Torres, M.; Mancheño, J. M.; de las Rivas, B.; Muñoz, R., Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and environmental microbiology* **2014**, *80*, 2991-2997.
8. Xu, L.; Liang, Y.; Chen, X.; Chen, B.; Han, Y.; Zhang, L., Hyperlipidemia affects the absorption, distribution and excretion of seven catechins in rats following oral administration of tea polyphenols. *RSC Advances* **2015**, *5*, 97988-97994.
9. Suchodolski, J. S.; Markel, M. E.; Garcia-Mazcorro, J. F.; Unterer, S.; Heilmann, R. M.; Dowd, S. E.; Kachroo, P.; Ivanov, I.; Minamoto, Y.; Dillman, E. M., The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS one* **2012**, *7*, e51907.
10. Noratto, G. D.; Garcia-Mazcorro, J. F.; Markel, M.; Martino, H. S.; Minamoto, Y.; Steiner, J. M.; Byrne, D.; Suchodolski, J. S.; Mertens-Talcott, S. U., Carbohydrate-free peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) juice affects fecal microbial ecology in an obese animal model. **2014**.
11. Kim, H.; Banerjee, N.; Ivanov, I.; Pfent, C. M.; Prudhomme, K. R.; Bisson, W. H.; Dashwood, R. H.; Talcott, S. T.; Mertens-Talcott, S. U., Comparison of anti-inflammatory mechanisms of mango (*Mangifera Indica* L.) and pomegranate (*Punica Granatum* L.) in a preclinical model of colitis. *Molecular Nutrition & Food Research* **2016**.
12. Stalmach, A.; Edwards, C. A.; Wightman, J. D.; Crozier, A., Identification of (Poly)phenolic Compounds in Concord Grape Juice and Their Metabolites in Human Plasma and Urine after Juice Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 9512-9522.
13. Calani, L.; Dall'Asta, M.; Derlindati, E.; Scazzina, F.; Bruni, R.; Del Rio, D., Colonic Metabolism of Polyphenols From Coffee, Green Tea, and Hazelnut Skins. *Journal of Clinical Gastroenterology* **2012**, *46*, S95-S99.
14. Krenek, K. A.; Barnes, R. C.; Talcott, S. T., Phytochemical Composition and Effects of Commercial Enzymes on the Hydrolysis of Gallic Acid Glycosides in Mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Keitt') Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 9515-9521.
15. Vendrame, S.; Guglielmetti, S.; Riso, P.; Arioli, S.; Klimis-Zacas, D.; Porrini, M., Six-Week Consumption of a Wild Blueberry Powder Drink Increases Bifidobacteria in the Human Gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 12815-12820.
16. Moreno-Indias, I.; Sanchez-Alcoholado, L.; Perez-Martinez, P.; Andres-Lacueva, C.; Cardona, F.; Tinahones, F.; Queipo-Ortuno, M. I., Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & Function* **2016**, *7*, 1775-1787.
17. López de Felipe, F.; de las Rivas, B.; Muñoz, R., Bioactive compounds produced by gut microbial tannase: implications for colorectal cancer development. *Frontiers in Microbiology* **2014**, *5*, 684.
18. Lee, M.-J.; Maliakal, P.; Chen, L.; Meng, X.; Bondoc, F. Y.; Prabhu, S.; Lambert, G.; Mohr, S.; Yang, C. S., Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-

gallate by humans formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2002**, *11*, 1025-1032.

19. Zern, T. L.; Wood, R. J.; Greene, C.; West, K. L.; Liu, Y.; Aggarwal, D.; Shachter, N. S.; Fernandez, M. L., Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr* **2005**, *135*, 1911-7.

20. Ellis, C. L.; Edirisinghe, I.; Kappagoda, T.; Burton-Freeman, B., Attenuation of Meal-Induced Inflammatory and Thrombotic Responses in Overweight Men and Women After 6-Week Daily Strawberry (*Fragaria*) Intake; A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **2011**, *18*, 318-327.