



POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

***Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida* como
agonistas duales de los receptores activados por
proliferadores de peroxisomas.**

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Bióloga Experimental Juana Erandi Ortiz Barragán

Ciudad de México, 2020.



I. COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor titular C

Departamento de Ciencias de la Salud D. C. B. S.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

jcap@xanum.uam.mx

Asesor interno

Dr. Rodolfo Velasco Lezama

Profesor titular C

Departamento de Ciencias de la Salud D. C. B. S.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

rodolfo_velasco2003@yahoo.com.mx

Asesor externo

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Profesor-Investigador Titular

Facultad de Farmacia

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

enoch@uaem.mx



El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el nivel consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020. Para la realización de los estudios de maestría la alumna Juana Erandi Ortíz Barragan contó con el apoyo de beca CONACyT con el número de CVU: 925332

Para la realización del proyecto se contó con el apoyo de CONACyT; FORDECYT-PRONACES (Ciencia de Frontera 377882/2020).



II. MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión del posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “*Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida* como agonistas duales de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas.”, con fecha de presentación para obtener el grado de maestría el día 23 de noviembre de 2020.

Dr. Rodolfo Velasco Lezama
Profesor-Investigador
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



PRESIDENTE

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Profesor-Investigador Titular
Facultad de Farmacia
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



SECRETARIO

Dr. Abraham Giacoman Martínez
Posdoctorante
CINVESTAV
Instituto Politécnico Nacional



VOCAL

Dra. Malinalli Brianza Padilla
Investigador en Ciencias Médicas C
Depto. Inmunología
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”



VOCAL

III. DEDICATORIA

A Leticia Barragan y Benito Ortiz, mis padres, guías y motor para seguir adelante. Por sus cuidados, amor y paciencia a lo largo de mi vida, por darme las herramientas necesarias, por el apoyo incondicional, por enseñarme a no rendirme y a superar mis propios límites.

A mis hermanos y sobrinos, por motivarme a ser un mejor ser humano, por estar siempre para mí y por tanto cariño.

A Jorge Campos Labastida, mi compañero de vida. Por tu amor, paciencia y dedicación, por creer en mí, por alentarme a salir de mi zona de confort e impulsarme a dar lo mejor, por retarme y con ello hacerme crecer como persona, por acompañarme y apoyarme en cada una de mis metas, por ser mi fortaleza. Te amo.



IV. AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Julio Almanza, por su amabilidad desde antes de iniciar este proyecto, por el tiempo dedicado, por sus valiosos comentarios, por su confianza, sus consejos y su amistad.

A mis asesores Dr. Samuel y Dr. Rodolfo por orientarme y apoyarme en el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. Iván Jasso, por transmitirme sus conocimientos, por todo su apoyo y amistad durante mis estudios de maestría.

A mis amigos y compañeros Fer, Jessi, Carlo, Luz, Ana, Wendy, Bety, Abraham, así como todos los miembros del laboratorio de farmacología y a mis compañeros de generación por hacer muy amenos cada uno de los días en este proceso.

Al laboratorio de biología molecular de UAM-I y al laboratorio de Farmacia de UAEM por las facilidades otorgadas durante mi estancia en maestría, así como también al CONACyT por la beca recibida durante este periodo.

Finalmente agradezco a las personas que por descuido y no por menos importante olvidé mencionar, pero que finalmente han sido parte de mi vida.



ÍNDICE

I. COMITÉ TUTORAL	3
II. MIEMBROS DEL JURADO	5
III. DEDICATORIA	6
IV. AGRADECIMIENTOS.....	7
VI. ABREVIATURAS	11
VII. ÍNDICE DE GRÁFICAS	16
VIII. ÍNDICE DE FIGURAS	17
IX. INDICE DE TABLAS.....	17
X. RESUMEN	18
XI. ABSTRACT.....	20
XII. INTRODUCCIÓN	22
<i>Definición</i>	22
<i>Criterios diagnósticos de la DM</i>	23
<i>Epidemiología</i>	24
<i>Clasificación</i>	25
<i>Fisiopatología y complicaciones vasculares</i>	25
<i>Complicaciones crónicas no clásicas</i>	28
<i>Tratamiento farmacológico de la DM</i>	29
Biguanidas.....	29
Sulfonilureas.....	30



Incretinas.....	31
Agonistas de GLP-1R.....	31
Inhibidores de DPP-4.....	32
Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2).....	33
Los inhibidores de la α-glucosidasa.....	33
Análogo sintético de amilina (pramlintida).....	33
Tiazolidinedionas (TZD).....	34
Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.....	35
PPAR en el metabolismo de los lípidos.....	37
PPAR en la homeostasis de la glucosa.....	37
PPAR en el metabolismo del colesterol.....	38
PPAR en el tejido adiposo.....	38
PPAR en el músculo.....	39
Papel de PPARs en inflamación.....	40
XIII. ANTECEDENTES.....	41
Tagetes lucida.....	41
Género <i>Smilax</i>.....	43
<i>Smilax domingensis Willd.</i>	43
<i>Smilax cordifolia</i>	44
XIV. JUSTIFICACIÓN.....	45
XV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	47
XVI. HIPOTESIS.....	47
XVII. OBJETIVOS.....	47



OBJETIVO GENERAL	47
OBJETIVOS PARTICULARES.....	47
XVIII. METODOLOGÍA.....	48
Experimentos <i>in vivo</i>	48
Experimentos <i>in vitro</i>	52
Funcionalidad celular.....	52
Cultivo celular.....	52
Extracción del RNA total.....	53
Reacción en cadena de la polimerasa en “tiempo real” (PCR)	53
Tinción de rojo oleoso para determinación de acumulación de lípidos.....	55
Análisis Fitoquímico	50
Fenoles y Flavonoides.....	50
Taninos	51
Esteroles	50
Alcaloides.....	51
Triterpenos.....	51
Saponinas.....	50
Análisis Estadístico.....	55
XIX. RESULTADOS.....	56
XX. DISCUSIÓN	69
XXI. CONCLUSIÓN.....	77
XXII. PERSPECTIVAS.....	78
XXIII. REFERENCIAS.....	79



VI. ABREVIATURAS

20-HETE: ácido 20-hidroxiicosatetraenoico.

8-HETE: ácido 8-hidroxiicosatetraenoico.

ABCA1: El transportador de casete de unión a ATP A1.

ADA: Asociación Americana de diabetes.

ADIPO1: Receptor de Adiponectina 1.

ADIPO2: Receptor de Adiponectina 2.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADP: Adenosin bifosfato.

AGL: ácidos grasos libres.

Akt: o quinasa B fosforilada por la quinasa PDK1. AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

AMPK: Proteína Cinasa dependiente de AMPc.

aP2: ácidos grasos adipocitarios.

apoA-1: apolipoproteinas A-1.

APS: proteína adaptadora con dominios PH y SH2

AS160: sustrato de Akt de 160 kDa

ATG: alteración de la tolerancia a la glucosa.

ATP: Adenosin trifosfato.



C3G: Factor de liberación de nucleótidos de guanina de unión al dominio CRK-SH3

CaMKK β : proteína cinasa β dependiente de Ca (2+) / calmodulina.

CAP: proteína activada por catabolitos

Cbl Linfoma de linaje B de Casitas

CC: Cromatografía en Columna.

CCF: Cromatografía en Capa Fina.

cDNA: DNA complementario.

CREB: Elemento modulador de respuesta a AMPc.

CrkII: proteína adaptadora a c-Crk tipo II

DI: Diabetes insípida.

DM: diabetes mellitus.

DMEM: Medio Modificado Eagle Dulbecco.

DPP4: La dipeptidil peptidasa-4.

DT1: Diabetes tipo 1.

DT2: Diabetes tipo 2.

EROs: Especies reactivas de oxígeno

ERR γ : receptor γ .

FAT/CD36: translocasa de ácidos grasos.

FATP: Proteína Translocadora de ácidos grasos CD36.

GAP (GTPase activating protein): proteína activadora de GTPasa.



GCN5: control general no represible 5.

GIP: péptido insulíntrópico dependiente de glucosa.

GK: Glucocinasa.

GLP-1: péptido similar a glucagon-1.

GLUT-2 Transportador de glucosa 2.

GLUT-4 Transportador de glucosa 4.

Hb A 1C: hemoglobina glucosilada A 1C.

HDL: de lipoproteína de alta densidad.

IL-6: interleucina 6.

IL-8: interleucina 8.

Insig-1: El gen 1 inducido por insulina.

IRS-1: sustrato receptor de insulina 1.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LKB-1 Cinasa hepática B1.

LPL: Lipoproteína de baja densidad

LXR: receptor x del hígado.

MCP-1: proteína quimioatrayente de macrófagos 1.

mg: Miligramos.

mM: Milimolar.

MTT: Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-triazol-2,5) difenil tetrazoilo.



NCOR: Correpresor Nuclear.

NCoR: del correpresor del receptor nuclear.

NFkB: factor nuclear kappa B.

nm: Nanómetros.

NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer Salino de Fosfatos.

PCR-RT: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PDX-1: factor promotor de insulina 1.

PGC-1 α : El coactivador 1-alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma.

PI3K: fosfatidilinositol- 3-cinasa.

PKA: Proteína Cinasa A.

PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

PPAR α : receptor activado por proliferadores de peroxisomas isoforma alpha.

PPAR β / δ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas isoforma beta/delta.

PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas isoforma gamma.

PPRE: elementos reguladores que responden a PPAR.

PTC: las células tubulares proximales renales.



Rab: GTPasas de fusión de membranas.

RI: resistencia a la insulina.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAm: Ácido Ribonucléico mensajero.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa.

RXR: receptores retinoides X.

Ser: Serina.

SGLT2: cotransportador de sodio glucosa 2 .

SOG: Sobrecarga oral de glucosa.

SREBP1C proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1C.

SUR-1: Receptor de sulfonilureas 1.

Thr: Treonina.

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

Tyr: Tirosina.

TZD: tiazolidinedionas.

UCP1: la proteína de desacoplamiento 1.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

μ l: Microlitro.

μ M: Micromolar.



VII. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral de los extractos acuosos en ratones CD1 sanos	57
Gráfica 2 Pruebas de tolerancia a la glucosa oral de los extractos clorofórmicos en ratones CD1 sanos	58
Gráfica 3. Efecto del extracto clorofórmico de <i>S. domingensis</i> sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12.	60
Gráfica 4. Efecto del extracto acuoso de <i>S. cordifolia</i> sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12.	61
Gráfica 5. Efecto del extracto clorofórmico de <i>S. cordifolia</i> sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12.	62
Gráfica 6. Efecto de los extractos de <i>S. domingensis</i> y <i>S. cordifolia</i> sobre la expresión del RNAm de PPAR γ	63
Gráfica 7. Efecto de los extractos de <i>S. domingensis</i> y <i>S. cordifolia</i> sobre la expresión del RNAm de GLUT-4.	64
Gráfica 8. Efecto de los extractos de <i>S. domingensis</i> y <i>S. cordifolia</i> sobre la expresión del RNAm de PPAR α	65
Gráfica 9. Efecto de los extractos de <i>S. domingensis</i> y <i>S. cordifolia</i> sobre la expresión del RNAm de FATP.	66
Gráfica 10. Efecto de los extractos de <i>S. domingensis</i> y <i>S. cordifolia</i> sobre la acumulación de lípidos.....	67



VIII. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción asociados al efecto de metformina.....	30
Figura 2. Representación general de la activación de los PPARs.	35
Figura 3. Estructura general de PPARs	36
Figura 4. Fotografía de la región aérea de <i>T. lucida</i>	41
Figura 5. Fotografía de la región aérea de <i>S. domingensis</i>	43
Figura 6. Fotografía de la región aérea de <i>S. cordifolia</i>	44
Figura 7. Fotografías microscópicas de adipocitos diferenciados a partir de la línea celular 3T3-L1, teñidos con rojo oleoso después de tratamientos a 24 h.....	68

IX. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos para la detección de diabetes de acuerdo a la asociación americana de diabetes.	23
Tabla 2. Principales países con mayor incidencia de DT2 en el año 2017 y estimación para el año 2045.....	24
Tabla 3. Tratamientos experimentales en ratones macho de la cepa CD1	49
Tabla 4. Características y secuencias de los primer directo y primer reverso para el análisis de la expresión de genes en la línea celular de miocitos C2C12.	53
Tabla 5. Porcentaje del rendimiento obtenido de los extractos acuosos y de los extractos clorofórmicos de las especies vegetales evaluadas.	56
Tabla 6. Grupos de metabolitos identificados en los extractos obtenidos de <i>S. cordifolia</i> y <i>S. domingensis</i>	59



X. RESUMEN

Existen diversos factores que se asocian con el desarrollo de diabetes *Mellitus* (DM), tales como el origen étnico, dieta no saludable, antecedentes familiares, etc., pero el sobrepeso toma un papel principal puesto que se presenta en el 90% de los casos de DM. Esta condición tiene como origen el desequilibrio energético, entre la energía consumida y la energía gastada. Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) participan activamente en el mantenimiento de dicho equilibrio, los cuales son factores de transcripción nuclear dependientes de ligando. Existen tres isoformas de PPAR, alfa (α), delta/beta (δ/β) y gamma (γ), estos receptores representan un blanco terapéutico interesante para la prevención y/o tratamiento de enfermedades como la DM, debido a que regulan la expresión de genes involucrados en la señalización de insulina, la homeostasis de lípidos y colesterol, así como el metabolismo de ácidos biliares, además de influir en el perfil inflamatorio, característico de la DM y otras enfermedades metabólicas. *Smilax domingensis*, *Smilax cordifolia* y *Tagetes lucida* popularmente conocidas como cocolmecha, zarsaparrilla y pericón respectivamente, son empleadas en algunas comunidades de la república mexicana a manera de infusiones para el tratamiento de la DM. En investigaciones recientes, se ha evaluado el potencial terapéutico de plantas del género *Smilax*, que han presentado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana e hipoglucémica. Algunos componentes químicos como triterpenos, fenoles, flavonoides, polisacáridos y ácidos grasos, han sido identificados en dichas especies. Estos compuestos tienen un importante potencial de ser ligandos a PPARs y esto puede ser asociado directamente con sus efectos sobre la glucemia sanguínea. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antihiper glucemiante de los extractos cloroformicos y acuosos de *S. cordifolia* y *S. domingensis* y *Tagetes lucida*. Los extractos clorofórmicos mostraron actividad antihiper glucemiante transcurridos 30 minutos de la administración de glucosa, en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO), *S. domingensis* mostró un mayor efecto antihiper glucemiante en dicha prueba. El extracto acuoso y el extracto clorofórmico de *Tagetes lucida* no tuvieron efecto sobre los niveles de glucemia en el modelo *in vivo* por lo que no fueron evaluados en el modelo *in vitro*. En cuanto a la funcionalidad celular, la concentración óptima del extracto de *S. domingensis* fue de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que para



el extracto de *S. cordifolia* se obtuvo una viabilidad superior al 80% en las concentraciones de 10, 20, 40 y 80 μg /ml. Evaluamos el potencial efecto agonista dual de extractos acuosos y clorofórmicos de *Smilax cordifolia* y *Smilax domingensis* sobre PPAR α /PPAR γ y algunos de sus genes regulados; mediante RT-qPCR en la línea celular C2C12. El análisis de la expresión génica mostró que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* incrementó la expresión de PPAR α y PPAR γ , además de producir incremento significativo en la expresión de FATP, y GLUT-4 respectivamente. Por otro lado, el extracto de *S. cordifolia* incrementó la expresión tanto de GLUT-4 como de FATP, y mantuvo sin cambios los niveles de expresión de PPAR α y PPAR γ . Se utilizaron los siguientes tratamientos como controles positivos: pioglitazona como agonista de PPAR γ (25 mM), para PPAR α fenofibrato (10mM). En un análisis Fitoquímico preliminar se identificaron 5 grupos de compuestos principales presentes en el extracto cloroformico de *S. domingensis*: fenoles, esteroides, alcaloides, triterpenos y saponinas, en cuanto al extracto clorofórmico de *S. cordifolia* únicamente se identificaron saponinas y fenoles, mientras que en extracto acuoso de *S. cordifolia* se identificó la presencia de saponinas, fenoles y flavonoides. Estos resultados sugieren que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* a través de su efecto dual, favorece el transporte de glucosa y de ácidos grasos, sentando las bases para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades relacionadas con el metabolismo tales como la DM.



XI. ABSTRACT

Many factors are associated with the development of diabetes *Mellitus* (DM), for example ethnic origin, unhealthy diet, family history, but being overweight plays a major role because it occurs in 90% of DM cases. This condition is consequence the energy imbalance, between the energy consumed and the energy spent. A key molecule that actively participates maintaining this balance are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which are ligand-dependent nuclear transcription factors. There are three isoforms of PPAR, alpha (α), delta / beta (δ / β) and gamma (γ), these receptors represent an interesting therapeutic target for the prevention and / or treatment of diseases such as diabetes *mellitus* because they regulate the expression of genes involved in insulin signaling, lipid and cholesterol homeostasis, bile acid metabolism, in addition to influencing the inflammatory profile, characteristic of DM and other metabolic diseases. *Smilax domingensis*, *Smilax cordifolia* and *tagetes lucida* popularly known as Cocolmecha, zarsaparrilla and pericón respectively, are used in some communities of the Mexican Republic as infusions for the treatment of DM. In recent research, the therapeutic potential of plants of the genus *Smilax* has been evaluated. Some plants of the genus have presented antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and hypoglycemic activities. Some chemical components such as triterpenes, phenols, flavonoids, polysaccharides and fatty acids, have been identified in these species. These compounds have significant potential to be ligands to PPARs and this may be directly associated with their effects on blood glucose. The objective of the present investigation was to evaluate the potential dual agonist effect of aqueous and chloroformic extracts of *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* and *Tagetes lucida* on PPAR α / PPAR γ and some of their regulated genes; glucose transporter 4 (GLUT4) and fatty acid transporter protein (FATP) by RT-qPCR in the myocyte cell line C2C12. And their antihyperglycemic effect in the oral glucose tolerance test (OGTT) in healthy mice of the CD1 strain.

OGTT showed antihyperglycemic activity of the chloroformic extracts of *S. cordifolia* and *S. domingensis* 30 minutes after the administration of glucose. *S. domingensis* showed a greater antihyperglycemic effect. The aqueous extract and the chloroform extract of *Tagetes lucida* had no effect on the blood glucose levels in the in vivo model, therefore



they were not evaluated in the in vitro model. Regarding cell functionality, the optimal concentration of the *S. domingensis* extract was 1µg / ml, while for the *S. cordifolia* extract, viability of greater than 80% was obtained in the concentrations of 10, 20, 40 and 80 µg / ml. The analysis of gene expression showed that the chloroform extract of *S. domingensis* increased the expression of PPARα and PPARγ, in addition to producing a significant increase in the expression of FATP and GLUT-4. On the other hand, the *S. cordifolia* extract increased the expression of both GLUT-4 and FATP, and kept the expression levels of PPARα and PPARγ unchanged. The following treatments were used as positive controls: pioglitazone as PPARγ agonist (25 µM), for PPARα fenofibrate (10µM). In a preliminary phytochemical analysis, were identified phenols, sterols, alkaloids, triterpenes and saponins in the chloroform extract of *S. domingensis*, in the chloroform extract of *S. cordifolia*, only saponins and phenols were identified, while in aqueous extract of *S. cordifolia* were identified saponins, phenols and flavonoids. These results suggest that the chloroform extract of *S. domingensis*, have dual agonist effect, favors the transport of glucose and fatty acids, laying the foundations for the development of new drugs for the treatment and / or prevention of diseases related to metabolism like DM.



XII. INTRODUCCIÓN

Definición

La diabetes es una enfermedad crónica, metabólica y sistémica, caracterizada por hiperglicemia, la cual es producto de la disminución de insulina secretada por las células β , ubicadas en los islotes de Langerhans del páncreas, o la incapacidad de las células blanco para responder a esta hormona; fenómeno conocido como resistencia a la insulina (RI), la cual conduce a una disminución en el transporte de glucosa hacia los hepatocitos, miocitos y adipocitos (Liwen *et al.*, 2019).

Resistencia a la insulina

A nivel molecular también puede estar dada por alteraciones posteriores a la unión de la hormona con el receptor de la insulina, generando una alteración de la funcionalidad del receptor o durante la señalización, dentro de las alteraciones más comunes se encuentra:

1. Disminución de la actividad de tirosina cinasa del receptor.
2. Aumento en el estado de fosforilación en residuos de serina-treonina (Ser/Thr) y disminución en la fosforilación en residuos de tirosina (Tyr).
3. Defectos en la expresión y función de GLUT-4.
4. Inhibición de la PI3K por el exceso de AGL asociada a un aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IRS-1.

(Rincón e Islas, 2010)

La patogenia de la diabetes es compleja y puede estar relacionada con múltiples factores de riesgo, incluidos los antecedentes familiares, vida sedentaria, envejecimiento, obesidad y la ingesta calórica. En la obesidad, ocurre una disminución en la supresión de lipólisis, y con ello hay mayores niveles de ácidos grasos libres (AGL) plasmáticos y de sus metabolitos como acil-CoA, ceramidas y diacilglicerol, el resultado de este exceso genera incapacidad de almacenamiento de lípidos ocasionando hipertrofia en los adipocitos, haciéndolos resistentes a la acción de la insulina. La hiperlipidemia y los estados pro-inflamatorios principalmente en el hígado y tejido adiposo asociados a la obesidad, promueven la expresión del factor nuclear kappa B (NF κ B), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), citosinas como la interleucina 6 (IL-6), resistina y disminución de



adiponectina, las cuales promueven inflamación, RI y riesgo de enfermedades cardiovasculares (Castro *et al.*, 2014).

Los síntomas de diabetes incluyen cansancio excesivo, poliuria (eliminación frecuente de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso, polifagia (aumento de apetito), visión borrosa, nocturia (micción nocturna) deterioro del crecimiento, alteraciones del sueño y la susceptibilidad a ciertas infecciones (Riddle y Ahmann, 2020)

Criterios diagnósticos de la DM

Existe una diversidad de criterios de diagnóstico constantemente revisados por la Asociación Americana de la Diabetes (ADA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuales pueden estar basados en una prueba aleatoria de glucosa o bien con un ayuno de por lo menos ocho horas, otro criterio de diagnóstico es mediante la prueba de tolerancia de glucosa, la cual inicia con toma de glucosa en ayuno, después el paciente toma una cantidad moderada de glucosa en una bebida dulce y la glucosa se mide a intervalos específicos. Se diagnostica diabetes si el nivel de glucosa es superior a 200 mg/dl, luego de 2 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos para la detección de diabetes de acuerdo a la asociación americana de diabetes. SOG: sobrecarga oral de glucosa. Tomado de Rincón e Islas, 2010.

<p>A. Diabetes</p> <ul style="list-style-type: none">• Síntomas de diabetes + glucemia al azar ≥ 200 mg/dl• Glucemia ≥ 126 mg/dl en ayuno en 2 días diferentes• Glucemia 2 horas post SOG ≥ 200 mg/dl en dos pruebas.
<p>B. Alteración de la glucemia en ayuno (AGA):</p> <ul style="list-style-type: none">• Glucemia en ayuno entre 110 y 125 mg/dl <p>Si existen factores de riesgo de diabetes hay que realizar una prueba de SOG:</p> <ul style="list-style-type: none">• Si 2 h ≥ 200 mg/dl = diabetes• Si 2 h < 140 mg/dl = no diabético• Si 2 h entre 140 y 199 mg/dl = ATG
<p>C. Alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG):</p> <ul style="list-style-type: none">• Glucemia 2 horas SOG entre 140 y 199 mg/dl



Epidemiología

En cuanto a la prevalencia, ésta enfermedad ha afectado a 463 millones de personas en el año 2019, y se estima que para el año 2045 serán 700 millones. Los países con mayor incidencia de DM son China, India y Estados Unidos de América. Por otro lado, México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 12.8 millones de personas diagnosticadas en el año 2019 (Tabla 2). Cabe señalar que esta cifra continua en aumento, se prevé que para el año 2045 se tendrá una población de 22.3 millones de mexicanos diabéticos, manteniéndose entre los primeros 10 países con diabetes (FID, 2019).

Se ha estimado que la esperanza de vida para individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. En México, la edad promedio de las personas que mueren por complicaciones de diabetes es de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en la esperanza de vida (Hernández *et al.*, 2013).

Tabla 2. Principales países con mayor incidencia de DT2 en el año 2019 y estimación para el año 2045.

2019			2030			2045		
Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)	Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)	Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)
1	China	116,4 (108,6-145,7)	1	China	140,5 (130,3-172,3)	1	China	147,2 (134,7-176,2)
2	India	77,0 (62,4-96,4)	2	India	101,0 (81,6-125,6)	2	India	134,2 (108,5-165,7)
3	Estados Unidos	31,0 (26,7-35,8)	3	Estados Unidos	34,4 (29,7-39,8)	3	Pakistán	37,1 (15,8-58,5)
4	Pakistán	19,4 (7,9-30,4)	4	Pakistán	26,2 (10,9-41,4)	4	Estados Unidos	36,0 (31,0-41,6)
5	Brasil	16,8 (15,0-18,7)	5	Brasil	21,5 (19,3-24,0)	5	Brasil	26,0 (23,2-28,7)
6	México	12,8 (7,2-15,4)	6	México	17,2 (9,7-20,6)	6	México	22,3 (12,7-26,8)
7	Indonesia	10,7 (9,2-11,5)	7	Indonesia	13,7 (11,9-14,9)	7	Egipto	16,9 (9,0-19,4)
8	Alemania	9,5 (7,8-10,6)	8	Egipto	11,9 (6,4-13,5)	8	Indonesia	16,6 (14,6-18,2)
9	Egipto	8,9 (4,8-10,1)	9	Bangladesh	11,4 (9,4-14,4)	9	Bangladesh	15,0 (12,4-18,9)
10	Bangladesh	8,4 (7,0-10,7)	10	Alemania	10,1 (8,4-11,3)	10	Turquía	10,4 (7,4-13,3)



Clasificación

En 1997 la Asociación Americana de Diabetes propuso la clasificación vigente de diabetes, la cual se basa en la patogénesis de la enfermedad y comprende cuatro categorías:

- 1) Diabetes *mellitus* tipo 1 (DT1) que implica la destrucción de las células β pancreáticas mediada por células T, inhibiendo la producción de insulina. No hay una cura disponible hasta el momento, y los pacientes son dependientes de la administración subcutánea constante de insulina (Katsarou *et al.*, 2017)
- 2) En la Diabetes *mellitus* tipo 2 (DT2) el cuerpo es capaz de producir insulina; sin embargo, las células del organismo no responden, debido al desarrollo de RI desencadenando la acumulación de glucosa en sangre y aumentando la producción de dicha hormona, lo que lleva en un futuro inmediato a la hiperinsulinemia y posteriormente al agotamiento pancreático (Guariguata, 2013).
- 3) La diabetes gestacional ocurre en aproximadamente 1 de cada 30,000 embarazos, es definida como la intolerancia a los carbohidratos durante el primer trimestre del embarazo. Caracterizada por RI, está principalmente ocasionada por obesidad e historial familiar de DT2 (Flores *et al.*, 2014)
- 4) Existen otros tipos específicos de diabetes, generado por fármacos anticancerígenos o sustancias tóxicas. En este grupo podemos ubicar a la diabetes insípida (DI), la cual se vincula con la secreción inadecuada de arginina, vasopresina o deficiencias en la respuesta renal a esta hormona, lo que produce poliuria hipotónica y polidipsia compensatoria subyacente. La DI no tratada puede causar hipovolemia, deshidratación y desequilibrios electrolíticos (Kalra *et al.*, 2016).

Fisiopatología y complicaciones vasculares

Del 85 al 95% de los pacientes con Diabetes padecen el tipo 2 de ésta enfermedad, por ello cobra mayor relevancia para su estudio. Existen diversos factores que se asocian al desarrollo de diabetes, entre ellos uno de los factores de riesgo que se asocia con más del 90% de los casos de DT2 es la presencia de sobrepeso u obesidad (Alegría-Ezquerro, 2008). Esta condición se caracteriza por un aumento en las reservas energéticas, acumulando energía en forma de grasa en la mayoría de tejidos, bajo ciertas



condiciones, un exceso de calorías es considerado positivo para el organismo siempre que se almacene eficientemente en el tejido adiposo. Sin embargo, una acumulación excesiva o rápida de grasa, puede disminuir la capacidad funcional del órgano. Cuando eso sucede, alternativamente se acumula ectópicamente en otros órganos metabólicamente relevantes, como el hígado, el músculo esquelético, los riñones y el páncreas. En estos órganos, como en el tejido adiposo blanco la carga excesiva de nutrientes induce estrés metabólico causando toxicidad relacionada con los lípidos, una causa conocida de resistencia a la insulina e inflamación (Virtue y Vidal-Puig, 2010).

Las complicaciones de la DM se clasifican en dos categorías, macrovasculares, que incluye la enfermedad arterial coronaria y periférica, y microvascular, como neuropatía, retinopatía, nefropatía, enfermedades del pie y cardiovasculares (Fowler, 2008).

Las alteraciones de las células endoteliales implicadas en las complicaciones macrovasculares tienen muchos elementos inductores, que incluyen niveles elevados de glucosa en sangre, lípidos y factores inflamatorios (Calles-Escandon *et al.*, 2001). La DM también se asocia con una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs), que a su vez pueden inducir vasoconstricción con peroxidación lipídica acelerada y reacciones inflamatorias que conducen a aterosclerosis, y otras complicaciones de la DT2 (Stirban y Tschoepe, 2008). Tales como la enfermedad arterial coronaria que se asocia principalmente con dislipidemia y aumento de la presión arterial. La fibrosis asociada con la miocardiopatía aumenta aún más por sobreproducción de radicales libres en esta enfermedad, lo que conduce a una desregulación del calcio, disfunción contráctil, remodelación del miocardio y, posteriormente, muerte de los cardiomiocitos (Ramesh *et al.*, 2013).

Por otro lado, las complicaciones microvasculares diabéticas se asocian principalmente con el deterioro de la permeabilidad vascular que afecta a diferentes tejidos y órganos del cuerpo incluidos los riñones, la retina y los nervios (Mokini y Chiarelli, 2006).



La hiperglicemia crónica, no tratada puede causar permeabilidad vascular, alteración de la estructura del glucocálix y aumento de agua, lo que da como resultado un edema generalizado. Un indicador temprano de nefropatía diabética es el aumento de la excreción urinaria de albúmina. El estrés oxidativo generado en la DM también puede aumentar la alteración de la función renal como resultado de una expresión génica de angiotensinógeno (Perrin *et al.*, 2007).

La hiperglucemia crónica también conduce a la retinopatía diabética mediante la estimulación de la vía PKC que puede directa e indirectamente inhibir la actividad de eNOS a través de una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), niveles elevados de EROs debido al estrés oxidativo puede conducir a un aumento de la peroxidación lipídica y un deterioro concomitante del sistema protector antioxidante, lo que provocan la lesión en la retina de pacientes diabéticos (Madsen-Bouterse y Kowluru, 2008). La neuropatía diabética es una de las principales complicaciones que afectan a los pacientes con DM. Esto puede llevar a neuropatías sensitivas o sensitivomotoras con riesgo de ulceración y amputación del pie en algunos casos no controlados de diabetes. La regeneración de las células neurales se reduce considerablemente debido a una inhibición del factor de crecimiento similar a la insulina. Una mayor activación de la vía poliol disminuye el NADPH, que de otro modo se requiere para la activación de glutatión reductasa, aldosa reductasa y óxido nítrico sintasa endotelial. Todo esto lleva a empeorar el estrés oxidativo y aceleración de la neurodegradación (Hotta *et al.*, 2012).

Además, la elevación del sorbitol intraneural puede inducir necrosis celular aunado a glicación de proteínas dentro de los nervios en pacientes con DM, lo que conduce a una desestabilización del citoesqueleto y contribuye a ralentizar el transporte axonal y los impulsos nerviosos mientras acelera la degeneración nerviosa (Millecamps & Julien, 2013).

La ulceración del pie diabético se debe principalmente a que la neuropatía y la isquemia ocurren juntas. El pie diabético se asocia con una mayor incidencia de traumatismo en el pie debido a disminución de la propiocepción. La isquemia subyacente da como resultado la cicatrización deficiente de las heridas en las zonas lesionadas y las infecciones superpuestas provocan ulceración (Pendsey, 2010).



La disfunción eréctil es una complicación común de la DM, y se relaciona principalmente alteración de la estimulación neuronal hacia sistemas vasculares. Los pacientes diabéticos, sufren cambios hormonales, enfermedades crónicas, desnutrición, infección del tejido del pene e impotencia relacionada con influencias psicológicas (Hamdan y Matubsi, 2009).

Complicaciones crónicas no clásicas

A. Enfermedad periodontal

La DM se puede diagnosticar mediante un examen dental, ya que de manera frecuente los paciente diabéticos tienen afecciones en la cavidad bucal. La depresión del sistema inmunológico en pacientes diabéticos promueve el desarrollo de la enfermedad periodontal debido al aumento de bacterias acumuladas entre los dientes y la encía y promoción de la demolición ósea. La periodontitis crónica puede provocar retracción de las encías, hinchazón, sangrado, pérdida de dientes. Los pacientes diabéticos también experimentan resequedad, que se asocia con una reducción de la amilasa salival (Preshaw *et al.*, 2012).

B. Enfermedades diabéticas de los huesos

La DM puede conducir a una disminución de la densidad mineral ósea con una tasa elevada de fracturas. Un aumento en la producción de productos de glicación avanzada se asocia con la progresión de las complicaciones diabéticas que incluyen microangiopatía y aterosclerosis, que también pueden conducir a enfermedad ósea diabética (Wu, *et al.*, 2015).

C. Diabetes y trastornos de la piel

La acumulación de tejido adiposo subcutáneo relacionada con la obesidad estimula la colonización y el crecimiento de *Candida albicans*, por lo que se da un oscurecimiento y engrosamiento de la piel. Además, la deshidratación de la piel puede provocar cambios en la flora dérmica, y dar paso a la colonización por bacterias patógenas (Oumeish, 2008).



Tratamiento farmacológico de la DM

Se contemplan diversas estrategias, entre las que se incluye el cambio de hábitos alimenticios, aumento en la actividad física y la utilización de medicamentos para tener un mejor control glucémico como los que se muestran a continuación:

Biguanidas

De este grupo, metformina se usa como terapia oral de primera línea, ya sea sola o en combinación con otros anti-hiperglucémicos debido a su capacidad de disminución de glucosa y a la reducción de la hemoglobina glucosilada A_{1c} (Hb A_{1c}). La metformina puede regular la activación de AMPK. En consecuencia, la AMPK activada inhibe la síntesis de proteínas y lípidos, a su vez aumenta la oxidación de los ácidos grasos. LKB-1 y CaMKK β son responsables de la fosforilación de AMPK y se ha observado que los efectos de metformina están mediados por la activación de LKB-1 en los hepatocitos y el músculo esquelético (Zou *et al.*, 2014) En condiciones de baja energía, la activación de la vía LKB1 / AMPK por metformina, fosforila mTORC2 y retrasa su traslocación al núcleo e inhibiendo la gluconeogénesis hepática.

Además, la metformina podría estimular SIRT1 (regulador de información de tipo de apareamiento silencioso 2 homólogo 1); una enzima desacetilasa dependiente de NAD⁺ que inactiva mTORC2 a través de la desacetilación y la expresión de la proteína GCN5 (control general no represible 5, una histona acetiltransferasa) e inhibe los blancos de PGC-1 α , de tal manera que inhibe la gluconeogénesis (Viollet y Foretz, 2013). A pesar de muchos estudios realizados para comprender su mecanismo de acción, sigue siendo incompleto.

Entre sus efectos adversos se encuentran diarrea, vómitos, anorexia, malestar estomacal, náuseas, flatulencia, somnolencia, reduce la absorción gastrointestinal de vitamina B12 causando anemia y rara vez hipoglucemia. Un efecto colateral muy raro pero serio es la acidosis láctica (Serra, 2016).



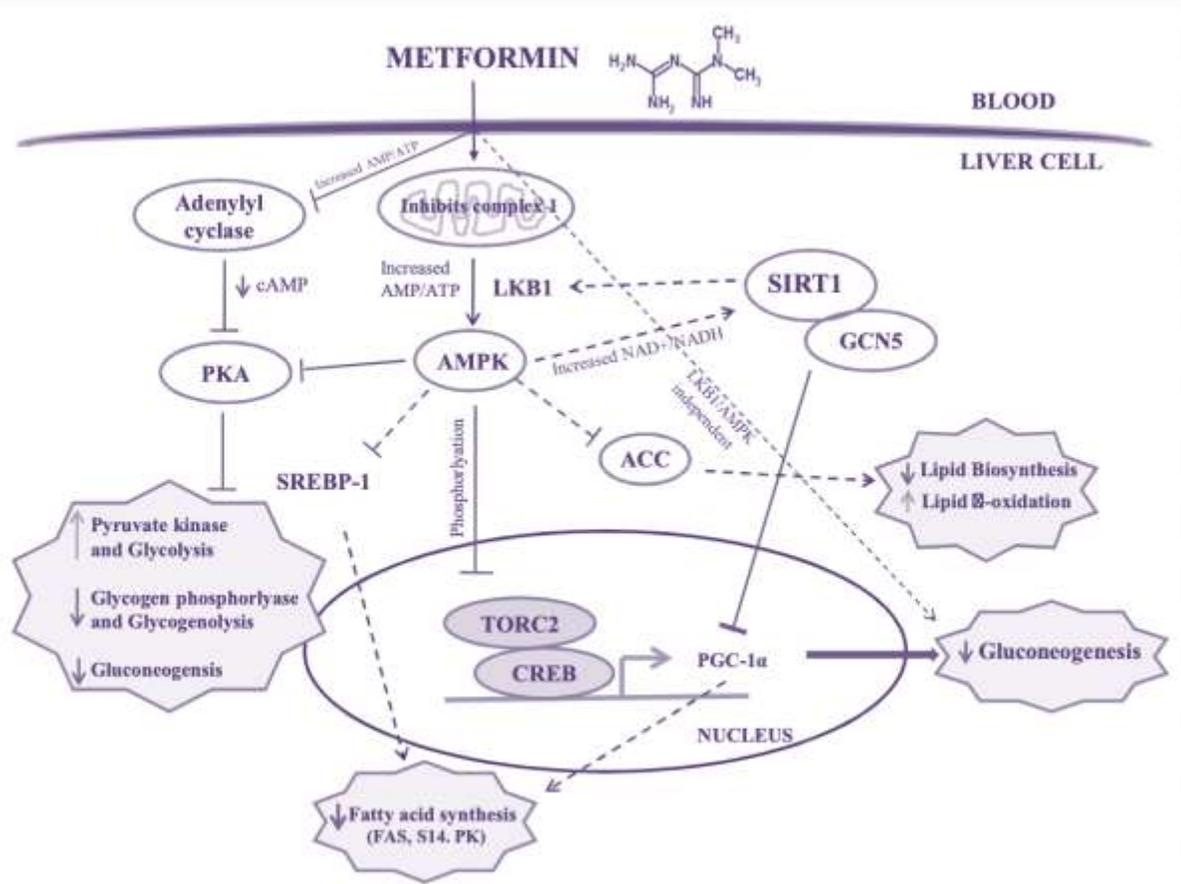


Figura 1. Mecanismos de acción asociados al efecto de biguanidas como metformina. Tomado de Gupta *et al*, 2016.

Sulfonilureas

Clínicamente, se utiliza sulfonilureas como terapia de segunda línea después de la metformina porque son muy efectivas para reducir la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}). Cuando cambia la relación ATP/ADP las sulfonilureas se unen al complejo transmembrana SUR1-Kir6.2 del canal de K_{ATP}, inducen el cierre de este canal y se despolariza la membrana de las células β. Este proceso a su vez afecta la entrada de

Ca²⁺ en las células a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y finalmente regula la secreción de insulina de las células β pancreáticas (seino *et al.*, 2010).

A pesar de su eficacia, las sulfonilureas siguen siendo motivo de preocupación debido a los efectos adversos asociados, principalmente hipoglucemia y aumento de peso. Otros efectos adversos raros asociados con los medicamentos de sulfonilurea incluyen ictericia colestásica, erupciones cutáneas, anemia hemolítica, trombocitopenia, enfermedades cardiovasculares, agranulocitosis, incrementando el riesgo de muerte (Gupta *et al.*, 2016).

Incretinas

En sujetos sanos, las incretinas son el grupo de hormonas que pertenecen a la superfamilia de glucagón, que son secretadas por las células enteroendocrinas (ubicadas en el epitelio del intestino delgado). El péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) secretado de las células L intestinales y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) liberado de las células K intestinales tienen como función fisiológica estimular la secreción de insulina por las células β pancreáticas en la sangre en respuesta a la ingesta de glucosa y promover la proliferación de las células β. Sin embargo, GLP-1 también puede suprimir la secreción de glucagón de las células α pancreáticas y, por lo tanto, ayuda a disminuir la liberación de glucosa del hígado, retrasa el efecto de vaciado gástrico, suprime el apetito y protege las células β de la apoptosis, lo que respalda aún más el papel de las incretinas para limitar el nivel de glucosa en sangre (Ross y Etko, 2010). De tal manera que debido a sus efectos de potencial múltiple específicamente la estimulación y la inhibición de la secreción de insulina y glucagón, respectivamente, hacen que GLP-1 sea un candidato relativamente atractivo en el tratamiento de la DT2.

Agonistas de GLP-1R

Los agonistas de GLP-1R (Exenatida/Ex-4) activan GLP-1R (un receptor acoplado a proteína G presente en la membrana plasmática de las células β) y estimulan la conversión dependiente de glucosa de ATP a AMP cíclico (AMPC) por adenilato ciclasa (AC). Estimulan los niveles de AMPC mejorando la secreción de insulina y también



estimulan la expresión de factores de transcripción como CREB y PDX-1 (también conocidos como IDX-1, IPF-1 y STF-1) a través de PKA. Estos Factores de transcripción regulan aún más la expresión de genes como GLUT2, GK y otras proteínas importantes en el funcionamiento de las células β pancreáticas, su supervivencia y proliferación. El agonista de GLP-1R (exenatida) también regula la hiperglucemia sanguínea al controlar la masa de células β y la apoptosis (Nisal *et al.*, 2012).

Entre sus efectos adversos se encuentran un aumento en la frecuencia infecciones respiratorias altas y urinarias, reacciones gastrointestinales adversas e insuficiencia cardíaca (Aylwin, 2016).

Inhibidores de DPP-4

Los agentes que inhiben DPP4, se unen a la dipeptidil peptidasa 4 impidiendo la actividad de la enzima, de tal manera que no inactiva a las incretinas, por lo cual aumentan los niveles activos de estas hormonas, estas estimulan la secreción de insulina ya que al unirse a su receptor acoplado a proteínas G, aumentan el AMPc, se cierran los canales de potasio, incrementando el calcio, se despolariza la membrana y se secreta la insulina. Sin embargo, el mecanismo no clásico muestra que la inhibición de DPP-4 específica de tejido conduce a múltiples acciones, incluida la regulación positiva de la actividad nerviosa autónoma, la secreción de insulina y la regulación negativa de la producción de glucosa hepática, glucagón secreción e inflamación al prevenir la inactivación de GLP-1 presente en estos tejidos. Además de mantener las proteínas incretinas, los inhibidores de DPP-4 también previenen la inactivación de otros péptidos bioactivos, incluido el factor 1α derivado del estroma y el polipéptido pituitario de activación de adenilato ciclasa que ayudan aún más en la mejora de la función de las células β . GLP-1 activo (presente en la sangre, el intestino y el páncreas) junto con otros péptidos bioactivos puede estar involucrada colectiva / sinérgicamente en el efecto reductor de la glucosa mediado por los inhibidores de DPP-4 en pacientes con DM2 (Shah *et al.*, 2013). A pesar de que los efectos secundarios son considerados menores y mejor tolerados es común la presencia de cefaleas, estreñimiento, mareo y riesgo de hipoglucemia (Gupta *et al.*, 2016).



Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa 2 (SGLT2)

Los inhibidores de SGLT2 representan una nueva clase de agentes anti-hiperglucémicos orales que controlan específicamente el nivel de glucosa renal mediante la inhibición de SGLT2 (el transportador clave para la reabsorción de glucosa) e inducen la excreción de glucosa en plasma a través de la orina en un mecanismo independiente de insulina. El uso de estos inhibidores como agentes terapéuticos es la intervención con la reabsorción de glucosa en las células tubulares proximales renales, para que la excreción de glucosa en la orina disminuya (glucosuria) y, por lo tanto, mejore el control glucémico. Esta clase de agentes farmacológicos también puede ser útil en la diabetes tipo 1 (Mosley *et al.*, 2015).

Entre los efectos secundarios más comunes de los Inhibidores del cotransportador de sodio glucosa se encuentran las infecciones urinarias recurrentes y con menor frecuencia pero de manera más grave puede presentarse acidosis láctica (Serra, 2016).

Los inhibidores de la α -glucosidasa

Representan otra clase de fármacos que pueden contrarrestar la hiperglucemia posprandial a nivel de absorción intestinal y, por lo tanto, pueden mejorar la respuesta a la insulina. Los inhibidores de la α -glucosidasa son pseudocarbohidratos que pueden inhibir o ralentizar la tasa de absorción de glucosa intestinal atribuida a su acción inhibitoria competitiva contra la actividad de las enzimas α -glucosidasa. Como resultado, la absorción intestinal de carbohidratos se retrasa y se desplaza a partes más distales del intestino delgado y el colon. Esto retarda la entrada de glucosa en la circulación sistémica y disminuye el índice glucémico de los carbohidratos (Joshi *et al.*, 2015).

Los principales efectos secundarios de los inhibidores de la glucosidasa implican náuseas, edema, malestar abdominal, diarrea y flatulencia (Osonoi, 2015).

Análogo sintético de amilina (pramlintida)

Amilina y sus análogos están aprobados como terapia complementaria a la insulina en la diabetes tipo 1 y tipo 2 debido a su efecto reductor de glucosa. La amilina es una hormona polipeptídica neuroendocrina compuesta de 37 aminoácidos empaquetados conjuntamente con insulina en gránulos secretores de las células β pancreáticas y ambos



se secretan juntos (proporción de insulina 100: 1 a amilina) en respuesta a la ingesta de alimentos. Los ensayos preclínicos y clínicos han ilustrado que la amilina complementa la acción de la insulina al regular la tasa de entrada de glucosa al torrente sanguíneo. Actúa mediante la supresión de la secreción de glucagón posprandial, la reducción de la producción de glucosa hepática, la reducción del tiempo de vaciado gástrico, la ingesta de alimentos y el peso corporal. Los principales efectos secundarios asociados con la pramlintida son los gases, estreñimiento, náuseas y vómitos debido a una posible excitación del área postrema en el bulbo raquídeo (Adeghate y Kalasz, 2011).

Tiazolidinedionas (TZD)

Actúan en el tejido adiposo, induciendo la diferenciación / adipogénesis de adipocitos al atenuar la expresión de resistina y aumentando la absorción de FFA del torrente sanguíneo. Esto se logra debido a su acción agonista a PPAR γ en la expresión de genes de adipocitos, incluida la proteína de unión a los ácidos grasos adipocitarios (aP2), proteína de transporte de ácidos grasos (FATP), translocasa de ácidos grasos (FAT) y grupo de diferenciación 36 (CD36) (Soccio, *et.al.*, 2014). PPAR γ mejora la capacidad de almacenamiento y el flujo de ácidos grasos hacia los adipocitos. Las TZD también afectan la expresión génica de PGC-1 α (un coactivador transcripcional PPAR γ). A través de la activación PPAR γ /RXR que controla la biogénesis mitocondrial, se promueve la actividad oxidativa mitocondrial y el gasto energético en respuesta a las TZD en los adipocitos. Dicha acción de las TZD mejora el catabolismo de los ácidos grasos y, por lo tanto, reduce el nivel de ácidos grasos dentro del tejido adiposo y, posteriormente, puede prevenir la lipotoxicidad y resistencia a la insulina (Grygiel-Gorniak, 2014).

Las TZD se han utilizado como medicamentos de primera línea para la terapia de DT2 en las últimas décadas, pero sigue siendo muy controvertida debido a sus efectos adversos, que incluyen aumento de peso, insuficiencia cardíaca congestiva, edema, etc. Por lo que se proponen compuestos, principalmente agonistas duales o pan-PPAR, pues una activación en conjunto podría reducir el efecto adverso de un agonista único a PPAR.



Existen investigaciones recientes de moléculas con actividad agonista dual a PPARs naturales como por ejemplo Guggulipido, ácido commiferico y Mangostin, entre otros. Sin embargo, aún continúan en evaluación, y algunos no tienen resultados promisorios. De la misma manera se han evaluado metabolitos sintéticos como el ácido 20-hidroxiicosatetraenoico (20-HETE), los análogos de 8-HETE, modificaciones del ácido indanilacético, Tesaglitazar, Muraglitazar. La síntesis química ha representado una alternativa viable para la obtención de dichos compuestos, sin embargo, las rutas de síntesis son muy extensas, con materias prima costosas y en ocasiones ofrecen rendimientos muy bajos. Por ello, se ha recurrido a las plantas medicinales como fuente potencial de moléculas agonistas duales. (Zhang *et al.*, 2016).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas.

Los PPAR son un grupo de receptores de hormonas nucleares activados por ligando. Estos factores de transcripción existen dentro de una superfamilia, que incluye los receptores de retinoides, vitamina D, esteroides y hormonas tiroideas. Estos receptores nucleares se unen a elementos reguladores que responden a PPAR (PPRE) y se heterodimerizan con los receptores retinoides X (RXR), trasladando al núcleo donde contribuyen a transactivar y/o transreprimir genes específicos. (Vitale *et al.*, 2016)

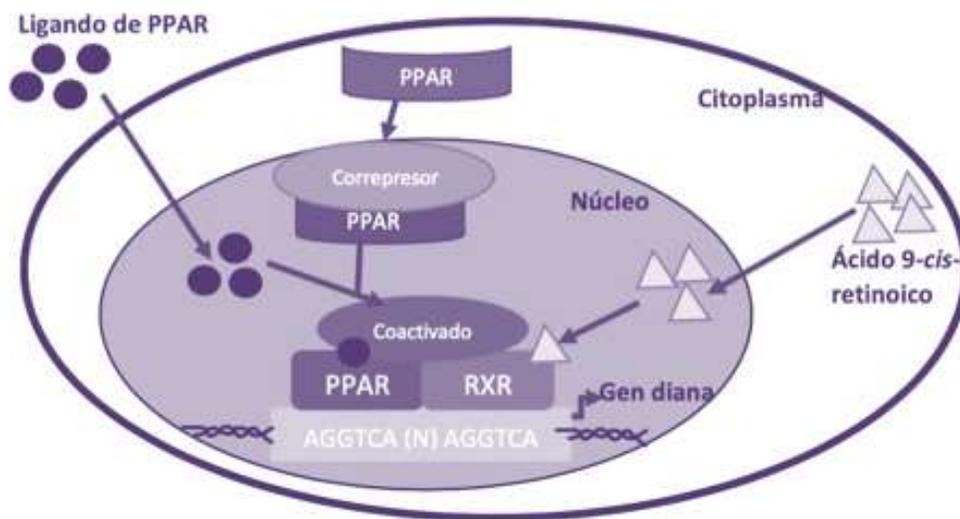


Figura 2. Representación general de la activación de los PPARs. Tomado de Palomer-Tarridas, 2007.

Hay tres isoformas diferentes de PPAR: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Las tres isoformas de PPAR muestran similitudes estructurales (Figura 3). Sin embargo, a pesar de sus similitudes, las isoformas exhiben diferencias en la distribución de tejidos; PPAR α se expresa predominantemente en el hígado y, en menor medida, en músculo, corazón, hueso y tejido adiposo marrón, páncreas, intestino, PPAR β/δ se expresa de forma ubicua, pero es particularmente activo en el músculo esquelético y en el caso de PPAR γ , existen dos isoformas principales, PPAR γ 1 y PPAR γ 2, diferenciadas por un exón adicional de 90 nucleótidos en el extremo final de la isoforma γ 2. PPAR γ 1 tiene una distribución generalizada y parece apoyar una especie de función metabólica de limpieza, que es particularmente relevante en el intestino, los macrófagos, el hígado, el músculo, las células β pancreáticas, los huesos, la placenta y el tejido adiposo. Por el contrario, la expresión de la isoforma PPAR γ 2 está restringida bajo condiciones fisiológicas a los tejidos adiposos, sin embargo también se puede expresar en hígado y músculo esquelético. Los PPARs también difieren en especificidades de ligando y funciones. Se ha sugerido que los PPAR se relacionan con la encrucijada de obesidad, diabetes, inflamación y cáncer (Vitale *et al.*, 2016).

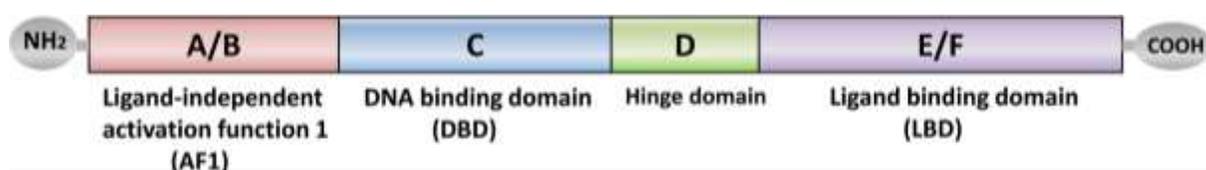


Figura 3. Estructura general de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas. Tomada de Yousefi *et al.*, 2016.

PPAR en el metabolismo de los lípidos

En ayunas, PPAR α acelera la hidrólisis de triglicéridos, proceso llamado lipólisis, en el tejido adiposo, en el hígado regula la expresión de apolipoproteína, aumentando así los niveles plasmáticos de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) y reduciendo los niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) (Shah *et al.*, 2010). También promueve la oxidación mitocondrial o peroxisomal en el hígado como protección del hígado de la lipotoxicidad. Durante la inanición a largo plazo, PPAR α también induce la producción de cetonas, las cuales son utilizadas para el suministro de energía en el tejido extrahepático (Pisani *et al.*, 2018). PPAR γ activado puede disminuir el contenido de ácidos grasos libres en todos los órganos, excepto el tejido adiposo y la sangre circulante, lo que mejora la capacidad del tejido adiposo para almacenar energía (Coelho *et al.*, 2013). PPAR γ generalmente se activa al ingerir alimentos, lo que facilita el transporte de ácidos grasos al tejido adiposo blanco, aumentando la síntesis y el almacenamiento de lípidos (Tsuchida *et al.*, 2005).

No existe una diferencia clara en el papel de PPAR β/δ en diferentes estados nutricionales. Sin embargo, mejora sinérgicamente el catabolismo de los ácidos grasos en el músculo esquelético e inhibe la lipogénesis en el tejido adiposo. Se ha informado que PPAR β/δ disminuye la estabilidad de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1C (SREBP1C), que regula la lipogénesis activando Insig-1 y, por lo tanto, previene la acumulación de lípidos en el hígado. PPAR β/δ también eleva la función de termogénesis en el tejido adiposo marrón, al aumentar la transcripción de genes específicos, incluida la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) y la oxidación de ácidos grasos (Rachid *et al.*, 2015).

PPAR en la homeostasis de la glucosa

PPAR α juega un papel antagonista en la homeostasis de la glucosa, en comparación con la insulina que promueve la glucólisis y la síntesis de *novo* de ácidos grasos, pero disminuye la gluconeogénesis. Por lo tanto, PPAR α inhibe la acumulación de lípidos al disminuir la glucólisis y mejorar la síntesis de glucógeno y la oxidación de ácidos grasos (Wang *et al.*, 2003).



PPAR γ mejora la sensibilización a la insulina en músculo esquelético, y con ello mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β pancreáticas y aumenta la gluconeogénesis en el hígado. Este efecto de PPAR γ es generado por la regulación de una serie de proteínas de transcripción, como la proteína asociada a c-Cbl (CAP) y el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4). PPAR γ induce la expresión de adipocinas, como la adiponectina (aumentando la sensibilidad a la insulina) y la leptina (que regula el comportamiento de alimentación), para mejorar la sensibilidad a la insulina (Kang *et al.*, 2008).

PPAR β/δ promueve la captación de glucosa y el almacenamiento de glucógeno, en músculo esquelético aumenta la conversión de fibras de contracción rápida tipo II en fibras oxidativas de contracción lenta tipo I. Estos cambios involucran en el receptor γ (ERR γ) y en el control de la vía PGC1 α relacionados con el estrógeno, lo que eleva la capacidad de utilización de glucosa por el músculo esquelético (Tang *et al.*, 2008). Otra forma de mejorar la sensibilidad a la insulina mediante PPAR β/δ es a través de la vía pentosa fosfato, que incrementa la utilización de la glucosa e inhibe la salida de glucosa del hígado (Hansen *et al.*, 2001). El mecanismo de los PPAR en la mediación de la homeostasis de la glucosa depende del tejido.

PPAR en el metabolismo del colesterol

Adicionalmente se ha encontrado que PPAR α y PPAR γ promueven la expresión del receptor x del hígado (LXR), que regula la expresión de ABCA1, lo que aumenta la producción de HDL rico en Apo-AI e induce el flujo de colesterol de los macrófagos. Además, se ha demostrado que PPAR β/δ también inhibe la expresión de Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) en el intestino, reduce la adsorción de colesterol y mejora el flujo de salida de colesterol transintestinal (Lappas *et al.*, 2014). Los PPAR en combinación con otros receptores nucleares como LXR son importantes para equilibrar la homeostasis del metabolismo del colesterol.

PPAR en el tejido adiposo

Hay dos tipos esenciales de tejido adiposo, el blanco, y el marrón. Ambos son importantes órganos endocrinos que secretan diferentes adipocinas para el metabolismo



energético sistémico. Entre las isoformas de PPAR, el tipo gamma juega un papel dominante en el tejido adiposo. No solo participa en la incorporación y almacenamiento de ácidos grasos, sino que también regula la diferenciación del tejido adiposo (Liu *et al.*, 2017). La activación de PPAR γ hace que los ácidos grasos sean transportados y almacenados, facilitando la adipogénesis de *novo* en el tejido adiposo. Por lo tanto, los agonistas de PPAR γ se ha utilizado generalmente para tratar la DT2. PPAR α está altamente expresado en tejido adiposo blanco pero no en marrón. En condiciones de exposición al frío, PPAR regula la oxidación de lípidos y la termogénesis al interactuar con PGC1 α en respuesta a la estimulación β -adrenérgica en tejido adiposo marrón. PPAR β/δ también se expresa en ambos tipos de tejido adiposo, controlando la oxidación de ácidos grasos y la termogénesis en el tejido adiposo marrón, promoviendo la expresión de UCP1 (Xu *et al.*, 2018). El papel de PPAR β/δ en el tejido adiposo blanco aún no se conoce con exactitud.

PPAR en el músculo

El músculo esquelético también es un tejido dependiente de insulina; incorpora aproximadamente el 80% de la glucosa disponible en sangre, siendo el mayor depósito de glucógeno del organismo, además de ser uno de los tejidos con mayor utilización de energía por tanto resulta importante en la homeostasis metabólica, en este tejido, PPAR β/δ participa principalmente en el metabolismo de los lípidos que implica la oxidación y utilización de ácidos grasos. Durante el ejercicio, juega un papel importante en la regulación de funciones mitocondriales, puesto que se ha observado que una disminución en la expresión de PPAR β/δ da como resultado un decremento en los niveles de proteínas mitocondriales y de PGC-1 α . PPAR β/δ aumenta los niveles de GLUT4 y la captación de glucosa en los miotubos (Schnuck *et. al.*, 2016). PPAR γ también participa en el metabolismo de carbohidratos a través de la captación de glucosa, y PPAR α induce un cambio en el tipo de fibra muscular el cual aparentemente protege a los ratones de la obesidad inducida por la dieta puesto que el músculo esquelético no es uniforme sino que está compuesto por fibras musculares de diferentes características metabólicas y circulatorias; se ha relacionado la proporción de los distintos tipos de fibras con la resistencia a la insulina, ya que las de tipo IIB son menos sensibles a su efecto.



(Finck *et al.*, 2005). Por otra parte AMPK, un complejo enzimático que se activa con el aumento de relación AMP-ATP, se expresa mayoritariamente en músculo y se encuentra involucrada en la homeostasis energética, tanto de glucosa como de lípidos, y se ha demostrado que su activación en este tejido tiene efectos sensibilizadores a la insulina (Verma y Dey, 2014). Muchos de los extractos y/o moléculas con efecto sobre PPARs, han sido evaluados en el músculo esquelético ya que es uno de los principales órganos que modulan el metabolismo, además de que es donde se expresan mayoritariamente las isoformas de PPARs en conjunto con el tejido adiposo, de ahí la importancia de evaluarlos en estos tejidos.

Papel de PPARs en inflamación

La inflamación se exagera en el desarrollo de la DM y la obesidad. En el proceso inflamatorio característico de la enfermedad, los PPAR generalmente tienen efectos antiinflamatorios. Se ha reportado que los PPAR y NF- κ B compiten entre sí para unirse al mismo conjunto de coactivadores. La actividad de los PPAR se inhibe en ausencia de ligando, debido a la unión del correpresor del receptor nuclear (NCoR). Cuando los corepresores se separan de sus receptores, los coactivadores se unen a ellos y los PPAR se activan para regular la inflamación (Ricote *et al.*, 2007). En las líneas celulares endoteliales, PPAR α inhibe la respuesta inflamatoria al interactuar con p65 directamente. De manera similar, PPAR γ inhibe la secreción de citocinas en los macrófagos estimulados por LPS al interactuar directamente con p65/p50. Aunado a ello, pueden inhibir la activación de NF- κ B al mejorar la estabilidad de los complejos corepresores de NF- κ B (Zhang *et al.*, 2018).

En resumen, los PPAR pueden usarse como blancos farmacológicos para el desarrollo de productos farmacéuticos capaces de regular las alteraciones metabólicas. En este sentido, las plantas medicinales representan una fuente importante de moléculas capaces de regular el metabolismo de lípidos y glucosa, a través de la activación de PPAR, lo cual podría incidir en el mejoramiento del estado inflamatorio de la enfermedad.



XIII. ANTECEDENTES

Un gran número de los productos farmacéuticos que se producen en los países desarrollados proceden de fuentes naturales, principalmente de las plantas. En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente se conservan. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico. Sin embargo, aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (Salgado-Garciglia *et al.*, 2012).

Se ha reportado que algunos compuestos como ácidos grasos, flavonoides y terpenos tienen un alto potencial como agonistas a PPARs (Atanasov *et al.*, 2013), y estos se encuentran presentes en la mayoría de las plantas medicinales. Dentro de las especies medicinales con alto potencial terapéutico se encuentran:

Tagetes lucida.



Figura 4. Fotografía de la región aérea de *T. lucida*, en etapa de floración, con hojas oblongadas y tallos rectos expuestos.

T. lucida se encuentra ampliamente distribuida en América Central, África Occidental, India y la Península Ibérica. Conocida popularmente como Santa María, pericón, hierbanis, estragón mexicano, dragón dulce, yauhtli, periquillo, anicillo, curucumina y caléndula mexicana. Es una planta herbácea, perenne, tupida con muchos tallos lisos, erguidos y no ramificados. Las hojas son lineales u oblongas, de unos 4.6 cm de largo y de color verde brillante o azul verdoso como en el estragón francés real (*Artemisia dracunculus*). Se cultiva por su follaje aromático penetrante, que se utiliza como aromatizante. A fines del verano, el pericón tiene racimos de pequeñas cabezas de flores amarillas en los extremos de los tallos. Las cabezas de las flores miden aproximadamente 1.3 cm de ancho y tienen 3-5 flósculos radiales de color amarillo dorado (Samah *et al.*, 2017).

En la medicina tradicional se ha utilizado como té para tratar problemas gastrointestinales, dolor de estómago, diarrea, depresión y úlceras, así como agitación mental, malaria, tos, reumatismo, asma, enfermedad nerviosa y dolor menstrual. Se han demostrado las propiedades farmacológicas como antidepresivo, antiagregante plaquetario, agente antibacteriano, eliminador de radicales libres y antiinflamatorio (Abdel-Haleem *et al.*, 2017).

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto antidiabético, principalmente la actividad hipoglucemiante en esta especie vegetal, lo cual ubica a *T. lucida* como una opción importante en la búsqueda de nuevos compuestos con acción farmacológica.

Considerando que la activación de PPAR γ contribuye a disminuir significativamente el estado hiperglucémico presente en la diabetes, la obesidad, e incluso en el síndrome metabólico, es probable que *T. lucida* contenga moléculas con potencial agonismo sobre PPARs responsables de su efecto farmacológico. Se ha reportado la existencia de diferentes compuestos como polifenoles, flavonoides, aceites esenciales, patuletina, la quercetina, quercetagetina, hesperidina y naringina (Guadarrama-Cruz *et al.*, 2008 y Roman-Ramos *et al.*, 2008), así como cumarinas e isómeros de las mismas, estos isómeros están ampliamente distribuidos en el género *Tagetes* (Pérez, *et al.*, 2016).



Género *Smilax*.

Pertenece a la familia *Smilacaceae* y comprende aproximadamente 350 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Las especies de *Smilax* se utilizan ampliamente en la medicina tradicional. Se ha demostrado su efecto anti-obesidad e hipolipidémicas, determinado mediante la reducción del peso corporal, así como en la disminución de los niveles séricos de ácidos grasos libres y triglicéridos (Martins *et al.*, 2014).

Smilax domingensis Willd.



Figura 5. Fotografía de la región aérea de *S. domingensis* donde se observa expuesto el peciolo y la hoja redondeada, así como su fruto maduro color rojo.

Conocido popularmente como bejuco chino o raíz de china, zarzaparrilla de la tierra (Cuba); bejuco de membrillo, dunguez blanco (Puerto Rico); chiquihuite o cocolmecha (México). Es un arbusto trepador de América Tropical, crece en tierras bajas, en bosques húmedos de especies de hoja ancha perenne, de 2 a 4 m de altura con rizomas lignificados. El rizoma es voluminoso, con hinchazón tuberosa, de color marrón rojizo, mide 14-21 cm de largo, 3.925 cm de ancho y 3.175 cm de alto. El peso medio ronda los

87 g. Las raíces son adventicias y crecen a partir de los rizomas leñosos (Yaque *et al.*, 2019). Aunque se usa ampliamente, existen varias dificultades taxonómicas para estandarizar su uso.

En la medicina tradicional, el rizoma leñoso característico de *S. domingensis* se utiliza como antiinflamatorio, antifúngico, antioxidante, antihiperuricémico, antipruriginoso, antiséptico, cicatrizante, diurético y tónico (Cáceres, 2009). Los principales componentes encontrados y compartidos por la mayoría de las especies del género son las saponinas esteroides, los fitoesteroles y los triterpenoides. Las actividades antimicrobianas y antitumorales se atribuyen a la parilina (Cáceres *et al.*, 2012).

Smilax cordifolia



Figura 6. Fotografía de la región aérea de *S. cordifolia* donde se observan las hojas, así como su fruto color morado oscuro.

Es una planta trepadora que brota de un rizoma hemisférico de cinco metros o más de largo. Los tallos poseen espinas, hojas cordiformes y de puntas angostas, flores pequeñas unisexuales, frutos negros y globosos. Esta especie es originaria de México y

distribuida en los estados de Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Colima y Tabasco. Habita en climas cálidos y semicálidos hasta 700 msnm. Se encuentra asociada a bosques tropicales subcaducifolios. Identificada con varios nombres científicos: *Smilax cordifolia*, *Smilax acutifolia*, *Smilax invenusta* y *Smilax schiedeana*, por lo cual se ha establecido que el producto comercial denominado Zarzaparrilla es una mezcla de dos o más especies de *Smilax* (INI, 1994)

Se han reportado actividades biológicas para esta especie, como antiinflamatorias, antioxidantes, antinociceptivas, antifúngicas, antiestrogénicas, diuréticas y antihiperuricémicas. Entre los compuestos con actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antiartríticas que se aislaron de este género se encuentran los Smilaxchinoside A-D, Sieboldogenin y Astilbin, además de la presencia de saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides y glucósidos fenilpropanoides. *S. cordifolia* es rica en ácido rosmarínico, hesperidina y β -sitosterol (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016). Por lo tanto, es probable que los efectos farmacológicos de dicha especie se deban a su acción agonista sobre PPARs.

XIV. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia mundial de la diabetes continúa incrementado significativamente año con año, estimando que para 2045 serán 700 millones de personas con diabetes.

La DM es una enfermedad multifactorial, y su fisiopatología involucra diversos tejidos que participan en un desequilibrio energético

En la actualidad, existen diversos fármacos para su tratamiento sin embargo, el objetivo de la mayoría de estas terapéuticas sólo se basa en controlar los niveles de glucosa en sangre. Es común que los pacientes sean tratados con fármacos hipoglucemiantes, hipolipemiantes y en ocasiones antihipertensivos, y el hecho de emplear una terapéutica múltiple, aumenta el riesgo de desarrollar efectos indeseables.



Los PPAR son un blanco terapéutico interesante, debido a que regulan el metabolismo de lípidos y carbohidratos, siendo el desbalance de éstos el problema principal de la DT2 y otras enfermedades relacionadas al SM.

Pioglitazona (agonista a PPAR γ) y otros fármacos agonistas a una isoforma de PPAR muestran una inclinación del balance energético hacia un sentido del metabolismo, por ejemplo, generando acumulación de lípidos y a su vez provocando aumento de peso e incluso obesidad, lo cual puede contribuir al agravamiento de la DT2. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de moléculas con varios blancos moleculares que permitan generar cambios en los diversos parámetros asociados a la diabetes, en particular en carbohidratos y lípidos. En este sentido, los agonistas duales a PPARs representan un punto de partida importante en la búsqueda de este tipo de moléculas que permitan recuperar el balance del metabolismo.

Muchos de los medicamentos actuales tienen como origen a las plantas medicinales. En investigaciones recientes, se ha evaluado el potencial terapéutico de *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida*, las cuales han presentado actividad antihiperglucemiante. Cabe señalar que se han identificado algunos componentes químicos como triterpenos, fenoles, flavonoides, polisacáridos y ácidos grasos; los cuales tienen un alto potencial de ser ligandos a PPARs (Abdel-Haleem *et al.*, 2017 y Pérez-Ramírez *et al.*, 2016).

La importancia de esta investigación reside en determinar el potencial agonismo dual a PPARs de las especies vegetales a estudiar, y con ello, sentar las bases para la investigación de entidades químicas específicas que permitan postularse como opciones importantes en el tratamiento y/o prevención de diabetes. La obtención de extractos con actividad agonista dual de PPARs permitirá corregir el desbalance energético característico de la fisiopatología de la enfermedad, y con ello mejorar la sensibilidad a la insulina y a su vez la oxidación de ácidos grasos.



XV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efectos producen los extractos de *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida* en la expresión de PPARs y sus genes regulados?.

XVI. HIPOTESIS

Los extractos de *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida* afectan la expresión de PPARs y sus genes regulados.

XVII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto agonista a PPARs de extractos con actividad antihiper glucemiante de *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar extractos de *Smilax cordifolia*, *Smilax domingensis* y *Tagetes lucida*, con actividad antihiper glucemiante, mediante prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) en animales sanos.
2. Realizar el análisis fitoquímico de los extractos con actividad antihiper glucemiante.
3. Evaluar el efecto de los extractos con actividad antihiper glucemiante sobre la expresión de PPAR α / PPAR γ y sus genes regulados (GLUT4 y FATP) en la línea celular C2C12.
4. Evaluar los compuestos activos sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1.



XVIII. METODOLOGÍA

El material vegetal se colectó en diferentes localidades, según la especie: *Tagetes lucida*; Apapasco, Puebla. *Smilax cordifolia* y *Smilax domingensis*; San Agustín Loxicha, Oaxaca. Se realizó un cotejamiento de las plantas en el Herbario Nacional de México de la Universidad Autónoma de México, en Ciudad de México (MEXU). El número de registro de los ejemplares de herbario cotejados fue 2773384 para *Tagetes lucida*, 1198144 para *Smilax domingensis* y 1341543 para *Smilax cordifolia*.

Posteriormente se secó bajo aireación constante. Se trituró el material seco en un molino eléctrico (Wiley modelo 4), usando una rejilla de 1 mm de diámetro y se obtuvieron los extractos de cada especie.

Para los extractos acuosos: se tomaron de cada planta 100 g del material seco y molido, y se adicionó 1 L de agua. Se colocó en un matraz de bola acoplado a un tubo refrigerante de vidrio y se calentó a 50°C por 1 h (Alarcón-Aguilar *et. al.*, 2007). Posteriormente se filtró mediante un embudo acoplado a un matraz Kitazato y bomba de vacío. Y se colocó en refractarios hasta evaporar el agua mediante aireación constante en una campana de flujo laminar, finalmente se raspó la película formada con ayuda de una navaja y se depositó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Para los extractos clorofórmicos: se tomó de cada planta molida y seca 50 g, y se agregaron 500 mL de cloroformo (Merck®). Se realizó una extracción continua mediante soxhlet, posteriormente se colocó el extracto en un evaporador rotatorio (Buchi®) para concentrarse. Finalmente se colocó el extracto en un frasco ámbar y se dejó en una campana de flujo laminar con aireación constante para eliminar las trazas de cloroformo restantes que se pudieran contener.

Experimentos *in vivo*

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 4 a 6 semanas de edad, obtenidos del bioterio de la UAM-I, los cuáles fueron mantenidos en condiciones de alimentación, con agua y comida *Ad libitum*, así como ciclos de luz–obscuridad de 12 h. El manejo de los



animales se llevó a cabo con base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

Se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (PTGO), la cual fue la base para la selección de los extractos activos, ya que sólo aquellos extractos que tuvieron actividad antihiper glucemiante se evaluaron en el modelo *in vitro*. Esto se debe a que el mecanismo de acción implicado en la acción antihiper glucemiante contempla la participación de PPAR γ y GLUT4.

Los animales fueron divididos en los siguientes grupos:

Tabla 3. Tratamientos experimentales en ratones macho de la cepa CD1 de 6 semanas de edad.

Tratamiento		Dosis	n=5
Control +	Pioglitazona	20 mg/kg	
Control -	Solución salina	4 ml/kg	
<i>S. cordifolia</i>	Extracto acuoso	500 mg/kg	
	Extracto clorofórmico	500 mg/kg	
<i>S. domingensis</i>	Extracto acuoso	500 mg/kg	
	Extracto clorofórmico	500 mg/kg	
<i>T. lucida</i>	Extracto acuoso	500 mg/kg	
	Extracto clorofórmico	500 mg/kg	

Previo al estudio se dejaron en ayuno por 12 horas y se les cuantificó la glucosa en sangre venosa. Posteriormente fueron administrados vía oral con los tratamientos anteriormente mencionados. Después de 20 minutos, se administró una dosis única de dextrosa (2 g/kg) vía intragástrica, y se cuantificó la glucemia a los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos.



Análisis Fitoquímico

La identificación de los metabolitos secundarios de los extractos clorofórmicos y acuosos solo se analizó en las especies *Smilax cordifolia* y *Smilax domingensis* debido a que solo los extractos de dicho material vegetal presentaron actividad antihiper glucemiante. Se realizó la identificación de la presencia de los principales constituyentes, tales como son:

Fenoles y Flavonoides

Se realizó la prueba colorimétrica de cloruro férrico en la cual se utilizó una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que se neutralizó con hidróxido sódico hasta que se formó un leve precipitado de FeO(OH). La sustancia orgánica se disolvió en agua y metanol, luego se añadió la disolución neutra de cloruro: se formó un complejo coloreado transitorio o permanente, considerando:

- Desarrollo de una coloración naranja rojizo a violeta, flavonoides
- Desarrollo de una coloración verde intensa a olivo, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalol, derivados del ácido gálico (Passador *et al*, 1996).

Esteroles

La identificación de estos metabolitos secundarios se realizó con el ensayo de Liebermann-Burchard que consistió en una reacción donde el esteroles se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial de esta prueba ocurre la protonación del grupo -OH del esteroles habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ión carbonio 3,5 colestadieno que constituye la formación de color (Harborne, 1976b)

Saponinas

Para la identificación de la presencia de saponinas en los extractos de *Smilax cordifolia* y *Smilax domingensis* únicamente se adicionó H₂OΔ y se mantuvo en agitación, se



consideró positivo para la presencia de saponinas ante la formación de espuma permanente (Chhabra *et al*, 1989)

Para los siguientes tipos de metabolitos se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio de 2.5 x 4 cm recubiertas con gel de sílice. Las placas se revelaron con una lámpara de luz ultravioleta UV-254/366 nm, así como la utilización de reveladores. Para la elución de las placas cromatográficas se utilizó un sistema de diclorometano-hexano (25:75) como fase móvil.

Alcaloides

La detección de alcaloides se realizó por medio de CCF utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff el cual se preparó mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se dejó en reposo por 24 horas, se decantó y se aforó a 100 ml. La presencia de alcaloides se detectó por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se adiciona el reactivo al extracto ácido de alcaloides (Dominguez, 1973).

Triterpenos

La identificación de este tipo de metabolitos secundarios se realizó por medio de CCF, utilizando como revelador el sulfato cérico, que se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 300 g de hielo y posteriormente se añadieron 12 g de sulfato cérico. En campana de extracción añadieron lentamente 22.2 ml de ácido sulfúrico. Se dejó derretir el hielo, se puso en agitación con ayuda de un magneto y se reservó en frasco ámbar a temperatura ambiente (Ugochukwu *et al.*, 2013).

Taninos

Se utilizó el método de vainillina. Este método es específico para taninos condensados, por medio de CCF, utilizándose el revelador de Vainilla/HCl y tomando como positivo la aparición de manchas de coloración rosa o rojo cereza, donde la vainillina en medio ácido reacciona con el anillo a meta-sustituído del flavano para formar un cromóforo.



La principal desventaja de este método consiste en que se reduce la capacidad de reaccionar la vainillina con el grado de polimerización de las proantocianidinas, porque la reacción se da preferentemente con las unidades terminales (Butler, 1982).

Preparación del revelador: En un baño de hielo se colocó una botella ámbar forrada en aluminio. Se midió 100 ml de metanol y 1 g de vainillina. Se disolvió la vainillina en 20 ml de metanol, se adicionó lentamente 1 ml de ácido sulfúrico bajo la campana de flujo laminar y posteriormene se agregó el resto de metanol, se etiqueto y se reservó en refrigeración.

Experimentos *in vitro*

Funcionalidad celular. Se cultivaron células C2C12 5×10^3 en placas de 96 pozos en 200 μ L de medio DMEM, a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) cambiando el medio cada 2 días; hasta llegar al 80% de confluencia. Los extractos clorofórmicos fueron diluidos en DMSO 4% y se evaluaron a concentraciones de 1, 10, 20, 40 y 80 μ g/mL (por triplicado). Se incubaron las células durante 24 horas, y se determinó la funcionalidad celular mediante la prueba de MTT (bromo de 3 (4,5 dimetil-2-triazol-2,5) difenil tetrazoilo). Se consideraron a las células metabólicamente activas a aquellas que reducen el MTT en formazán. Se utilizó un lector de placas de Elisa (Thermo Scientific modelo Multiskan FC) para cuantificar la absorbancia del compuesto colorido a 570 nm.

Cultivo celular. Se realizó el cultivo de la línea C2C12 a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de 6 pozos con medio Eagle modificado por Dulbecco (8×10^4 células por pozo), con glucosa 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (0.1 mM), gentamicina, complementado con 10% de suero fetal bovino. Se reemplazó el medio cada 2 días, hasta llegar a confluencia. Como controles positivos se utilizaron pioglitazona (25 mM) como agonista PPAR γ , fenofibrato (10mM) en 1.5 ml de DMEM como agonista PPAR α .



Extracción del RNA total . Se utilizó el método descrito por el proveedor Invitrogen del reactivo TRIZOL (método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987). Las células (1×10^4) se lisaron en 400 μ l de TRIZOL en campana de flujo laminar. Se incubaron en frío, después de centrifugar, al sobrenadante se le adicionó 200 μ l de cloroformo por cada ml de TRIZOL, agitando manualmente. Posteriormente se centrifugó, y a la fase acuosa se le agregaron 500 μ l de isopropanol, y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Enseguida, se centrifugo a 14,000 x g, 10 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se adiciono 1 ml etanol al 75%, se agito en el vórtex y centrifugo a 14,000 x g, 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró y se lavó con 250 μ l de etanol al 75% y se centrifugó a 14,000 x g, por 5 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 20 μ l de agua libre de RNasas, y se almaceno a -70°C , hasta su utilización para las reacciones de RT-PCR. Para cuantificar y determinar la pureza del RNA se determinaron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm (RNA y proteínas, respectivamente). La integridad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer de electroforesis Tris-borato/EDTA (TBE) y teñidos con bromuro de etidio, se tomó una alícuota de 0.5 μ g de muestra y 2 μ l de buffer de carga, se separó a 75-80 V por 45 minutos. La imagen se observó bajo luz ultravioleta.

La reacción de transcripción en reversa (RT). Se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa ImProm II a partir de 2 μ g de RNA total de las células C2C12; también se utilizaron random primers 0.5 μ g/ μ l. Un volumen total de 20 μ l de reacción se incubó en el termociclador select Cyclor (BioProducts, west Palm Beach, EUA), con el siguiente programa de ciclos: inicio 25°C por 5 minutos, seguido por la extensión a 42°C por 55 minutos y, por último, se detuvo la reacción inactivando la enzima calentando a 70°C por 15 minutos y enfriando a 4°C por 5 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa en “tiempo real” (PCR) . El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master plus SYBR Green 1”. Para el análisis de expresión se utilizaron primers diseñados a partir de secuencias de genes de *Mus musculus*, utilizando como gen constitutivo al 36B4. Los genes a evaluados fueron: PPAR γ , PPAR α FATP1, GLUT-4. Como se muestra en la tabla 4.



Tabla 4. Características y secuencias de los primer directo y primer reverso para el análisis de la expresión de genes en la línea celular de miocitos C2C12

Genes	Primer directo	Primer reverso	Tamaño del producto (pb)
36B4 Gene Bank NM_007475.2	5'-AAGCGCGTCTGGCATTGTCT-3'	5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3'	135
PPAR- α Gene Bank NM_011145	5'-TGGAGCTCGATGACAGTGAC-3'	5'-GTACTGGCTGTCAGGGTGGT-3'	161
PPAR- γ Gene Bank NM_011146.1	5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3'	5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3'	217
GLUT-4 Gene Bank NM_009204.2	5'-GATTCTGCTGCCCTTCTGTCT-3'	5'-ATTGGACGCTCTCTCCAA-3'	168
FATP-1 Gene Bank NM_011977.3	5'-ACCAGTGTCCAGGGGTACAG-3'	5'-TGCTCCCAGCTGACATGAG-3'	174

El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo ThermoScientific, EUA. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ l tenía 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM. Se siguió un programa de amplificación para SYBR Green con un primer segmento de 10 min a 95°C para la preincubación de la enzima, un segundo segmento de amplificación constituido por 35 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95°C por 10 s a una rampa térmica de 20°C; un alineamiento a 61°C por 7 s a una rampa térmica de 20°C; una amplificación a 72°C por 10 s a una rampa térmica de 20°C. Se realizó un programa por el análisis de temperatura de fusión (melting) para verificar la amplificación específica, que consiste en el seguimiento de la desnaturalización lenta del producto final de amplificación, donde se obtiene el punto en el que la pérdida de la fluorescencia refleja la T_m del producto específico de amplificación (Fasshauer *et al.*, 2001a; Fasshauer *et al.*, 2001b; Fasshauer *et al.*, 2002; Fasshauer *et al.*, 2003a; Fasshauer *et al.*, 2003b).



Tinción de rojo oleoso para determinación de acumulación de lípidos

Para evaluar la acumulación de lípidos se cultivaron fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de cultivo con medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) (8 X 10⁵ células por pozo), piruvato de sodio (1 mM), glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (0.1mM), gentamicina, complementado con 10% de suero fetal bovino. La diferenciación de fibroblastos a adipocitos fue inducida con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM), dexametasona (DX, 0.25 µM) e insulina (5 µg/ml) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina (5 µg/ml), sin MIX, sin DX y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio sin suplemento de insulina se reemplazó cada dos días. Una vez expresado el fenotipo de adipocitos, y hasta observar una forma circular-oval con depósitos de grasa en forma de pequeñas vacuolas (Fashauer *et al.*, 2001). fueron tratados con los extractos de *Smilax cordifolia* (10 µg/ml), *Smilax domingensis* (1 µg/ml) a 24 h. Se utilizó pioglitazona como control positivo a una concentración de 5 µM y bezafibrato 5 µM. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con formaldehído al 3.7% por 30 min a temperatura ambiente. Después fueron lavadas 3 veces con PBS frío. A continuación, fueron teñidas con 1.2 mg/ml de rojo oleoso (Oil Red O dye/60% de solución de isopropanol, Sigma-Aldrich) por 10 min. Se retiró el rojo oleoso y se lavó 3 veces con PBS/etanol (10% v/v). Los adipocitos fueron fotografiados en microscopio a 10 X. Finalmente, el rojo oleoso contenido en los adipocitos se extrajo a través de agitación constante por 15 min con isopropanol previamente preparado al 4% de Nonidet P-40 y evaluado por espectrometría a 510 nm. Después los datos fueron normalizados con el control para determinar la acumulación de lípidos.

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante una prueba ANOVA complementada con una prueba Duncan para comparar diferencias entre los controles y los tratamientos, así como entre los mismos tratamientos, considerando un intervalo de confianza del 95% y utilizando el paquete estadístico NCSS 2000 (NCSS software, Kaysville, UT, USA)



XIX. RESULTADOS

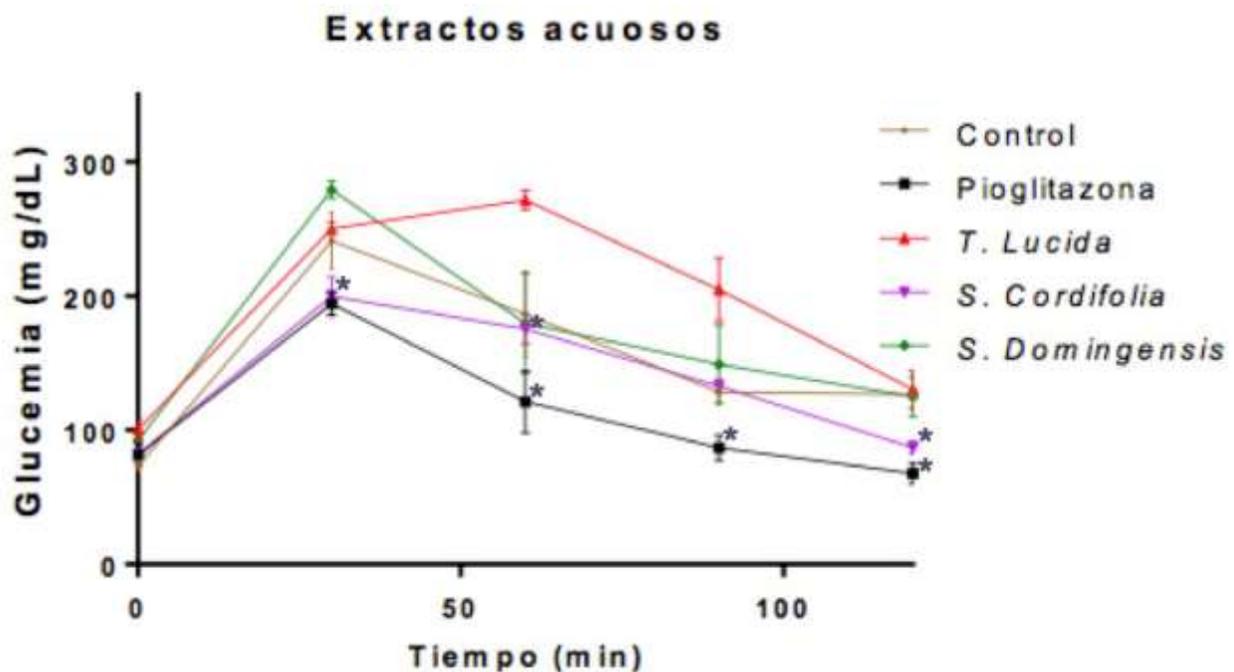
Para realizar en trabajos posteriores una estandarización de los compuestos, que permita confirmar la estabilidad de el o los principios activos de plantas medicinales, es necesario realizar adecuadamente la extracción así como conocer el rendimiento de cada uno de los extractos.

En general, los extractos acuosos tienen un mayor rendimiento respecto a los extractos clorofórmicos en todas las especies vegetales trabajadas, y de manera particular se observa que se obtuvo un mayor rendimiento del extracto acuoso de *T. lucida*, seguido por el extracto clorofórmico de *S. cordifolia*, y finalmente el extracto acuoso de *S. Cordifolia*. Con respecto a los extractos clorofórmicos, fue mayor para *T. lucida*, seguido del extracto de *S. cordifolia* y finalmente el extracto de *S. domingensis*.

Tabla 5. Porcentaje del rendimiento obtenido de los extractos acuosos y de los extractos clorofórmicos de las especies vegetales evaluadas.

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO	
EXTRACTO	RENDIMIENTO (%)
Acuoso de <i>S. cordifolia</i>	22.26
Clorofórmico de <i>S. cordifolia</i>	20.28
Acuoso de <i>S. domingensis</i>	8.1
Clorofórmico de <i>S. domingensis</i>	14.3
Acuoso de <i>T. lucida</i>	7.8
Clorofórmico de <i>T. lucida</i>	33.6

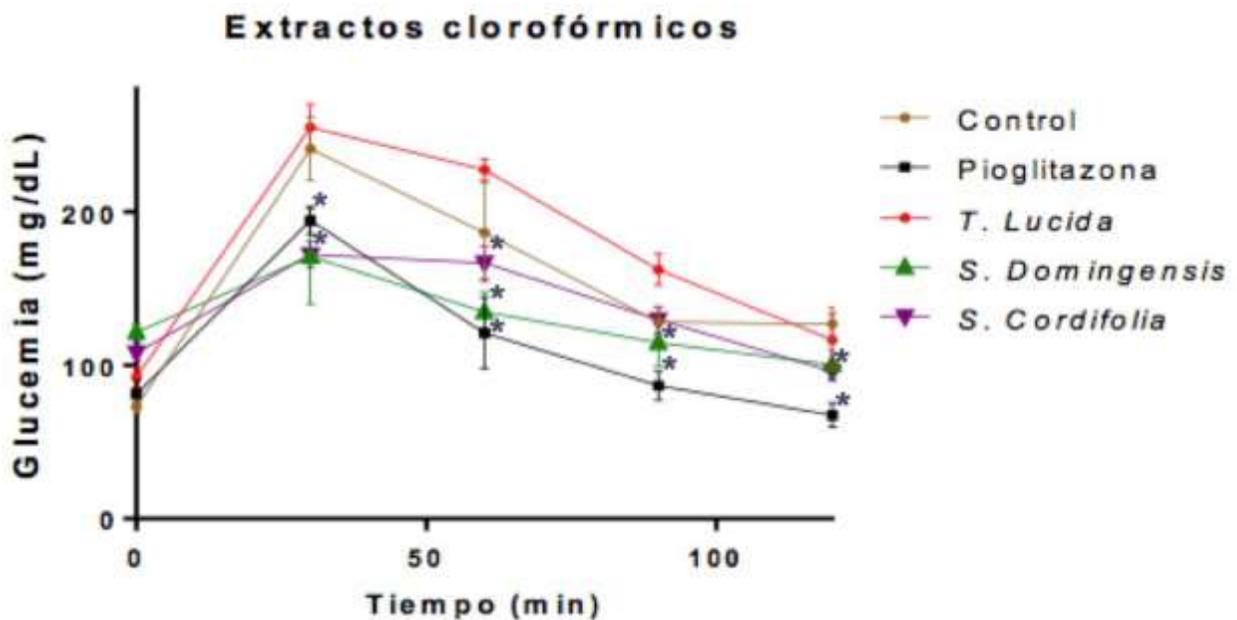
Una vez obtenido los extractos fueron evaluados mediante una PTGO, con la finalidad de determinar cual o cuales de los extractos tiene actividad antihiper glucemiante, y por ende potencial acción sobre los PPARs. En la gráfica 1 se muestra el efecto de los extractos acuosos sobre la glucemia, tras 12 horas de ayuno y una posterior carga oral de dextrosa, mediante una cinética a los tiempos de 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se observa que a los 30 minutos, el extracto acuoso de *S. cordifolia* disminuye el pico hiper glucémico, comparado con el grupo control, e incluso el efecto es similar al control positivo pioglitazona. El descenso en la glucemia para este grupo se mantiene constante durante los 60, 90 y 120 minutos. Sin embargo, el extracto acuoso de *T. lucida* aumentó la glucemia transcurridos cada uno de los tiempos, respecto al control.



Gráfica 1. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral en ratones CD1 sanos con ayuno de 12 h, administración intraperitoneal de los extractos acuosos. Media + E.E.M. n=5.

*Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

En la gráfica 2 se muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la glucemia de ratones sanos de la cepa CD1 en la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Se logró determinar que los extractos clorofórmicos de *S. cordifolia* y *S. domingensis* reducen significativamente el pico hiperglucémico, transcurridos 30 minutos de la administración de dextrosa, dicha reducción es incluso mayor al control positivo. Mientras que a los tiempos 60, 90 y 120 minutos, la disminución del pico hiperglucémico es mayor en el grupo pioglitazona, sin embargo en dichos tiempos, los extractos clorofórmicos de *S. cordifolia* y *S. domingensis* continúan disminuyendo significativamente los niveles de glicemia con respecto al control. Sin embargo, para el caso de *T. lucida*, se observa un aumento de la glucemia en los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos.



Gráfica 2. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral en ratones CD1 sanos con ayuno de 12 h, administración intraperitoneal de los extractos clorofórmicos. Media + E.E.M. n=5.

*Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Como parte de los objetivos planteados en la presente tesis, se continuó con un análisis fitoquímico general a través de CCF para conocer la presencia de grupos de compuestos en los extractos evaluados, y con ello un posible fraccionamiento biodirigido. En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis fitoquímico, donde se refleja el tipo de metabolitos identificados en las especies vegetales estudiadas con actividad antihiper glucemiante..

Para el extracto acuoso de *S. cordifolia* se encontraron fenoles, flavonoides y saponinas. Para el extracto clorofórmico de *S. cordifolia* se encontraron de la misma manera fenoles y saponinas, y no se detectó la presencia de flavonoides, esteroides, alcaloides y terpenos.

En el caso del extracto clorofórmico de *S. domingensis* se identificó la presencia de los siguientes metabolitos: Fenoles, esteroides, alcaloides, terpenos y saponinas

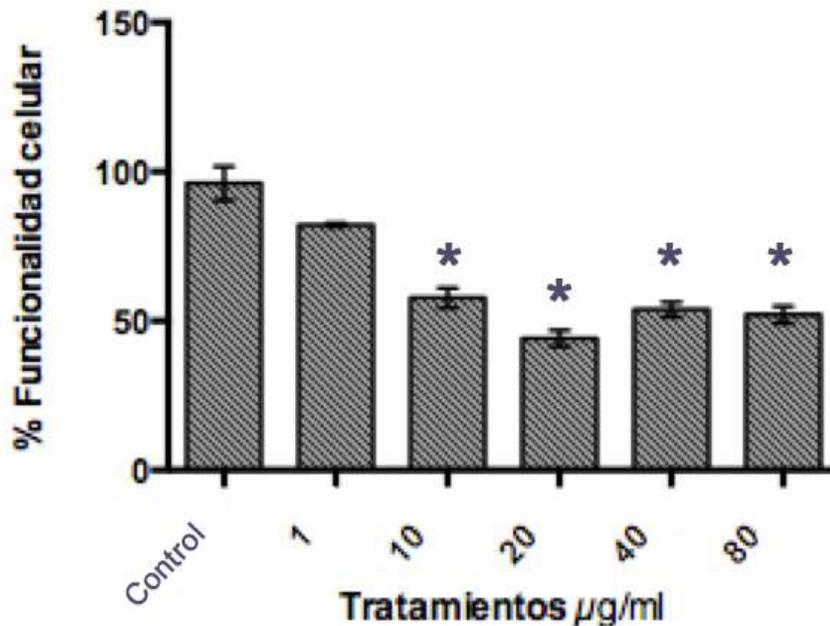
Tabla 6. Se muestran los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de *S. cordifolia* y *S. domingensis*

Metabolito	Prueba	<i>S. cordifolia</i> acuoso	<i>S. cordifolia</i> Clorofórmico	<i>S. Domingensis</i> clorofórmico
Fenoles	Cloruro férrico	+	+	+
Flavonoides	Cloruro férrico	+	-	-
Esteroides	Liebermann-Burchard	-	-	+
Alcaloides	Dragendorff	-	-	+
Triterpenos	Sulfato cérico	-	-	+
Saponinas	Agitación	+	+	+



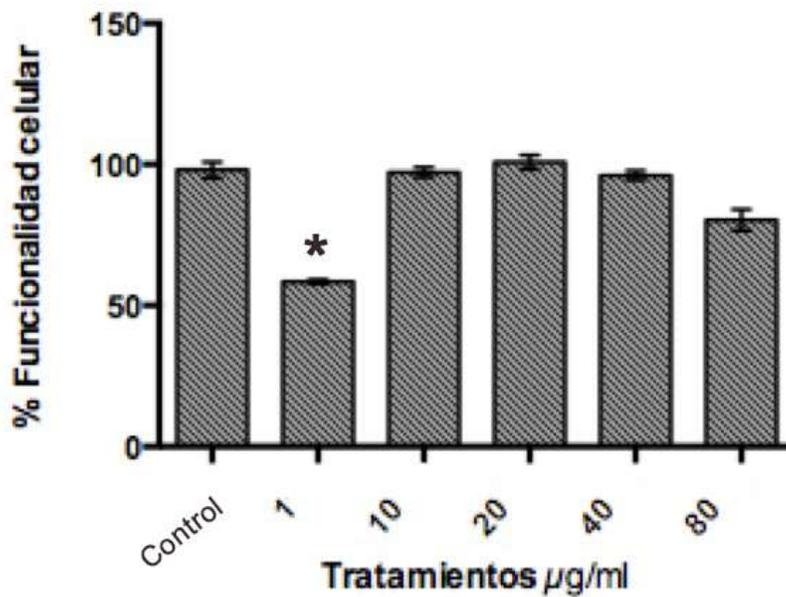
Posteriormente, se decidió continuar con la evaluación de los extractos activos en los mioblastos C2C12, para ello, se determinó el efecto de los extractos en la viabilidad celular. Esta prueba se utilizó como criterio de selección, para obtener la concentración apropiada en la que los extractos no afecten la funcionalidad del modelo celular. Por ello, se tomó como criterio, aquellas concentraciones que indujeran una funcionalidad celular >80%.

En la gráfica 3 se muestra el efecto del extracto clorofórmico de *S. domingensis* sobre la funcionalidad celular, en donde se observa que las concentraciones de 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml y 80 µg/ml comprometen la funcionalidad. Mientras que la concentración de 1 µg/ml mantiene la funcionalidad celular >80%, por lo cuál esta fué la concentración óptima utilizada.



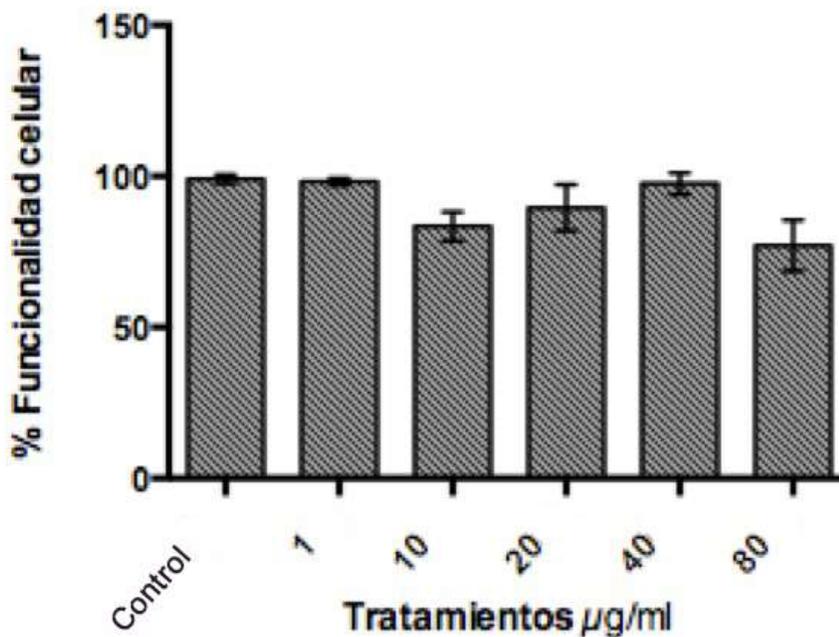
Gráfica 3. Efecto del extracto clorofórmico de *S. domingensis* sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12. Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

En la gráfica 4 se muestra el efecto del extracto acuoso de *S. cordifolia* sobre la funcionalidad celular de miocitos de la línea celular C2C12, en donde se observa que las concentraciones de 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$ no afectan la funcionalidad, mientras que la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ disminuye a <80% de funcionalidad en las células. Por lo tanto se determinó usar el extracto acuoso de *S. Cordifolia* a 10 $\mu\text{g/ml}$



Gráfica 4. Efecto del extracto acuoso de *S. cordifolia* sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12. Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

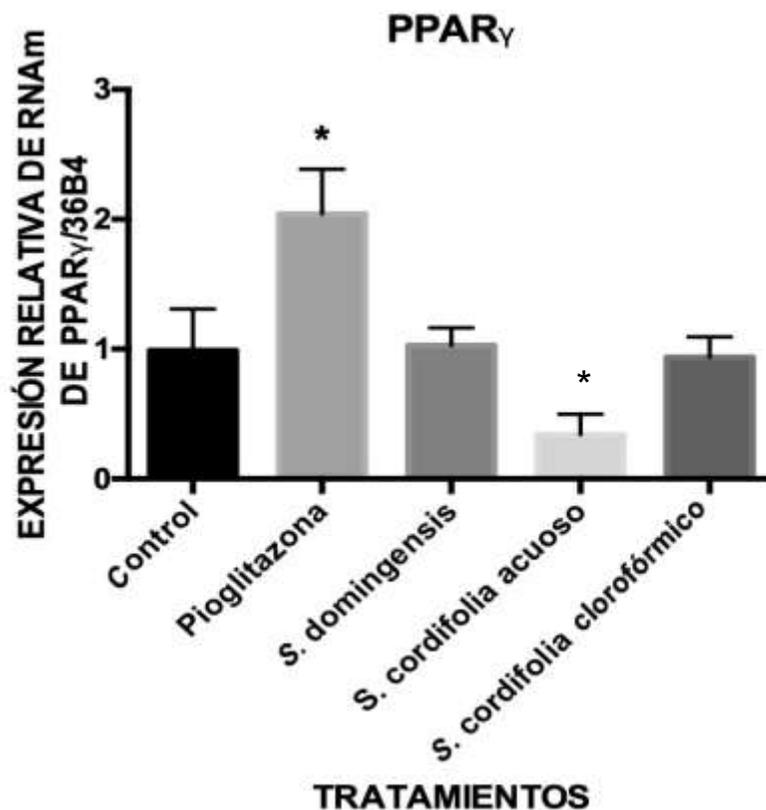
En la gráfica 5 se muestra el efecto del extracto clorofórmico de *S. cordifolia* sobre la funcionalidad celular de la línea C2C12, en donde se observa que ninguna de las concentraciones empleadas (1,10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$) interfiere en la funcionalidad de las células tratadas, ya que dicha funcionalidad se mantiene en un intervalo de entre 80-100%. Por lo que se determino utilizar la misma concentración del extracto acuoso de *S. cordifolia* al tratarse de la misma especie y no afectando la funcionalidad celular, ambos fue de 10 $\mu\text{g/ml}$.



Gráfica 5. Efecto del extracto clorofórmico de *S. cordifolia* sobre la funcionalidad celular en la línea C2C12. Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Posterior a la determinación de la concentración de los extractos a la cual no se ve disminuida significativamente la funcionalidad celular, se empleó dicha concentración para determinar el efecto de los extractos sobre los niveles de expresión génica de los PPARs y sus genes regulados. Los resultados del análisis de expresión génica se obtuvieron a partir la cuantificación de los RNAm por RT-qPCR tal como se indicó en la metodología.

En la gráfica 6 se aprecia que los tratamientos con el extracto clorofórmico de *S. domingensis* y *S. cordifolia*, no produjeron cambios significativos en los niveles de expresión de PPAR γ . Sin embargo, el extracto acuoso de *S. cordifolia* produjo un descenso importante en sus niveles de expresión. Por otro lado, el control positivo usado en este ensayo, induce un incremento significativo en los niveles de expresión génica.

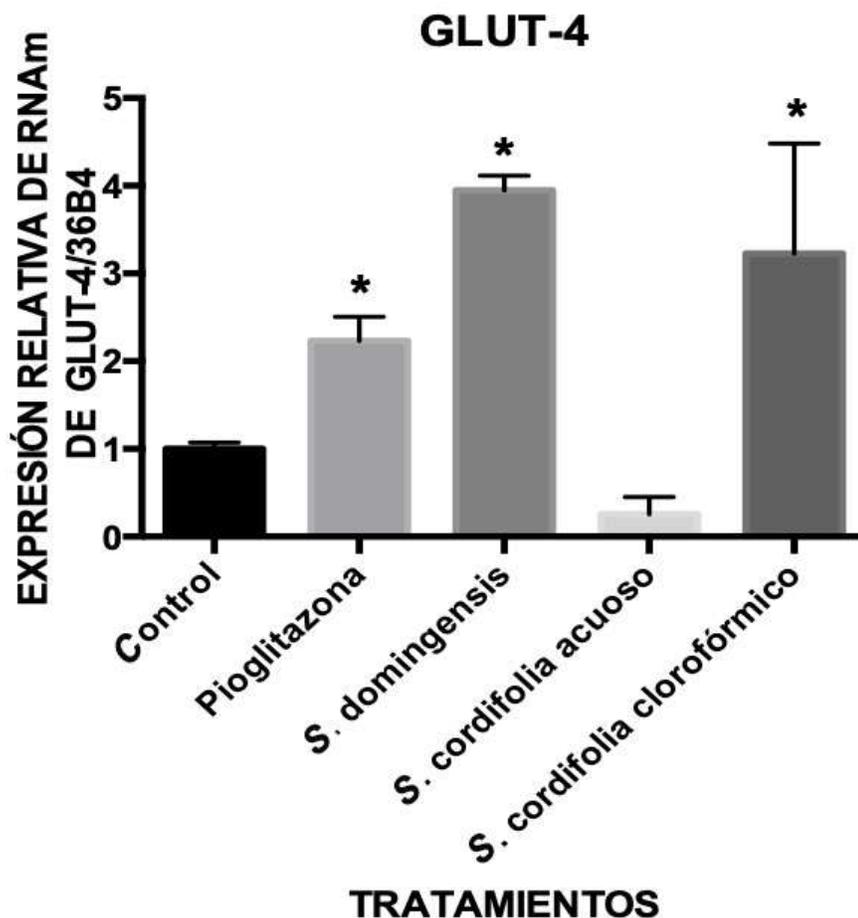


Gráfica 6. Efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la expresión del RNAm de PPAR γ . Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).



La activación de PPAR γ promueve incrementos en la expresión génica del transportador de glucosa tipo 4, lo que induce secuencialmente, un aumento en la translocación del mismo e incorporación de glucosa a la célula. Por esta razón, se decidió evaluar el efecto de los extractos sobre los niveles de expresión génica de GLUT4.

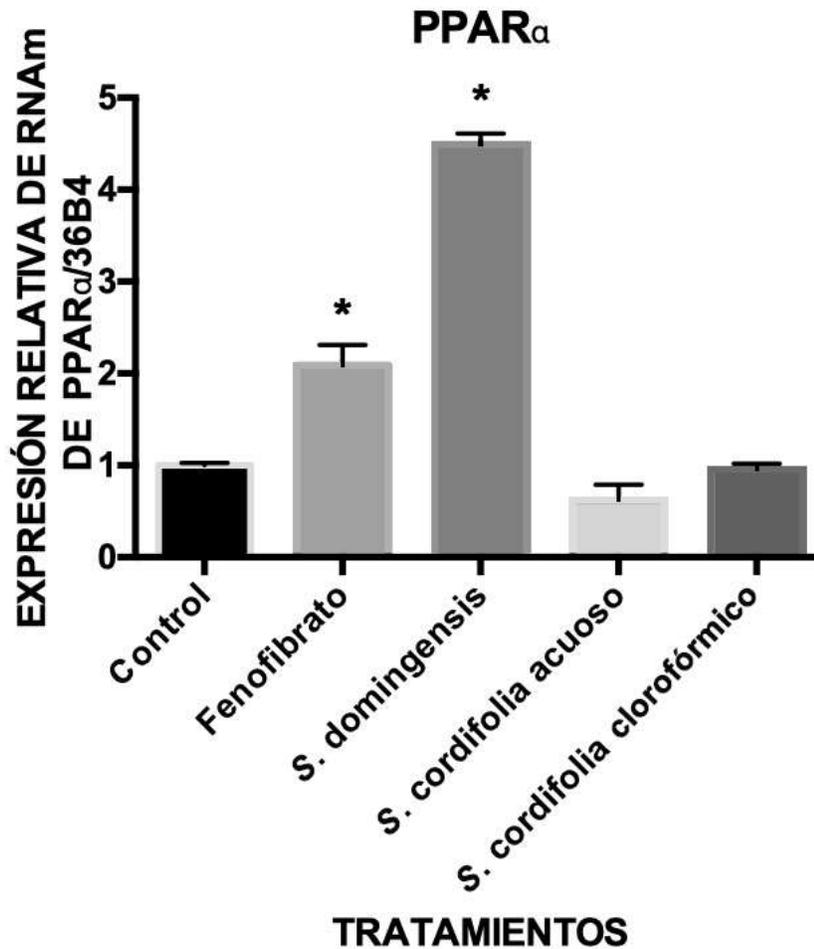
En la gráfica 7 se observa que el extracto clorofórmico de *S. cordifolia* y el extracto clorofórmico de *S. domingensis* incrementan los niveles de expresión GLUT4, a pesar de no haber inducido cambios en los niveles de expresión del RNA mensajero de PPAR γ . Sin embargo, el tratamiento con *S. cordifolia* produjo un descenso importante en los niveles de expresión génica.



Gráfica 7. Efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la expresión del RNAm de GLUT-4. Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

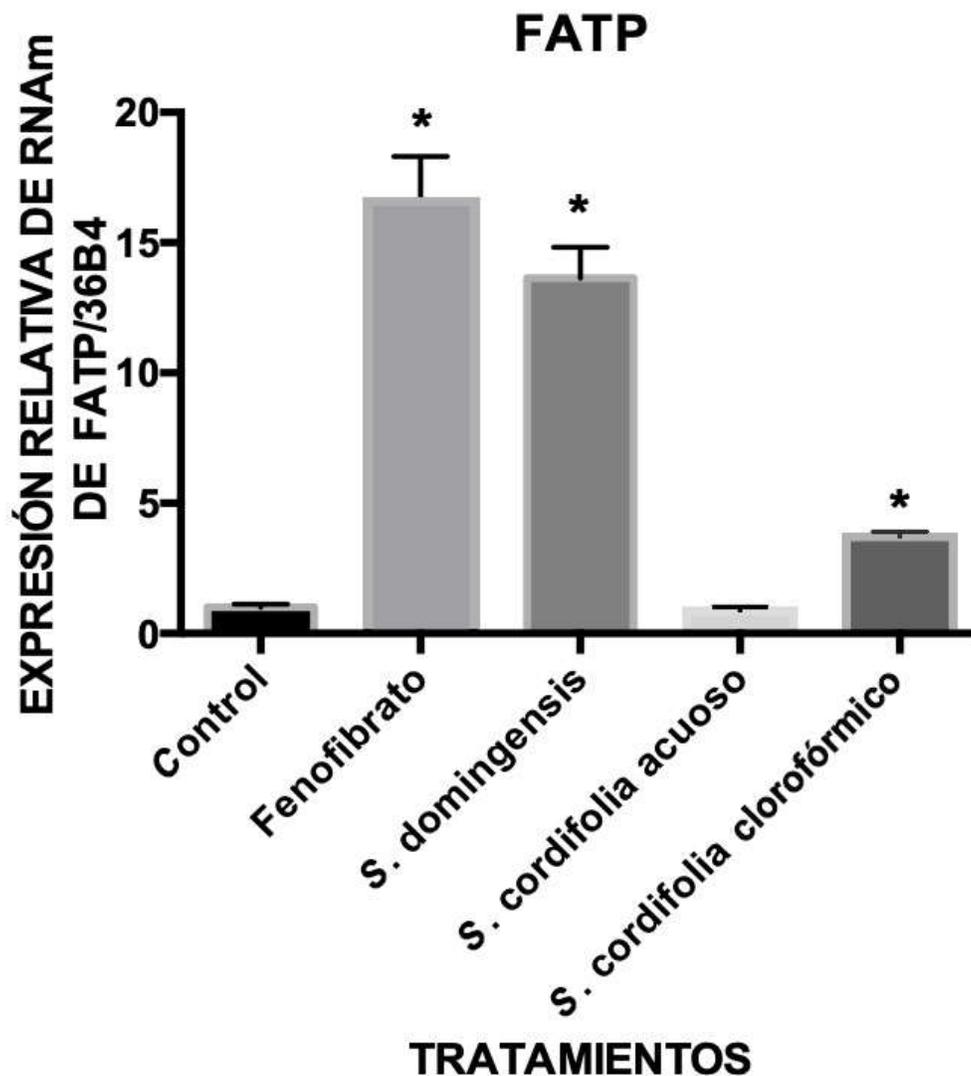


En la gráfica 8 se puede observar que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* incrementa la expresión del RNAm de PPAR α , con respecto al control e inclusive respecto al control positivo; fenofibrato. Sin embargo el extracto clorofórmico y acuoso de *S. cordifolia*, no tienen un efecto significativo sobre este gen.



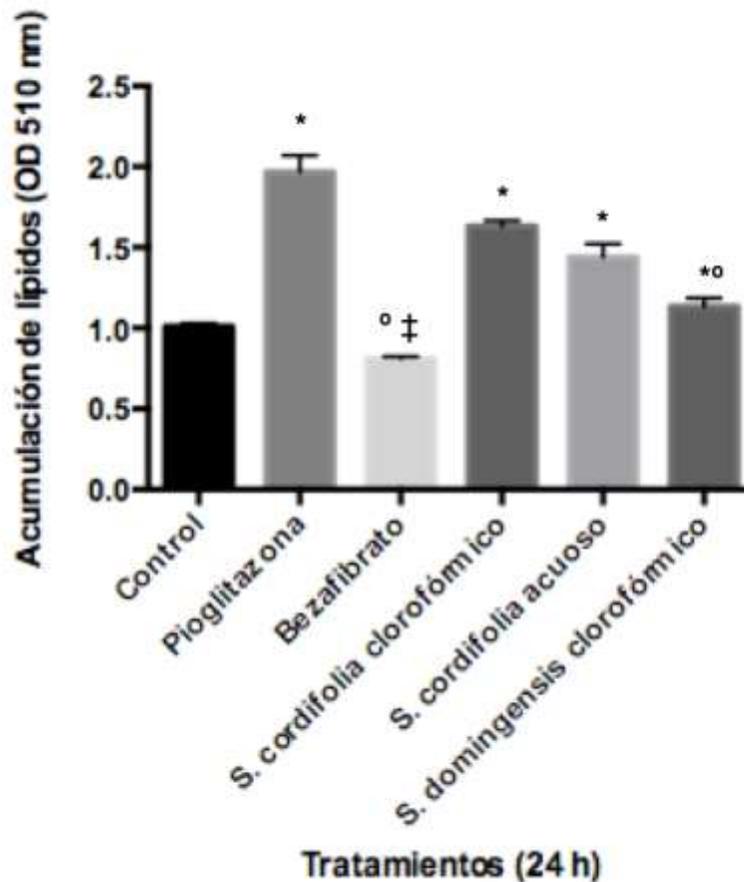
Gráfica 8. Efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la expresión del RNAm de PPAR α . Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

A continuación, se evaluó el efecto de los extractos sobre la expresión génica del transportador de membrana de ácidos grasos FATP, proteína regulada por la activación de PPAR α . En la gráfica 9 se puede observar que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* y el extracto clorofórmico de *S. cordifolia* incrementan la expresión del RNAm de FATP, sin embargo el extracto acuoso de *S. cordifolia* no tiene efecto sobre los niveles de dicho gen.



Gráfica 9. Efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la expresión del RNAm de FATP. Media + E.E.M. n=3. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

En la presente gráfica se muestra el efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. En donde se observa que después del tratamiento a 24 h, hay una diferencia significativa en los tratamientos con bezafibrato y con el extracto clorofórmico de *S. domingensis* respecto a pioglitazona, y únicamente se observa una disminución de lípidos en el tratamiento con bezafibrato respecto al control, mientras que en los demás tratamientos se observa un incremento en la acumulación de lípidos.



Gráfica 10. Efecto de los extractos de *S. domingensis* y *S. cordifolia* sobre la acumulación de lípidos tras 24 h de tratamiento. Media + E.E.M. n=6. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$). ° Diferencia significativa respecto a pioglitazona ($p < 0.05$). ‡Disminución significativa de lípidos respecto al CT.

A continuación se muestra una serie de fotografías observadas en el microscopio a 10X de adipocitos 3T3-L1 teñidos con rojo oleoso en donde se observa después del tratamiento a 24 h un aumento en la acumulación de lípidos en el tratamiento con pioglitazona (B) y una disminución en la acumulación de lípidos en el tratamiento con bezafibrato (C) respecto al control (A) como era de esperarse, en cuanto al tratamiento con *S. domingensis* (D) se observa una disminución en el tamaño de los adipocitos respecto al control (A) y con ello una menor acumulación de lípidos. Mientras que en los tratamientos con el extracto acuoso de *S. cordifolia* (E) y el extracto clorofórmico de *S. cordifolia* (F) se observa un aumento en la acumulación de lípidos respecto al control.

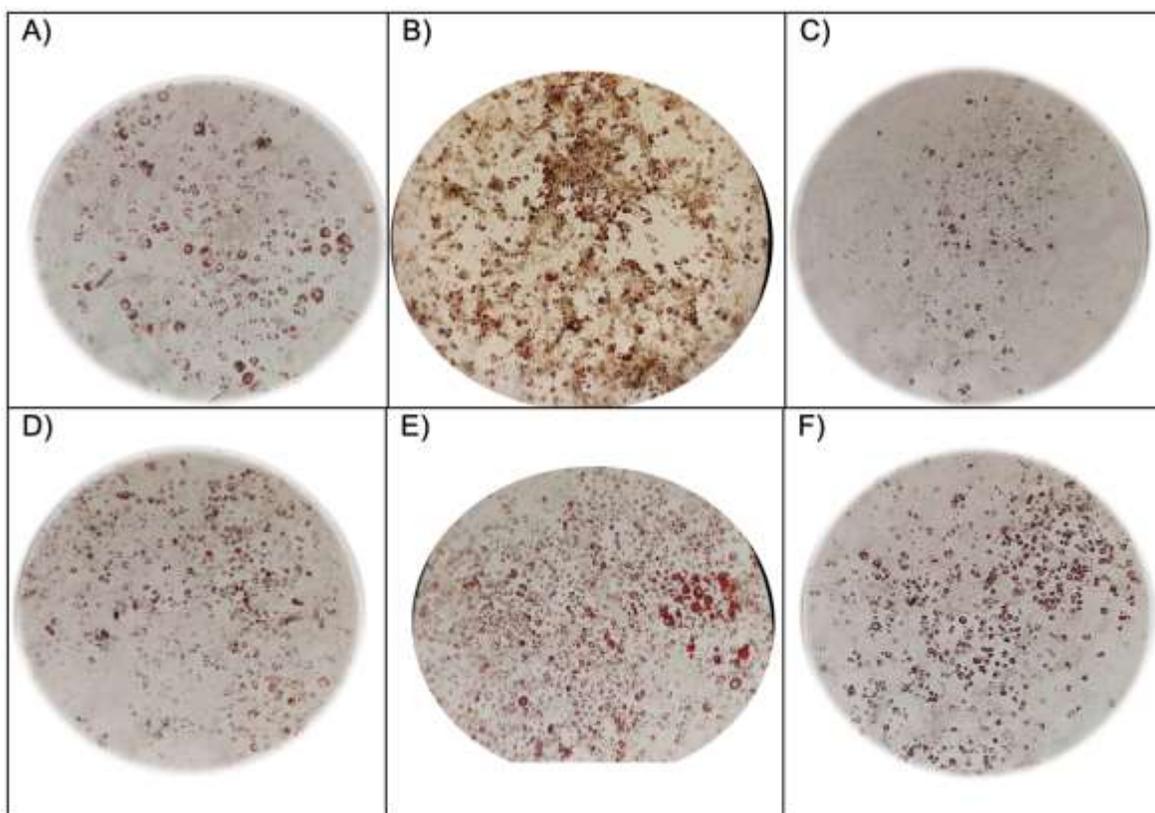


Figura 7. Fotografías microscópicas 10X de adipocitos diferenciados a partir de la línea celular 3T3-L1, teñidos con rojo oleoso después de tratamientos a 24 h n=6. A) Grupo control, B) Pioglitazona, C) Fenofibrato, D) Extracto clorofórmico de *S. domingensis*, E) Extracto acuoso de *S. cordifolia*, F) Extracto clorofórmico de *S. cordifolia*.

XX. DISCUSIÓN

Desde tiempos prehistóricos las tribus o grupos humanos en todo el mundo utilizaron a modo de prueba y error, diversos preparados galénicos que prometían curar diferentes enfermedades. Esta práctica pasó de generación en generación, por lo que el aprendizaje de nuestros antepasados sirve como antecedente para el conocimiento científico, ya que de las plantas se puede obtener y desarrollar investigaciones con fundamentos verificables. El uso de plantas medicinales como recurso terapéutico para la diabetes adquiere una relevancia fundamental por el efecto referido de quienes las utilizan (Croteau *et al*, 2000).

Frente a una prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones macho de la cepa CD1 sanos se puede observar un efecto antihiper glucemiante por parte de las especies del género *Smilax* evaluadas. Nuestros resultados muestran que tanto el extracto acuoso de *S. cordifolia* como los extractos clorofórmicos de *S. cordifolia* y *S. domingensis* disminuyeron el pico hiper glucémico en la PTGO. Para el caso de *T. Lucida*, no se observó efecto antihiper glucemiante, a pesar de que se ha demostrado un potencial efecto hipoglu cémico. La disminución de los niveles de glucosa mostrados en la PTGO después de los 30 minutos, podría deberse a que de manera general las plantas del género *Smilax* presentan flavonoides y ácidos grasos, los cuales son potenciales ligandos a PPARs (Martins *et al.*, 2014). Por otro lado, se sabe que algunas plantas son más ricas en carbohidratos (Muhammad *et al.*, 2017), lo cual podría estar asociado con el aumento de glucosa observado en *T. Lucida*.

Por otra parte, los metabolitos secundarios que producen las plantas son regulados dependiendo diversas condiciones ambientales; como la temperatura, desbalance osmótico, hipoxia, radiación UV, disponibilidad de minerales y patógenos, por lo que las concentraciones de cada uno de los metabolitos secundarios presentes en las plantas varía por la especie, época del año, por las condiciones en las que se desarrollan y otras condiciones a las que se encuentran expuestas (Iriti y Faoro, 2009). Por ello, el rendimiento de los extractos obtenidos variará dependiendo las condiciones mencionadas y los solventes con los que se extraen. De acuerdo a los resultados



obtenidos, de manera general, los extractos acuosos tienen un mayor rendimiento respecto a los extractos clorofórmicos en todas las especies vegetales trabajadas, y de manera particular se observa que se obtuvo un mayor rendimiento del extracto acuoso de *T. lucida*, seguido por el extracto clorofórmico de *S. cordifolia*, y finalmente el extracto acuoso de *S. Cordifolia*. Con respecto a los extractos cloroformicos, fue mayor para *T. lucida*, seguido del extracto de *S. cordifolia* y finalmente el extracto de *S. domingensis*.

La metodología seguida para el análisis fitoquímico contempló la detección de 6 de los principales grupos de metabolitos secundarios, generalmente relacionados con algunas actividades biológicas. En el análisis fitoquímico preliminar de la especie *S. cordifolia* se partió de un extracto acuoso, debido a que este disolvente tiene la capacidad de extraer compuestos polares, además de no ser costoso, ser más práctico, no tóxico y menos agresivo con el medio ambiente comparado con otros solventes. En esta especie vegetal se identificaron fenoles, flavonoides y saponinas, mismos grupos de metabolitos secundarios que fueron identificados en otros estudios experimentales por Pérez-Ramírez y colaboradores. Sin embargo, ellos reportan la presencia de otros grupos de metabolitos como son taninos y alcaloides. *S. cordifolia* es rica en ácido rosmarínico, hesperidina y β -sitosterol (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016). Es necesario hacer un análisis fitoquímico mas profundo que nos permita determinar la presencia de dichos compuestos. El análisis realizado en el presente estudio es mas general, y el rango de detección de compuestos es limitado, por lo que es difícil detectar compuestos que se encuentran a una baja concentración. Para el caso particular de los alcaloides, existe una diferencia en la metodología empleada para el análisis fitoquímico de este grupo de metabolito secundario, puesto que dicho grupo de investigación utiliza el reactivo de Meyer, mientras que en nuestro estudio se empleo el reactivo de Drangendorff, que es el reactivo más común para la detección de la presencia de alcaloides. Cabe resaltar que estos análisis son preliminares y se evalúan únicamente de manera cualitativa, además de que la interpretación de los resultados se basa en pruebas colorimétricas que si bien nos arroja información importante, se requiere de técnicas fitoquímicas de mayor precisión, con la finalidad de identificar moléculas. Por otra parte, el extracto acuoso de *S. domingensis* no fue evaluado ya que no presentó actividad antihiper glucemiante.



Como se mencionó anteriormente, se identificaron de manera general, fenoles, esteroides, alcaloides, terpenos y saponinas en las especies estudiadas, de la misma manera que Soledispa y colaboradores, los cuales identificaron ácido pentanoico, ácido octadecanoico y ácido hexadecanoico lo que sugiere la presencia también de ácidos grasos, los cuales pudieran estar relacionados con la actividad agonista a PPARs pues de acuerdo a la literatura, los ácidos grasos son potenciales ligandos que podrían estar uniéndose para su activación y de ésta manera favoreciendo la expresión de genes que regulan el metabolismo de la glucosa. (Soledispa *et al.*, 2018) Sin embargo, son pocos o casi nulos los experimentos fitoquímicos biodirigidos para estas especies del género *Smilax*, por lo que sería necesario evaluarlo para poder identificar la presencia de éstos en las especies vegetales.

En el caso particular del extracto clorofórmico de *S. domingensis* se identificó la presencia de los siguientes metabolitos: Fenoles, esteroides, alcaloides, terpenos y saponinas dichos datos coinciden con un cribado fitoquímico preliminar de Yaque y colaboradores quienes identificaron la presencia de flavonoides, alcaloides, cumarinas, catequinas, taninos pirocatecólicos, grasas y / o aceites volátiles, saponinas, quinonas, azúcares reductores y triterpenos y / o esteroides estos compuestos han mostrado efectos antiproliferativos promisorios *in vitro* y con efectos antitumorales en estudios *in vivo*, aumento en los niveles de insulina en ratones diabéticos, efecto hepatoprotector, además de propiedades antiinflamatorias a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos, (Xu *et al.*, 2018) Por lo que la activación de PPAR γ , podría deberse a moléculas de este grupo de compuestos, puesto que estudios han demostrado que la activación de PPAR γ inhibe a NF κ B y consecuentemente la disminución de la síntesis de citocinas proinflamatorias de tal manera que se contribuye de manera positiva a la regulación del estado inflamatorio crónico característico de los pacientes con diabetes (Feng *et al.*, 2018).

El grupo de investigación reporta la ausencia de resinas, aminas, glucósidos cardiotónicos, antocianinas, aunque es importante mencionar que la especie de *Smilax domingensis* que ellos evaluaron fue colectada en Cuba, pudiendo haber diferencia de



metabolitos de acuerdo a las condiciones de suelo y ambientales en las que se desarrollan. Mientras que en un estudio realizado mediante espectrometría de masas por Soledispa y colaboradores identificaron ácido pentanoico, ácido octadecanoico y ácido hexadecanoico los cuales se sabe que tienen actividad sobre PPARs (Soledispa *et al.*, 2018).

La identificación de los compuestos responsables de la actividad agonista dual a PPARs o de su potencial efecto sobre moléculas clave en la activación de los mismo, requerirá un fraccionamiento biodirigido del extracto activo, utilizando como modelo de estudio los cambios en la expresión génica de GLUT4 y FATP.

En México, en los últimos años el uso de plantas medicinales como recurso terapéutico adquiere una relevancia fundamental por su probada efectividad e inocuidad, ya que se utiliza en la sustitución de las materias primas de importación para la elaboración de productos en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, así mismo como potencial terapéutico en los sistemas médicos y fitoterapéuticos tradicionales como terapia coadyuvante. Si bien las plantas per sé, contienen moléculas con efectos positivos para la salud humana, la citotoxicidad puede hacerse presente de acuerdo a las dosis empleadas (Lujan *et al.*, 2011).

La técnica de MTT es una prueba que nos permite evaluar la funcionalidad celular, la cual se basa en la reducción del MTT (bromo de 3(4,5 dimetil-2-triazol-2,5) difenil tetrazolo) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la cual tiene funciones en la cadena transportadora de electrones (complejo II), Siendo las células metabólicamente activas las que reducen el MTT en formazán, en este caso cuando las células son viables la actividad de esta enzima da como resultado la coloración de las células a violeta (Mosmann, 1983). Otra prueba que se puede utilizar, es mediante Rojo Neutro, que determina el efecto citotóxico, el cual es un tinte catiónico anfifílico que ingresa a la célula en una forma no iónica por difusión pasiva y se acumula en los lisosomas donde el grado o capacidad de atrapar el colorante depende de la capacidad de la célula de mantener el gradiente de pH (Repetto *et al.*, 2008). Los ensayos de



retención de Rojo Neutro reflejan la potencial filtración del contenido lisosomal hacia el citosol seguido de un daño en la membrana. Cuando la célula muere, el gradiente de pH disminuye, el tinte no puede ser retenido. Consecuentemente, la concentración del tinte es proporcional al número de células viables (Martínez-Gómez *et al.*, 2008). En este sentido la prueba nos permite conocer si nuestro extracto o sustancia a evaluar, ocasiona la muerte celular sin embargo, en ocasiones no se desencadena la muerte celular como consecuencia directa pero las células si son afectadas de manera que modifican de manera anormal algunas funciones, por lo cual sería importante evaluar en el futuro. De acuerdo a los resultados obtenidos de la prueba de MTT, se muestra que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* disminuye la funcionalidad celular al incrementar la concentración, siendo 1 µg/ml la concentración óptima en donde la funcionalidad celular se mantiene arriba del 80%, este efecto no se observó con los extractos acuoso y clorofórmico de *S. cordifolia*, en donde la funcionalidad celular no se ve afectada si se aumenta la concentración pues ésta se mantiene arriba del 80% a pesar de incrementos en la concentración empleada.

Una vez identificados los extractos que poseen efecto antihiper glucemiante, se decidió realizar un análisis de expresión génica de PPAR α /PPAR γ , fundamentado en el potencial efecto agonista a dichos receptores, los cuales han sido asociados con los efectos antihiper glucemiantes.

De acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de RT-qPCR, el extracto clorofórmico de *S. domingensis* tiene efecto sobre la expresión del RNAm de FATP (Gráfico 9), dicho efecto puede ser asociado a la activación de PPAR α , ya que se sabe que dicha isoforma promueve la transcripción de FATP, que participa en el metabolismo de lípidos (Gross y Staels, 2007), esto es corroborado ya que también el extracto clorofórmico de *S. domingensis* promueve el incremento en la expresión del RNAm de dicha isoforma de PPAR (Gráfica 8).

Por otra parte, el extracto acuoso de *S. cordifolia* no tiene efecto sobre la expresión de PPAR γ y PPAR α ni sus genes regulados GLUT4 y FATP (Gráficas 6-9), por lo que aún es una interrogante importante el mecanismo de acción por el cual actúa, ya que existen



reportes que demuestran que el extracto acuoso de esta planta posee efecto hipoglucémico y antidiabético (Cáceres, 2009). Además, en nuestros ensayos se mostró que dicho extracto posee efecto antihiper glucemiante. Aunado a ello, en la medicina tradicional, esta planta conocida popularmente como zarsaparrilla es utilizada en decocciones o en forma de infusión para el tratamiento de la diabetes, reportando una mejoría en los niveles de glucosa por parte de los pacientes que la consumen como un tratamiento alternativo o como terapia adyuvante en conjunto con medicamentos como metformina (INI,1994). Por otro lado, el extracto clorofórmico de esta planta mantiene los niveles de expresión del RNAm de PPAR γ y promueve el incremento en la expresión de GLUT4 (Gráficas 6 y 7), sugiriendo que este extracto tiene una o varias moléculas que a su vez promueven la expresión de GLUT-4 probablemente de manera independiente a PPAR.

De acuerdo a la literatura, se sabe que el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática podría deberse a la participación de AS160, que contiene un dominio Rab/GAP. AS160 (sustrato de Akt de 160 KDa) es una proteína que en su estado no fosforilado y activo regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4, inhibiendo la exocitosis basal del transportador. AS160 es sustrato de Akt, y cuando es fosforilada, AS160 se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab del transportador GLUT4 a la membrana plasmática (McCarthy y Elmendorf, 2007).

También se ha descrito en adipocitos una vía de transporte que involucra a la proteína Cbl y a las proteínas adaptadoras APS y CAP. La formación de un complejo proteico entre APS/CAP/Cbl, permite la fosforilación de ésta última proteína por el IR. El complejo CAP/Cbl fosforilado se disocia del IR y a través de CAP interactúa con la flotilina en microdominios de la membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas, en donde Cbl recluta al complejo proteico CrkII-C3G. C3G activa a la proteína TC10, proteína G pequeña, miembro de la familia de Rho, la cual al parecer lleva a la translocación de GLUT4 (Saltiel y Kahn, 2001). O bien, la activación de isoformas atípicas PKC- λ/ζ podría darse río abajo de PI3K y de TC10, ambas PKCs pueden asociarse con PDK1 cuando ésta se ancla al PIP3 generado por la acción de PI3K, induciendo la fosforilación en los residuos de Thr402/Thr410 en el asa de activación de PKC. Por otra parte, cuando TC10



es activado interacciona con el complejo PKC/Par6/Par3, lo que induce el reclutamiento de ambas PKCs en la membrana plasmática donde son activadas favoreciendo la traslocación de transportadores de glucosa (Liu *et al.*, 2006) por lo cual es importante en el futuro continuar con la elucidación del mecanismo de acción, y si las proteínas mencionadas participan en dicho evento.

El extracto clorofórmico *S. domingensis* mostró tener efecto dual sobre la expresión del RNAm de PPAR α , PPAR γ y algunos de sus genes regulados (GLUT4 y FATP) lo que sugiere fuertemente que éste extracto posee moléculas agonistas duales de PPAR α y PPAR γ , ya que para la expresión del RNAm de estas dos proteínas transportadoras de glucosa (GLUT4) y ácidos grasos (FATP) respectivamente, se necesita de la activación de estos dos PPARs. Los compuestos presentes en el extracto clorofórmico de esta planta, tales como terpenos y flavonoides podrían ser los encargados del efecto agonista dual de PPAR α y PPAR γ (Karsenty *et al.*, 2013), sin descartar que algún otro tipo de moléculas sean las encargadas de esta acción. Por tal motivo, es importante descubrir que moléculas son las encargadas del efecto dual.

Otro aspecto importante que se debe señalar es que el extracto clorofórmico de *S. domingensis* podría actuar a través de vías de señalización para la expresión y activación de PPAR α y PPAR γ , como es el caso de algunos fármacos, plantas o frutos que pueden estar regulando tanto su expresión como la de sus genes río abajo. Por ejemplo, se sabe que la expresión del RNAm de PPAR γ y algunos de sus genes regulados puede ser a través de la activación de Akt, vía involucrada en el anabolismo/catabolismo de glucosa (Zhang *et al.*, 2013), sugiriendo la posible acción indirecta de este extracto sobre dicha vía, dando como consecuencia la regulación de PPAR α y PPAR γ . Otros experimentos han demostrado que la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) favorece la estabilidad de PPAR α en el ADN, evento que promueve la expresión de los genes que regula este PPAR (Lazennec *et al.*, 2000), siendo estas algunas maneras de efecto indirecto y posiblemente por las cuales actúa el extracto clorofórmico de que esta planta. Es importante mencionar que este extracto puede actuar río arriba de Akt, ya que se sabe que esta cinasa actúa fosforilando y activando a la proteína de unión del



elemento esteroideo 1c (SERBP1c) la cual es un factor de transcripción que promueve la expresión de PPAR γ y sus genes regulados (Hawley *et al.*, 2014).

Una alternativa adicional es que las moléculas contenidas en el extracto clorofórmico de *S. domingensis* favorezcan la expresión de otros factores de transcripción como la proteínas de unión y amplificación de la caja CCAAT β (C/EBP β) y C/EBP δ , las cuales se conoce que promueven la transcripción del ARNm de PPAR γ y sus genes regulados (Zuo *et al.*, 2006).

Posterior a la evaluación del efecto de *S. domingensis* y *S. cordifolia* a nivel de expresión génica de PPAR γ y PPAR α , se evaluó la acumulación de lípidos en adipocitos maduros diferenciados a partir de fibroblastos de la línea celular 3T3L1. De acuerdo a los resultados el extracto clorofórmico de *S. domingensis* disminuye los niveles de lípidos respecto a pioglitazona, el cual es el medicamento más usual para las primeras etapas de DT2, usado como antihiper glucemiante vía PPAR γ . Sin embargo, no es recomendado por largos periodos de tiempo debido a que sólo modulan el metabolismo en una dirección, es decir, hacia la acumulación de tejido adiposo, y en la periferia de tejidos y órganos, lo que a su vez promueve la acumulación de grasa que deriva en aumento de peso, y a su vez esto se ha asociado con osteoporosis (Pillai *et al.*, 2014) Por su parte, *S. domingensis* promueve la expresión de PPAR α , isoforma a la cual se le atribuye un aumento en la síntesis de la enzima Lipoprotein-lipasa (LPL) que se encarga de catabolismo de las VLDL y los Quilomicrones (moléculas compuestas en gran parte por triglicéridos), de este catabolismo se obtiene ácidos grasos que son destinados a metabolismo del músculo estriado (Vindas-Morera, 2013). Sin embargo, si bien se observa una diferencia significativa del tratamiento a 24 h con *S. domingensis* respecto a pioglitazona, esto no sucede respecto al control, por tanto sería necesario realizar la evaluación con tratamientos por periodos mas largos de tiempo para concluir finalmente su efecto. Por otra parte, no se observa una disminución de la acumulación de lípidos respecto al control con los extractos acuoso y clorofórmico de *S. cordifolia*.



XXI. CONCLUSIÓN

Las plantas medicinales siguen siendo una fuente amplia de biomoléculas para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diabetes.

Smilax domingensis presenta 5 grupos de compuestos: fenoles, esteroides, alcaloides, triterpenos y saponinas, por su parte *Smilax cordifolia*; fenoles, saponinas y flavonoides con potencial efecto farmacológico.

Los extractos de *Smilax cordifolia* y *Smilax domingensis* tienen actividad antihiperglucemiante en ratones sanos CD1, mientras que *T. lucida* no induce efecto.

El extracto clorofórmico de *Smilax domingensis* mostró tener efecto agonista dual de PPAR α , PPAR γ y sus genes río abajo, GLUT4 y FATP, lo cual podría estar asociado con la disminución de glucosa observado en la PTGO.

El extracto clorofórmico de *S. dominguensis* tiene potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como la DM2 y otras asociadas al síndrome metabólico a través de la activación dual de PPAR α/γ por medio de alguno o algunos de sus componentes, por lo cual es importante continuar con la elucidación de sus compuestos y completar el mecanismo de acción por el cual ejerce dichos efectos.



XXII. PERSPECTIVAS

1. Identificar las moléculas encargadas del efecto agonista dual del extracto clorofórmico de *S. domingensis*
2. Dilucidar el mecanismo de acción que ejercen la o las moléculas del extracto clorofórmico de *S. domingensis* para la activación de PPAR α y PPAR γ .
3. Evaluar el efecto de las moléculas responsables del efecto dual de PPAR α / γ sobre algunos de los genes regulados por estos a nivel de proteína.
4. Evaluar el efecto de las moléculas agonistas a PPAR α y PPAR γ del extracto clorofórmico de *S. domingensis* sobre la vía de señalización PI3K/Akt
5. Demostrar que el efecto de las moléculas con acción dual a PPAR α y PPAR γ regulan la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1.
6. Evaluar el efecto de las moléculas agonistas duales de PPAR α / γ en un modelo in vivo diabético (DM2).



XXIII. REFERENCIAS

- Abdel-Haleem, S. A., Ibrahim, A. Y., Ismail, R. F., Shaffie, N., M., Hendawy, S. F., Omer, E.A. (2017) In-vivo hypoglycemic and hypolipidemic properties of *Tagetes lucida* alcoholic extract in streptozotocin-induced hyperglycemic Wistar albino rats, *Annals of Agricultural Sciences*, (62) 2: 169-181 pp
- Adeghate, E. y Kalasz, H. 2011. Amylin analogues in the treatment of diabetes mellitus: medicinal chemistry and structural basis of its function. *Open Medicinal Chemistry Journal.*, 5: 78-81 pp.
- Alegría-Ezquerro, E., Castellano-Vázquez, J.M., Alegría-Barrero, A. (2008). Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica, *Revista Española de Cardiología*, 61(7): 752-764,
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes - 2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
- Atanasov, A.G., Wang, J.N., Gu, S.P., Bu, J., Kramer, M.P., Baumgartner, L., Fakhrudin, N., Ladurner, A., Malainer, C., Vuorinen, A., Noha, S.M., Schwaiger, S., Rollinger, J.M., Schuster, D., Stuppner, H., Dirsch, V.M. y Heiss, E.H. (2013). Honokiol: a non-adipogenic PPAR gamma agonist from nature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 4813- 4819 pp
- Aylwin C. G., (2016). Nuevos fármacos en diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2: 235-256.
- Cáceres, A., Cruz, S.M., Martínez, V., Gaitán, I., Santizo, A., Gattuso, S., y Gattuso, M. (2012). Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and



phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 239-248 PP

- Calles-Escandon J, Cipolla M. (2001). Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Reviews*; 22: 36-52.
- Castro, B. A. Kolka, C. M. Kim, S. P. Bergman, R. N. (2014). Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia y Metabologia.*, 58 (6), 600-607.
- Chhabra, Sc, Uiso FC, and Mshin EN. (1989) Phytochemical screening of Tanzanian medical plants. I. *Journal of Ethnopharmacology*;11: 157-179
- Domínguez, X., (1973). *Métodos de investigación fotoquímica*. México: Limusa. 81-226pp
- Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., and Paschke, R. (2003a). Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35: 147-152.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001a). Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507: 142-146.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001b). Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 1027-1031.



- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1084-1089.
- Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003b). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta Commun* 301: 1045-1050.
- Federación Internacional de Diabetes. 2019. Estimaciones de la prevalencia de diabetes mundial y regional para 2019 y proyecciones para 2030 y 2045: Resultados del Atlas de Diabetes de la, 9a edición
- Feng J, Yi X, Huang W, Wang Y, He X. (2018) Novel triterpenoids and glycosides from durian exert pronounced anti-inflammatory activities. *Food Chemistry journal*, 241:215-221.
- Finck B.N., Bernal-Mizrachi C., Han D.H., Coleman T., Sambandam N., LaRiviere L.L., Holloszy J.O., Semenkovich C.F., Kelly D.P. (2005). A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metabolism*;1:133–144.
- Flores, L., Solorio, I.C., Melo, M.L., Trejo-Franco, J., (2014). Pregnancy and obesity: risk of developing gestational diabetes in the northern border area of Mexico. *Gaceta Medica Mexicana* 150: 73-78 pp
- Fowler MJ. (2008) Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*; 26: 77-82.
- Giacoman, A. (2015) Extractos de Hibiscus sabdariffa L., Psacalium



decompositum (A. Gray) H. Rob and Brettell y Tillandsia usneoides L. como posibles agonistas duales de PPARs. (tesis de maestria) Universidad Autonoma Metropolitana. Ciudad de México, México.

- Gross, B y Staels, B (2007). PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 21, 687-710.
- Grygiel-Gorniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications—a review *Nutrition journal*, 13: 17pp
- Guadarrama-Cruz, G., Alarcon-Aguilar, F.J., Lezama-Velasco, R., Vazquez-Palacios, G., y Bonilla-Jaime, H. (2008) Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology* 120:277–281 pp
- Guariguata, L (2013). Contribute data to the 6th edition of the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract* 100, 280-281pp
- Gupta, P., Bala, M., Gupta, S., Dua, A., Dabur, R., Injeti, E., y Mittal, A. (2016). Efficacy and risk profile of anti-diabetic therapies: Conventional vs traditional drugs—A mechanistic revisit to understand their mode of action. *Pharmacological Research*. 113-A: 636-674pp
- Hamdan FB, Al Matubsi HY. (2009) Assessment of erectile dysfunction in diabetic patients. *Int J Androl* 32: 176-85
- Harborne, J.B. (1976b) *Phytochemical Methods, A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman and Hall, London, pp. 109-110.
- Hawley, SA, Ross, FA, Gowans, GJ, Tibarewal, P, Leslie, NR y Hardie, DG (2014).



Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK-alpha1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochemical Journal* 459, 275-287.

- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P., y Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55 pp
- Hotta N, Kawamori R, Fukuda M, Shigeta, Y. (2012). Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications: multivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. *Diabetic Medical*; 29: 1529-33.
- Instituto Nacional Indigenista. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo: III: 1420.
- Iriti, M., y Faoro, F. (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3371-3399.
- Joshi, S.R., Standl, E., Tong, N., Shah, P., Kalra, S. y Rathod R. (2015). Therapeutic potential of alpha-glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16: 1959-1981 pp
- Kalra, S., Zargar, A. H., Jain, S. M., Sethi, B., Chowdhury, S., Singh, A. K., Malve, H. (2016). Diabetes insipidus: The other diabetes. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 20(1), 9–21. pp
- Karsenty, J, Landrier, JF, Rousseau-Ralliard, D, Robbez-Masson, V, Margotat, A, Deprez, P, Lechene, P, Grynberg, A, Lairon, D, Planells, R y Gastaldi, M (2013). Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet



are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. *European Journal of Nutrition* 52, 1865-1874.

- Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, J. B., Schatz, D. A., Jacobsen, L. A., Lernmark. (2017) Diabetes mellitus tipo 1 A. *Nature Reviews Disease Primers* 3: 17016
- Lazennec, G, Canaple, L, Saugy, D y Wahli, W (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Molecular Endocrinology* 14, 1962-1975.
- Liu, X.J, He, A.B., Chang, Y.S., y Fang F.D. (2006) Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Cellular Signalling* 18:2071-2076.
- Liwen, Z., Shulan, S., Yue, Z., Jianming, G., Sheng, G., Dawei, Q., Zhen, O., Jinao, D. (2019) Mulberry leaf active components alleviate type 2 diabetes and its liver and kidney injury in db/db mice through insulin receptor and TGF- β /Smads signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 112:108675
- Madsen-Bouterse, S.A. y Kowluru, R.A. (2008) Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*; 9: 315-27.
- Martínez-Gómez C., Benedictino J., Campilo J. A., Moore M. (2008). Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 490-499.
- Martins, A. R., Soares, M. K., M., Redher, V. L., G., Bajay, M. M., . . . Appezzato-da-glória, B. (2014). Use of anatomical, chemical, and molecular genetic



characteristics in the quality control of medicinal species: A case study of sarsaparilla (*Smilax* spp.). *Economic Botany*, 68(4): 410-425 pp

- McCarthy A.M. y Elmendorf J.S. (2007) GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian Journal of Medical Research* 125:373-388.
- Merk, D., Lamers, C., Weber, J., Flesch, D., Gabler, M., Proschak, E., Schubert-Zsilavecz, M. (2015) Anthranilic acid derivatives as nuclear receptor modulators—Development of novel PPAR selective and dual PPAR/FXR ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (23) 3: 499-514 pp
- Millecamps, S. y Julien, J.P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*; 14: 161-76.
- Mokini, Z. y Chiarelli, F. (2006) The molecular basis of diabetic microangiopathy. *Pediatric Endocrinology Rev*; 4: 138-52.
- Mosley, J.,F. 2nd, Smith, L., Everton, E., y Fellner, C. (2015). Sodium-Glucose Linked Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors in the Management Of Type-2 Diabetes: A Drug Class Overview P & T a Peer-Rev. *J. Formul. Manage.*, 40: 451-462pp
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*.; 65 (1-2): 55-63.
- Muhammad B. A. K., Mohd Wan Azizi W. S., Pinaki S., Deny S. (2017) Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*, *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 96: 348-360pp. ISSN 0753-3322,
- Ngoc, L.P., Man, H., Besselink, H., Ha Dang Thi Cam, Brouwer, A., van der Burg, B. (2019) Identification of PPAR-activating compounds in herbal and edible plants



and fungi from Vietnam, *Industrial Crops and Products*, 129: 195-200 pp

- Nisal, K. Kela, R. Khunti, K. y Davies, M.J. (2012). Comparison of efficacy between incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus *BMC Medicine.*, 10:152pp
- Olokoba, AB, Obateru, OA, y Olokoba, LB (2012). La diabetes mellitus tipo 2: una revisión de las tendencias actuales. *Revista médica de Omán* , 27 (4), 269–273pp
- Osonoi, T. (2015) Alpha-glucosidase inhibitor, *NIPPON RINSHO*. Japanese journal of clinical medicine.73 390–394.
- Oumeish OY. (2008). Skin disorders in patients with diabetes. *Clinical Dermatology*; 26: 235-42.
- Palomer-Tarridas, X. (2007). Tratamiento de enfermedades metabólicas mediante la modulación del PPARγ. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 19:4 191-210 pp
- Passador, E., Fatima, Das G. M., Da Silva, F., Rodrigues, E., Fernandes, J., Vieira, P., Pirani, J. A.: (1996). Pyranochalcone and a flavanone from *Neoraputia Magnifica*. *Phytochemistry*, 45(7):1533-7.
- Pendsey S. (2010). Understanding diabetic foot. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*; 30: 75-9.
- Pérez-Ramírez I. F., Enciso-Moreno, J. A. Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R. (2016) Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats, *Journal of Functional Foods*, 20: 545-555 pp



- Pérez, M., García, M., Ruiz, D., Autino, J.C., Romanelli, G. y Blustein, G. (2016) Actividad antiincrustante de la 7-hidroxi-4-metilcumarina sintetizada en verde. *Investigación ambiental marina*, 113 , 134-140.
- Perrin, R.M., Harper, S.J., Bates DO. (2007). A role for the endothelial glycocalyx in regulating microvascular permeability in diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Biophysics*; 49: 65-72.
- Pillai HK, Fang M, Beglov D, Kozakov D, Vajda S, Stapleton HM, Webster TF, Schlezinger JJ (2014) Ligand binding and activation of PPARgamma by Firemaster(R) 550: effects on adipogenesis and osteogenesis in vitro. *Environ Health Perspect*, 122(11):1225-1232.
- Preshaw, P.M., Alba, A.L. y Herrera, D. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*; 55: 21-31.
- Ramesh, M., Nancy M.D., Nalini, M., Gouthami, A. (2013). A detailed review on the mechanisms involved in chronic stages of type II diabetic complications. *International Journal of Phytopharmacology*; 4: 60-73.
- Repetto G., Del Peso A., Zurita J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* Vol. 3 No.7 1125-1131
- Riddle MC, Ahmann AJ. Therapeutics of type 2 diabetes mellitus. In: Melmed S, Auchus, RJ, Goldfine AB, Koenig RJ, Rosen CJ , eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 14th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020:chap 35.
- Rincón, S. A. Islas, C. M. (2010). *Biología Molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, Capítulo 24: Bases moleculares de la diabetes mellitus tipo 2, 2 ed.; Mc Graw Hill.



- Roman-Ramos, R., Contreras-Weber, C.C., Nohpal-Grajeda, G., Flores-Saenz, J.L., y Alarcon-Aguilar F.J. (2008) Blood Glucose Level Decrease Caused by Extracts and Fractions from *Lepechinia caulescens* in Healthy and Alloxan-diabetic Mice. *Journal Pharmaceutical Biology* Volume (39) 4: 317-321pp
- Ross, S.A. y Ekoe J.M. 2010. incretin agents in type 2 diabetes *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien.*, 56: 639-648pp
- Saltiel, A.R. y Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Samah, A. Abdel-Haleem, Abeer Y. Ibrahim, Rasha F. Ismail, Nermeen M. Shaffie, S.F. Hendawy, E.A. Omer, (2017). In-vivo hypoglycemic and hypolipidemic properties of *Tagetes lucida* alcoholic extract in streptozotocin-induced hyperglycemic Wistar albino rats, *Annals of Agricultural Sciences*, Volume 62, Issue 2, Pages 169-181.
- Schnuck, J.K., Sunderland K.L., Gannon N.P., Kuennen M.R., Vaughan R.A. (2016). Leucine stimulates PPARbeta/delta-dependent mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism with enhanced glut4 content and glucose uptake in myotubes. *Biochimie*;128–129:1–7.
- Seino, S., Zhang, C.L. y Shibasaki, T. (2010). Sulfonylurea action re-revisited *Journal of Diabetes Investigation* 37-39pp
- Serra Sansone, María del Pilar. (2016). Actualización en medicamentos antidiabéticos y riesgo cardiovascular. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 31(3), 522-546.
- Shah, P., Ardestani, A., Dharmadhikari, G., Laue, S., Schumann, D.M., Kerr-



- Conte, J., Pattou, F., Klein T. y Maedler. K. (2013). The DPP-4 inhibitor linagliptin restores beta-cell function and survival in human isolated islets through GLP-1 stabilization *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 98: E1163-1172pp
- Soccio, R.E. Chen, E.R. Lazar. M.A. (2014). Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes *Cell Metabolism*., 20: 573-591 pp.
 - Soledispa, P., González, J., Cuéllar, A., Pérez, J. y Monan, M. (2018). Caracterización química por GC-MS de los componentes principales de *Smilax Domingensis Wild*. En Cuba. *Revista de estudios agrícolas*, 6 (2), 79-86.
 - Stirban, A., Rösen, P., Tschoepe, D. 2008. Complications of type 1 diabetes: new molecular findings. *Mount Sinai Journal of Medicine*; 75: 328-51.
 - Ugochukwu, S. C., Uche, A. y Ifeany, O. (2013). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(3):10-13
 - Verma NK, Singh J, Dey C.S. (2004). PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 143(8):1006-1013.
 - Vindas-Morera, C.A. (2013). Fármacos hipolipemiantes. *Revista medica de costa rica y centroamerica LXX (607) 529 – 537*
 - Wu YY, Xiao E, Graves DT. (2015) Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. *International Journal of Oral Science*; 7: 63-72.
 - Xu GB, Xiao YH, Zhang QY, Zhou M, Liao S.G. (2018). Hepatoprotective natural triterpenoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145:691-716.
 - Yaque, J. G., Monan, M., Cuéllar, A., de Armas, T., Gómez, E. and Dopico, E.



(2017). Pharmacognostic and Phytochemical Studies of *Smilax domingensis* Willd. in Cuba. *American Journal of Plant Sciences*, 8, 1462-1470

- Yousefi, B., Samadi, N., Baradaran, B., Shafiei-Irannejad, V. y Zarghami, N. (2016), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands and Their Role in Chronic Myeloid Leukemia: Therapeutic Strategies. *Chemical Biology & Drug Design*, 88: 17-25.
- Zhang, J., Liu, X., Xie, X., Cheng, X. y Wang, R. (2016). Multitargeted bioactive ligands for PPARs discovered in the last decade. *Chemical Biology Drug*, 88: 635-663 pp
- Zou, M.H., Kirkpatrick, S.S., Davis, B.J., Nelson, J.S., Wiles, W.G.t., Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M.B., y Goldman. M.H. (2004), Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species *Journal of Biological Chemistry.*, 279: 43940-43951pp
- Zuo, Y., Qiang, L. y Farmer, S.R. (2006). Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* 281, 7960-7967.





Smilax cordifolia, *Smilax domingensis* y *Tapeza lucida* como agonistas duales de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 23 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. RODOLFO VELASCO LEZAMA
DRA. MALINALI BRIANZA PADILLA
DR. ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ
DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO



JUANA ERANDI ORTIZ BARRAGAN
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JUANA ERANDI ORTIZ BARRAGAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA ARRANGO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. RODOLFO VELASCO LEZAMA

VOCAL

DRA. MALINALI BRIANZA PADILLA

VOCAL

DR. ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ

SECRETARIO

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

