



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Extractos de *Hibiscus sabdariffa* L., *Psacalium decompositum* (A. Gray) H.
Rob and Brettell y *Tillandsia usneoides* L. como posibles agonistas duales de
PPARs”**

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biólogo Experimental Abraham Giacoman Martínez

México D.F. Septiembre 2015

I. COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Julio Cesar 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. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

aaaf@xanum.uam.mx

Asesor externo

Dr. Gabriel Navarrete Vázquez

Laboratorio de Química Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

gabriel_navarrete@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 el alumno Abraham Giacoman Martínez contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de becario 302036/CVU: 566521.

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 “Extractos de *Hibiscus sabdariffa* Linneo., *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob. and Brettell y *Tillandsia usneoides* Linneo como posibles agonistas duales de PPARs”, con fecha de presentación para obtener el grado de maestría el día 3 de Septiembre de 2015.

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

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

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

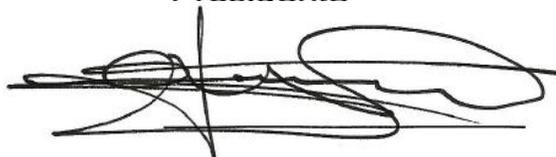


Presidente

Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

Facultad de Farmacia.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



Secretario

Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera.

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

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

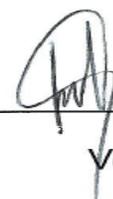


Vocal

Dr. Fausto Sánchez Muñoz.

Instituto Nacional de Cardiología.

Depto. de Inmunología.



Vocal

III. DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por el apoyo incondicional tanto en situaciones buenas como malas. Gracias por su amor y ejemplo, por motivarme a nunca dejar de perseguir mis deseos y sueños. Este trabajo materializa sus enseñanzas, educación y consejos que me brindaron, gracias a ustedes he logrado metas inimaginables, pero que hoy comienzan a hacerse realidad.

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”. Ray Bradbury

IV. AGRADECIMIENTOS

A mi madre Naela, A mi padre Javier, que siempre me apoyaron con mucho amor, esfuerzo y dedicación.

A mis hermanos Jacobo e Ismael por su ejemplo y sus valiosos consejos.

A mi prima Claudia y Abuela Elena por sus enseñanzas y cariño.

A Joaquín por sus consejos y su valiosa amistad.

Al Dr. J. C. Almanza, Al Dr. Gerardo Blancas, A la Dra. Ángeles Fortis, al Dr. Alejandro Zamilpa, a la Dr. Rebeca García y al Dr. Sergio N. Hidalgo, por sus valiosas enseñanzas y consejos.

A mis compañeros de laboratorio, Iván, Jessica, Erica, Elizabeth, Noemí, Roció y Michelle, por su amistad y camaradería.

A ustedes que siempre han estado conmigo en buenos y malos momentos, gracias a ustedes culminó este pequeño triunfo, y quiero decirles que aquí no termina el camino, sigue con nuevas metas y propósitos.

V. ÍNDICE

I.	Comité tutorial.....	3
II.	Miembros del jurado.....	5
III.	Dedicatoria	6
IV.	Agradecimientos.....	7
VI.	Abreviaturas	12
VII.	Índice de figuras	19
VIII.	Índice de gráficos	20
IX.	Indice de tablas	22
1.	Resumen.....	23
2.	Abstract.....	25
3.	Introducción.....	27
3.1	Diabetes Mellitus	27
3.2	Tipos de Diabetes	27
3.3	Factores promotores de la DM2	29
3.4	Datos epidemiológicos de la diabetes.....	30
3.5	Fármacos utilizados para el tratamiento de la DM2.....	31
3.5.1	Sulfonilureas	31
3.5.2	Biguanidas	31
3.5.3	Inhibidores de las alfa glucosidasas.....	32
3.5.4	Inhibidores DDP4	32

3.5.5	Inhibidores SGLT2	33
3.5.6	Secuestradores de ácidos biliares.....	33
3.5.7	Agonistas de PPARs	33
3.6	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)	34
3.6.1	Mecanismo de activación de los PPARs.....	34
3.6.1	PPAR α	35
3.6.2	PPAR δ	36
3.6.3	PPAR γ	37
3.7	Agonistas de PPAR.....	39
3.7.1	Agonistas sintéticos de PPAR α	39
3.7.2	Agonistas endógenos y naturales de PPAR α	40
3.7.3	Agonistas sintéticos de PPAR δ	41
3.7.4	Agonistas endógenos y naturales de PPAR δ	42
3.7.5	Agonistas sintéticos de PPAR γ	42
3.7.6	Agonistas endógenos y naturales de PPAR γ	43
3.7.7	Agonistas sintéticos duales de PPARs	45
3.7.8	Agonistas naturales duales de PPARs	46
4.	Antecedentes	47
4.1	Plantas medicinales como posibles agonistas de PPAR y modelos de estudio 49	
4.1.1	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	49
4.1.2	<i>Tillandsia usneoides</i>	51
4.1.3	<i>Psacalium decompositum</i>	52

4.2 Tejido adiposo como modelo de estudio.....	53
4. Justificación.....	54
5. Pregunta de investigación	55
6. Hipótesis	55
7. Objetivos	56
7.1 Objetivo general.....	56
7.2 Objetivos particulares	56
8. Metodología	57
8.1 Colecta, identificación y preparación del material vegetal	57
8.1.1 Colecta.....	57
8.1.2 Identificación de plantas.....	57
8.1.3 Preparación del material vegetal.....	58
8.2 Obtención de los extractos acuosos	58
8.3 Obtención de extractos clorofórmicos.....	58
8.4 Estandarización de los extractos acuosos mediante CC, CCF y HPLC	60
8.4.1 Condiciones cromatográficas	60
8.5 Condiciones para la separación de los compuestos de los extractos clorofórmicos mediante CC, CCF y HPLC.....	62
8.5.1 Fraccionamiento de los extractos clorofórmicos	62
8.6 Preparación de reveladores para CCF	63
8.6 Tratamiento de ratones cepa CD1 con los extractos	63
8.8 Cultivo de la línea celular 3T3-L1	64
8.9 Prueba de funcionalidad celular	66

8.10	Tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con los extractos de las plantas.....	68
8.11	Aislamiento y cuantificación del RNAm.....	68
8.12	Expresión del RNAm por RT-PCR tiempo real	69
8.13	Análisis estadístico	71
9	Resultados	72
9.1	Análisis y estandarización de los extractos acuosos	72
9.1.1	Extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i>	72
9.1.2	Extracto acuoso de <i>P. decompositum</i>	75
9.2	Análisis y estandarización de los extractos clorofórmicos	77
9.2.1	Extracto clorofórmico de <i>T. usneoides</i>	77
9.2.2	Extracto clorofórmico de <i>P. decompositum</i>	77
9.2.3	Extracto clorofórmico de <i>H. sabdariffa</i>	80
9.3	Prueba de funcionalidad celular.....	86
9.4	Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de PPAR δ , PPAR γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP.....	90
9.5	Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR δ , PPAR γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP.	94
10.	Discusión.....	98
11.	Conclusiones.....	106
12	. Perspectivas	107
13.	Bibliografía.....	108

ABREVIATURAS

μl: Microlitro.

μM: Micromolar.

3-HACD: 3-hidroxiacil CoA Deshidrogenasa.

5- HMF: 5-Hidroximetil Furfural.

ACCLS: Acil-CoA de Cadena Larga Sintetasa.

ACD: Acil Co-A Desidrogenasa.

ACN: Acetonitrilo.

ACO: Acil Co-A Carboxilasa.

AcoEt: Acetato de Etilo.

ACS: Acil Co-A Sintetasa.

ADH: Hormona antidiurética.

ADIPO1: Receptor de Adiponectina 1.

ADIPO2: Receptor de Adiponectina 2.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AGL: Ácidos Grasos Libres.

AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido.

Akt: Proteína Cinasa Activada por el factor de crecimiento parecido a la insulina 1.

ALT: Alanina aminotransferasa.

AM: Acetato de Maturina.

AMPK: Proteína Cinasa dependiente de AMPc.

AST: Aspartato transaminasa.

C/EBP α : Proteína de Unión y amplificación de la caja CCAAT alfa.

C/EBP β : Proteína de Unión y amplificación de la caja CCAAT beta.

C/EBP δ : Proteína de Unión y amplificación de la caja CCAAT delta.

C3G: Cianidina 3- Glucósido.

CACT: Ceto-acil-CoA Tiolasa.

CBP/p300: Proteína Coactivadora Transcripcional p 300.

CC: Cromatografía en Columna.

CCF: Cromatografía en Capa Fina.

cDNA: DNA complementario.

CK2: Proteína Caseína Cinasa 2.

CPT-I: Carnitin Palmitoil Transferasa 1.

CPT-II: Carnitin Palmitoil Transferasa 2.

CT: Control.

DDP4: Dipeptidil Peptidasa 4.

DG: Diabetes gestacional.

DHA: Ácido Eicosapentanóico.

DI: Diabetes Insípida.

DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1.

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2.

DMEM: Medio Modificado Eagle Dulbecco.

ECHD: Enoil-CoA Hidratasa/Deshidrogenasa.

EM: Enzima Málica.

EM: Espectrometría de Masas.

FABP: Proteína de Unión a Ácidos Grasos.

FAT/CD36: Proteína Translocadora de ácidos grasos CD36.

FATP: proteína Transportadora de Ácidos Grasos.

FEN: Fenofibrato:

FOS: Fracción Rica en Oligosacáridos.

G3D: Glucósido de 3-delfinidina.

GIP: Péptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa.

GLP-1: Péptido Similar al Glucagon 1.

GLUT4: Transportador de Glucosa 4.

GSK3: Glucógeno Sintasa Cinasa 3.

GSK3 β : Glucógeno Sintasa Cinasa 3 beta.

GyK: proteína de captura de Glicerol.

HMGCSM: Hidroximetilglutaril-CoA Sintasa Mitocondrial.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

HS-AC: Extracto acuoso de *H. sabdariffa*.

HS-CLF: Extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*.

IFN- γ : Interferon Gamma.

IL-6: Interleucina 6.

L-16504: agonista sintético de PPAR δ .

LPL: Lipoproteína Lipasa.

M: Molar.

MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno.

MCP-1: Proteína Quimiotrayente de Monocitos 1.

mg: Miligramos.

mM: Milimolar.

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

NCOR: Correpresor Nuclear.

NF- κ B: Factor Nuclear Kappa B.

nm: Nanómetros.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP/TRAP220: Proteína de Unión a PPAR TRAP220.

PBS: Buffer Salino de Fosfatos.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

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

PD-AC: Extracto acuoso de *P. decompositum*.

PD-CLF: Extracto Clorofórmico de *P. decompositum*.

PDK4: Piruvato Deshidrogenasa Cinasa 4.

PEG: Polietilenglicol.

PEPCK: Proteína Fosfoenol Piruvato Carboxiquinasa.

PGC-1: Coactivador 1 de PPAR.

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 cinasa.

PIO: Pioglitazona.

PKA: Proteína Cinasa A.

PKC: Proteína Cinasa C.

PPAR α : Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas alfa.

PPAR γ : Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas gamma.

PPAR δ : Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas beta.

PPRE. Elementos de Respuesta a Proliferadores de Peroxisomas.

RGS2: Regulador de la Señalización de Proteína G 2.

RI: Resistencia la Insulina.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RNAm: Ácido Ribonucléico mensajero.

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

RXR: Receptor Retinoide X.

SB3D: Sambubiósido 3-Delfinidina.

SM: Síndrome Metabólico.

SMRT: Mediador del Silenciamiento de Receptor de la hormona Tiroidea y Retinoide.

SRC-1: Coactivador del Receptor Nuclear 1.

TC: Colesterol total.

TFA: Ácido Trifluoroacético.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

TR: Tiempo de Retención.

TU-AC: Extracto acuoso de *T. usneoides*.

TU-CLF: Extracto clorofórmico de *T. usneoides*.

TZD: Tiazolidinediona.

UCP-1: Proteína Desacoplante 1.

UCP-2: Proteína Desacoplante 2.

UCP-3: Proteína Desacoplante 3.

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación general de la activación de los PPAR	39
Figura 2. Adipocitos diferenciados a partir de fibroblastos	66
Figura 3. Reducción del MTT en formazán	67
Figura 4. Estructura química de D3SB	74
Figura 5. CCF a partir de extracto acuoso de <i>P. decompositum</i> .	76
Figura 6. CCF del extracto clorofórmico de <i>T. usneoides</i>	77
Figura 7. Estructura química del AM	80
Figura 8. Estructura química de 5-HMF	82

VII. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Espectros cromatográficos de D3SB	73
Gráfico 2. Curva de calibración para estandarización de extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i>	74
Gráfico 3. Espectro cromatográfico del extracto acuoso de <i>P. decompositum</i>	75
Gráfico 4. Espectro cromatográfico del AM	78
Gráfico 5. Curva de calibración para estandarización de extracto clorofórmico de <i>P. decompositum</i>	79
Gráfico 6. Espectro cromatográfico del 5-HMF	81
Gráfico 7. Curva de calibración para estandarización de extracto clorofórmico de <i>H. sabdariffa</i>	83
Gráfico 8. Espectro cromatográfico del extracto clorofórmico de <i>H. sabdariffa</i>	83
Gráfico 9. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones CD1 con extractos acuosos.	84
Gráfico 10. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones CD1 con extractos clorofórmicos.	85
Gráfico 11. Efecto del extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i> sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1.	86
Gráfico 12. Efecto del extracto clorofórmico de <i>H. sabdariffa</i> sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1.	87
Gráfico 13. Efecto del extracto acuoso de <i>T. usneoides</i> sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1.	87
Gráfico 14. Efecto del extracto clorofórmico de <i>T. usneoides</i> sobre la funcionalidad celular de fibroblastos 3T3-L1.	88

Gráfico 15. Efecto del extracto acuoso de <i>P. decompositum</i> sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1	88
Gráfico 16. Efecto del extracto clorofórmico de <i>P. decompositum</i> sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1	89
Gráfico 17. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de PPAR δ	90
Gráfico 18. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de PPAR γ	91
Gráfico 19. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de GLUT4	92
Gráfico 20. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de FATP.	93
Gráfico 21. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR δ .	94
Gráfico 22. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR γ .	95
Gráfico 23. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de GLUT4.	95
Gráfico 24. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de FATP.	96

VIII. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de flujo en HPLC para los extractos	61
Tabla 2. Grupos y tratamientos para la prueba de tolerancia a la glucosa	64
Tabla 3. Características de genes y primers utilizados para el análisis de expresión en células 3T3L1	71
Tabla 4. Rendimiento de los extractos de las plantas de estudio	72
Tabla 5. Datos obtenidos del análisis de HPLC del compuesto D3SB	75
Tabla 6. Datos obtenidos del análisis de HPLC del compuesto AM.	79
Tabla 7. Datos obtenidos del análisis de HPLC de 5-HMF	82

1. RESUMEN

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son factores de expresión nuclear dependientes de ligando. Existen tres isoformas de PPAR, alfa (α), delta/beta (δ/β) y gamma (γ), todos ellos involucrados en el balance de metabolismo de lípidos y carbohidratos. Los PPARs representan un blanco terapéutico interesante para la prevención y/o tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatosis, enfermedad cardiovascular y otras asociadas al síndrome metabólico (SM), ya que regulan la expresión de genes involucrados en la incorporación y oxidación de lípidos, así como también en el metabolismo y captación de glucosa. La DM2 y otras asociadas al SM es caracterizada por el desbalance en el metabolismo de lípidos y carbohidratos siendo este el principal problema que engloba a estas enfermedades. *H. sabdariffa*, *P. decompositum* y *T. usneoides* son plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y otras asociadas al síndrome metabólico (SM), siendo el objetivo de este trabajo evaluar el efecto de 2 tipos de extractos, acuoso y clorofórmico sobre la glucemia en ratones CD1 sanos, así como también el evaluar su efecto sobre la expresión de RNAm de PPAR δ , PPAR γ y algunos de sus genes regulados; el transportador de glucosa 4 (GLUT4) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) mediante PCR-RT en la línea celular de adipocitos 3T3-L1. Se estandarizaron los extractos con efecto sobre la expresión de PPARs y/o GLUT4 y FATP; el extracto acuoso de *H. sabdariffa* tuvo efecto positivo con respecto al control sobre la expresión de FATP fue estandarizado con delfinidina 3-sambubiósido (22.7

mg/g de extracto); el extracto clorofórmico de *P. decompositum* tuvo efecto agonista con respecto al control sobre la expresión de PPAR γ y GLUT4 estandarizado con acetato de maturina (50.68 mg/g); siendo el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* estandarizado con 5-hidroximetil furfural (9.93 mg/g) el que tuvo efecto agonista dual de PPAR δ/γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP. Se utilizaron los siguientes tratamientos como controles positivos: pioglitazona como agonista de PPAR γ (25 mM), para PPAR α fenofibrato (10mM) y para PPAR δ L-16504 (10 μ M). Estos resultados sugieren que el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* a través de su efecto dual, favorece el transporte de glucosa y de ácidos grasos (AG), sentando las bases para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DM2 y otras enfermedades asociadas al SM.

2. ABSTRACT

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent factors nuclear expression. There are three PPAR isoforms alpha (α), delta / beta (δ / β) and gamma (γ), all involved in the balance of lipid and carbohydrate metabolism. PPARs represent an interesting therapeutic target for the prevention and / or treatment of diseases such as type 2 diabetes mellitus (DM2), steatosis, cardiovascular disease and other associated metabolic syndrome (MS), as they regulate the expression of genes involved in the incorporation and lipid oxidation, as well as metabolism and glucose uptake. DM2 and others diseases associated with MS is characterized by an imbalance in the metabolism of lipids and carbohydrates this being the main problem that encompasses these diseases. *H. sabdariffa*, *P.* and *T. usneoides decompositum* are plants used in traditional medicine for the treatment of type 2 diabetes mellitus (DM2) and associated with other diseases associated at metabolic syndrome (MS), the aim of this study to evaluate the effect of 2 kinds of extracts, aqueous and chloroformic on glycemia in healthy CD1 mice, as well as assess their effect on the mRNA expression of PPAR δ , PPAR γ and some of the regulated genes; glucose transporter 4 (GLUT4) and fatty acid transport protein (FATP) by RT-PCR on cell line 3T3-L1 adipocytes. Extracts with effect on the expression of PPARs and / or GLUT4 and FATP were standardized; the aqueous extract of *H. sabdariffa* had positive effect with respect to control on the expression of FATP was standardized with delphinidin 3-sambubioside (22.7 μg / g of extract); the

chloroform extract of *P. decompositum* have an agonist effect over control on the expression of GLUT4 and PPAR γ , was standardized maturine acetate (50.68 mg/g); being the chloroform extract of *H. sabdariffa* standardized 5-hydroxymethyl furfural (9.93 mg/g) which it had dual PPAR δ / γ agonist effect and GLUT4 and FATP regulated genes. PPAR γ positive control pioglitazone (25 mM), for PPAR α fenofibrate (10 mM) and L-16504 for PPAR δ (10 μ M) were used. These results suggest that the chloroform extract of *H. sabdariffa* through its dual effect, promotes the transport of glucose and fatty acid (FA), laying the foundation for the development of new drugs for the treatment of DM2 and other diseases associated with the SM.

3. INTRODUCCIÓN

La diabetes es un reto de salud emergente en todo el mundo como resultado de la urbanización, la alta prevalencia de la obesidad, el sedentarismo y el estrés, asociado con otros con factores genéticos (Ghoshal y Bhattacharyya, 2015).

3.1 Diabetes Mellitus

La *diabetes mellitus* es una enfermedad crónica que aparece cuando el organismo no puede producir suficiente insulina o no puede utilizarla eficazmente. La insulina es una hormona producida en el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos entre en las células del cuerpo, donde es metabolizada, y convertida en la energía necesaria para las funciones vitales del organismo (Ahmad, 2014).

3.2 Tipos de Diabetes

Son cuatro los tipos de diabetes con mayor incidencia: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DG) y diabetes insípida (DI).

La DM1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema inmune ataca a las células β -pancreáticas productoras de insulina, por lo que al no producirse insulina la glucosa no puede ingresar a las células; no se sabe con claridad cuál es la causa de la reacción autoinmune. Las personas con este tipo de diabetes, necesitan insulina todos los días para controlar la glucemia. La diabetes tipo 2 (DM2) es el tipo de diabetes más común. Por lo general ocurre en adultos, pero cada vez aparece en

niños y adolescentes. En la DM2, el cuerpo puede producir insulina, sin embargo las células del organismo no pueden responder a sus efectos, es decir, resistencia a la insulina (RI), dando lugar a la acumulación de glucosa en sangre (Guariguata, 2013). La DG es definida como la intolerancia a los carbohidratos en el comienzo o primer reconocimiento en el embarazo, generando RI, principalmente ocasionada por obesidad y con historial familiar de DM2 (Ainuddin *et al.*, 2015; Correa *et al.*, 2014; Flores-Padilla *et al.*, 2014). La DI es caracterizada por excreción de volúmenes altos de orina muy diluida, la cual puede ser causada por dos efectos fundamentales: secreción inadecuada o bien la inadecuada respuesta de por parte de los riñones a la hormona antidiurética (ADH) proveniente de la glándula pituitaria, por lo cual se pierde la habilidad de retener agua y glucosa en sangre (Makaryus y McFarlane, 2006).

La DM2 es una enfermedad asociada con varios desordenes metabólicos y factores de riesgo cardiovascular, tales como la obesidad, RI, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, estado protrombótico y disfunción endotelial; que en conjunto son referidas como síndrome metabólico (SM). La DM2 es caracterizada por hiperglicemia debido a la RI periférica, compensada por la liberación de insulina por parte de las células β -pancreáticas (Gross y Staels, 2007; Janani y Ranjitha Kumari, 2015).

3.3 Factores promotores de la DM2

Un factor de los defectos en la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos (AG) incluyen una deficiencia en la habilidad de la hormona para suprimir la producción hepática y renal de glucosa, y mediar la captación y el metabolismo de la glucosa en tejidos insulinosensibles como el músculo esquelético, hígado, tejido adiposo y músculo cardíaco, además de que se inhibe la lipogénesis y la síntesis de glucógeno, lo que provoca dislipidemia e hiperglucemia; los cuales se caracterizan por ser factores claves en el desarrollo de DM2.

Otro de los factores importantes que contribuyen al desarrollo de RI es el exceso de ácidos grasos libres (AGL) en sangre (Bastarrachea *et al.*, 2007; Guo, 2014; Steppan y Lazar, 2002) ocasionado por la obesidad debido a la alimentación alta en grasas y carbohidratos, el estilo de vida sedentario y factores genéticos. El exceso de AGL inhiben la señalización de la insulina, lo que conduce a la reducción en el transporte de glucosa mediada por el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) en el músculo esquelético y tejido adiposo y otros tejidos, además tienen efecto lipotóxico en muchos tejidos, como el hígado, músculo esquelético y páncreas, sucesivamente se reduce la captación de glucosa, induciendo hiperglicemia y la gluconeogénesis, limitando la secreción de insulina (Boden y Shulman, 2002; Gross y Staels, 2007). Además, el exceso de tejido adiposo favorece la síntesis de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), citocinas que inhiben la acción de la insulina, además de la proteína quimio

atrayente de monocitos 1 (MCP-1), involucrada en el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo, promoviendo un estado inflamatorio crónico.

3.4 Datos epidemiológicos de la diabetes

Los cálculos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) indican que el 8,3% de los adultos 382 millones de personas tienen diabetes, y el número de personas con la enfermedad se incrementará en más de 592 millones en menos de 25 años. Sin embargo, con 175 millones de casos no diagnosticados actualmente, una gran cantidad de personas con diabetes van a desarrollar progresivamente complicaciones en donde los sistemas de salud no están preparados (Guariguata, 2013). Es la quinta causa de mortalidad en la mayoría de los países desarrollados, hay cerca de 246 millones de personas en el mundo que sufre esta enfermedad (Ahmad, 2014), siendo la mayoría de estas personas de entre 40 y 59 años, y el 80% de ellas vive en países de ingresos medios y bajos. Todos los tipos de diabetes aumentan, en particular la diabetes tipo 2: el número de personas con diabetes casi se duplicará en el año 2035. Se estima que otros 21 millones de casos de altos niveles de glucosa en el embarazo contribuirán a la carga mundial de la diabetes. Las madres de 17% de nacidos vivos en 2013 tenían algún tipo de alto nivel de glucemia durante el embarazo (Guariguata, 2013).

Tanto en términos humanos como financieros, la carga de la diabetes es enorme. Provoca 5,1 millones de muertes y ha representado unos 548.000 millones de

dólares en gastos de salud (11% del gasto total en todo el mundo) en 2013 (Guariguata, 2013).

Debido a que la DM2 es uno de los problemas crecientes de salud mundial, existe una gran variedad de fármacos para su tratamiento, siendo su efecto principal disminuir la glucosa en sangre, así como también disminuir las concentraciones de lípidos en sangre, favoreciendo la sensibilidad a la insulina, lo cual hacen a través de varios mecanismos, mostrándose a continuación.

3.5 Fármacos utilizados para el tratamiento de la DM2

3.5.1 Sulfonilureas

Las sulfonilureas son fármacos que actúa a nivel pancreático, mediante el bloqueo de los canales de potasio (K^+), lo que provoca la despolarización de la membrana, evento que genera la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) promoviendo la liberación de insulina (secretagogo); sin embargo, se puede inducir hipoglucemia, lo cual puede llevar a estado de coma e incluso la muerte. La hipoglucemia causa la liberación de hormonas, como glucagón, epinefrina, norepinefrina y cortisol; estas incrementan la demanda de oxígeno del miocardio, pudiendo disminuir el suministro de sangre al corazón, promoviendo la vasoconstricción coronaria, además de promover el agotamiento del páncreas y su deterioro (Chang *et al.*, 2011).

3.5.2 Biguanidas

Otros fármacos influyen sobre el metabolismo de la glucosa, un ejemplo es la metformina, inhibiendo la producción de glucosa hepática; sin embargo su uso está

asociado a efectos colaterales adversos gastrointestinales y se encuentra contraindicado en pacientes con insuficiencia renal (Apovian, 2011).

3.5.3 Inhibidores de las alfa glucosidasas

Estos fármacos tienen como blanco principal la inhibición de las enzimas glucoamilasa, sucrasa, maltolasa e isomaltosa del tracto digestivo, que se encargan de degradar y convertir los carbohidratos en moléculas más simples que puedan absorberse a través del intestino; por lo que, al estar inhibidas, impiden la absorción de carbohidratos. Sin embargo, el incremento en la cantidad de carbohidratos en el tubo digestivo, fomenta el desarrollo bacteriano, dolor abdominal, flatulencias y diarrea, así mismo, se ha observado que incrementan las transaminasas hepáticas (Apovian, 2011; Bailey, 2000; Bano, 2013; Krentz y Bailey, 2005).

3.5.4 Inhibidores DDP4

Algunos otros fármacos actúan inhibiendo a la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DDP4) (gliptinas), estas anulan la acción de las DDP4, inhibiendo la degradación de hormonas incretinas, como el péptido similar al glucagón (GLP-1), que tiene la función de inhibir al glucagón, disminuyendo la glucogenólisis, y del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), que favorece la liberación de insulina. Algunos estudios han asociado el uso de estos medicamentos con varios padecimientos como reacciones alérgicas de la piel, disfunción del sistema inmune, vómito, diarrea y náusea, aunque no se ha dilucidado la causa de estos padecimientos (Capuano *et al.*, 2013; Gallwitz, 2013).

3.5.5 Inhibidores SGLT2

Un ejemplo es la canagliflozina, son fármacos inhibidores de los transportadores de Na^+ /glucosa, impiden la reabsorción de glucosa a nivel renal sin embargo tienen efectos adversos como deshidratación, infecciones urinarias genitales, pérdida de peso (Apovian, 2011).

3.5.6 Secuestradores de ácidos biliares

El colesevelam es un tipo de medicamento que actúa como secuestrador de ácidos biliares, lo que impide la reabsorción de ácidos grasos y colesterol, disminuyendo los niveles de colesterol, actuando como hipolipidémico, favoreciendo la sensibilidad a la insulina (Apovian, 2011).

3.5.7 Agonistas de PPARs

Otros medicamentos actúan mediante la activación de factores de expresión nuclear PPAR (Receptores activados por proliferadores de peroxisomas), estos se encargan de regular la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de lípidos y carbohidratos disminuyendo glucosa y AGL en sangre, además de afectar la síntesis de citocinas inflamatorias, características del estado inflamatorio presente en la diabetes y la obesidad, y que además afectan la señalización de la insulina. Existen 3 tipos: los fibratos, agonistas de $\text{PPAR}\alpha$, las glitazonas, agonistas de $\text{PPAR}\gamma$ y los agonistas de $\text{PPAR}\delta$, como el L-1654. Los PPARs son un blanco terapéutico interesante, debido a que regulan el metabolismo de lípidos y carbohidratos, siendo el desbalance de estos el problema principal de la DM2 y otras enfermedades relacionadas al síndrome metabólico (SM).

3.6 Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los PPARs son factores de transcripción nuclear dependientes de ligando, que participan en la regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. La familia PPARs tiene tres isoformas PPAR α , PPAR β/δ , (δ en mamíferos) y PPAR γ (Gilardi *et al.*, 2014; Gross y Staels, 2007; Kelly, 2001; Toyoda *et al.*, 2008).

3.6.1 Mecanismo de activación de los PPARs

Para que se activen los PPARs se necesitan una serie de eventos moleculares que culminan con la expresión de diversos genes. Todos los miembros de la familia de PPAR forman heterodímeros con el factor retinoide X 9-cis (RXR). En la ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR se encuentra unido a un correpresor, correpresor del receptor nuclear (NCOR) o el mediador del silenciamiento del receptor de la hormona tiroidea y retinoide (SMRT), esta unión mantiene inactivo al PPAR. Cuando el heterodímero PPAR-RXR es activado por su ligando, hay un cambio conformacional del PPAR, lo que permite la liberación del correpresor y se recluta el complejo coactivador (potencia la unión al ADN y la transcripción) formado por el coactivador de receptor nuclear 1 (SCR-1), proteína coactivadora transcripcional p300 (CBP/p300), el coactivador-1 de PPAR (PGC-1) y la proteína de unión a PPAR (PBP/TRAP220). Una vez completa la maquinaria transcripcional se

une el heterodímero PPAR-RXR al ADN en secuencias específicas llamadas elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE) las cuales tienen una secuencia repetitiva AGGTCA (ver figura 1). Adicionalmente se ha demostrado que la actividad de los PPAR puede ser regulada por eventos de fosforilación, de lo cual se hablará más adelante (Burns y Vanden Heuvel, 2007; Gross y Staels, 2007; Kelly, 2001; Seimandi *et al.*, 2005).

3.6.1 PPAR α

Se expresa en hígado, riñón, músculo esquelético, tejido adiposo subcutáneo y visceral. Está involucrado en la captación, activación y oxidación de los ácidos grasos (Berger y Moller, 2002; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Fievet *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2002). PPAR α regula la expresión de genes involucrados en el transporte membranar de AGL, como proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), proteína transportadora de ácidos grasos CD36 (FAT/CD36) y proteína de unión a ácidos grasos (FABP), la proteína piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) que tiene un rol en la gluconeogénesis (Gross y Staels, 2007), además de las proteínas involucradas en el transporte de acil CoA a través de la membrana mitocondrial, como Acil-CoA sintetasa (ACS), las proteínas carnitín palmitoil transferasa I y II (CPT I y II), además de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma, como la acil-CoA oxidasa (ACO), y otras participantes en la β -oxidación como Acil-CoA deshidrogenasa y 3 hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa/deshidrogenasa, ceto-acil-CoA tiolasa, enzima

málica y hidroximetilglutaril-CoA sintasa mitocondrial; y las proteínas desacoplantes 2 y 3 (UCP2 y UCP3) (Barger y Kelly, 2000; Kelly, 2001; Komatsu *et al.*, 2010).

La activación de PPAR α puede también ser regulada positivamente a través de eventos de fosforilación mediante varias vías de señalización; dichas fosforilaciones se dan en residuos de serina (Ser) y se llevan a cabo por varias cinasas, como la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), proteína caseína cinasa 2 (CK2), glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), proteína cinasa A (PKA) y Proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa activada por AMP-5' (AMPK) (Burns y Vanden Heuvel, 2007; Kelly, 2001). Por lo tanto, PPAR α funge como sensor de AGL en sangre, disminuyendo el contenido de lípidos en sangre, a través de dos mecanismos; promoviendo la síntesis de enzimas involucradas en la β -oxidación y de proteínas captadoras de ácidos grasos, favoreciendo la acción de la insulina y evitando la lipotoxicidad de AGL (Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Park *et al.*, 2001).

3.6.2 PPAR δ

El PPAR δ interviene en la regulación del colesterol y en el metabolismo de lípidos, se encuentra distribuido de manera ubicua, siendo el tejido adiposo blanco y marrón, músculo esquelético, tracto digestivo, los sitios en donde mayoritariamente se expresan. Por otro lado, corazón, riñón, hígado, músculo esquelético y cerebro, son los tejidos que presentan menor expresión (Reilly y Lee, 2008). PPAR δ está implicado en la diferenciación y proliferación de adipocitos; en el músculo esquelético participa en el catabolismo de lípidos. La activación de PPAR δ promueve la

expresión de genes asociados con la incorporación de lípidos, tales como FABP y FATP, además de otras proteínas involucradas en la hidrólisis de triglicéridos, como la LPL, así como en la oxidación de AG como la enzima Acil-CoA de cadena larga sintetasa (ACCLS), ACO y UCP1 y UCP3 involucradas en el desacoplamiento de la membrana de la mitocondria, permitiendo la liberación de H⁺ en forma de calor; evento llamado termogénesis (Barish *et al.*, 2006; Benjamin y Spener, 2009; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005).

3.6.3 PPAR γ

El PPAR γ se expresa en tejido adiposo blanco y marrón, colon, células endoteliales, músculo esquelético, porción del ciego del intestino y macrófagos (Balakumar *et al.*, 2007). PPAR γ es considerado uno de los maestros reguladores de la adipogénesis junto con la proteína de unión y amplificación de la caja CCAAT α (CEBP- α), ya que regula la diferenciación de los pre-adipocitos en adipocitos, favoreciendo la constitución genética del adipocito maduro (Gregoire *et al.*, 1998). La activación de PPAR γ regula la expresión de muchos genes, que incluyen proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzima involucrada en el metabolismo de la glucosa, así como también de la proteína de captura de glicerol (GyK). Otro gen que regula es la anexina II, proteína involucrada en la proliferación y crecimiento celular; además del regulador de la señalización de proteína G 2 (RGS2) a la cual se le ha atribuido efectos protectores contra la hipertrofia del miocardio (Sears *et al.*, 2007). También regula la síntesis de enzimas involucradas en la lipogénesis como la lipoproteína lipasa (LPL), así como transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4),

adiponectina, FATP, FAT/CD36. GLUT 1 y 4 son proteínas captadoras de glucosa, lo que favorece el transporte de ésta dentro de las célula, la LPL se encarga de hidrolizar triglicéridos (TG) en AGL, favoreciendo la captura de éstos, FATP y FAT/CD36 son otras proteínas encargadas de la captura de ácidos grasos, disminuyendo la dislipidemia, favoreciendo la acción de la insulina. Por otro lado, la adiponectina es una citocina antiinflamatoria que también es sintetizada a partir de la activación de PPAR γ , es propia del tejido adiposo, y tiene efecto en órganos como el hígado, musculo esquelético y el mismo tejido adiposo, la cual favorece la biogénesis mitocondrial y capacidad oxidativa, la cual es favorable para el metabolismo de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos, también promueve la activación y síntesis de PPAR γ y PPAR α mediante la activación de sus receptores ADIPO1 (ubicuo) y ADIPO2 (hígado y musculo esquelético) vía Akt, la translocación de GLUT4 a la membrana, en músculo esquelético favorece el transporte de glucosa y síntesis de glucógeno, lipogénesis, disminuyendo la gluconeogénesis, en tejido adiposo promueve la translocación de GLUT4 a la membrana, induciendo la glucolisis, la síntesis de glucógeno y la adipogénesis, disminuyendo la lipólisis (Bailey, 2000; Ghoshal y Bhattacharyya, 2015). La activación de PPAR γ también tiene funciones inhibitorias, inhibe la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), inhibiendo la síntesis de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Chiarelli y Di Marzio, 2008), a las cuales se les ha adjudicado inhibir la acción de la insulina.

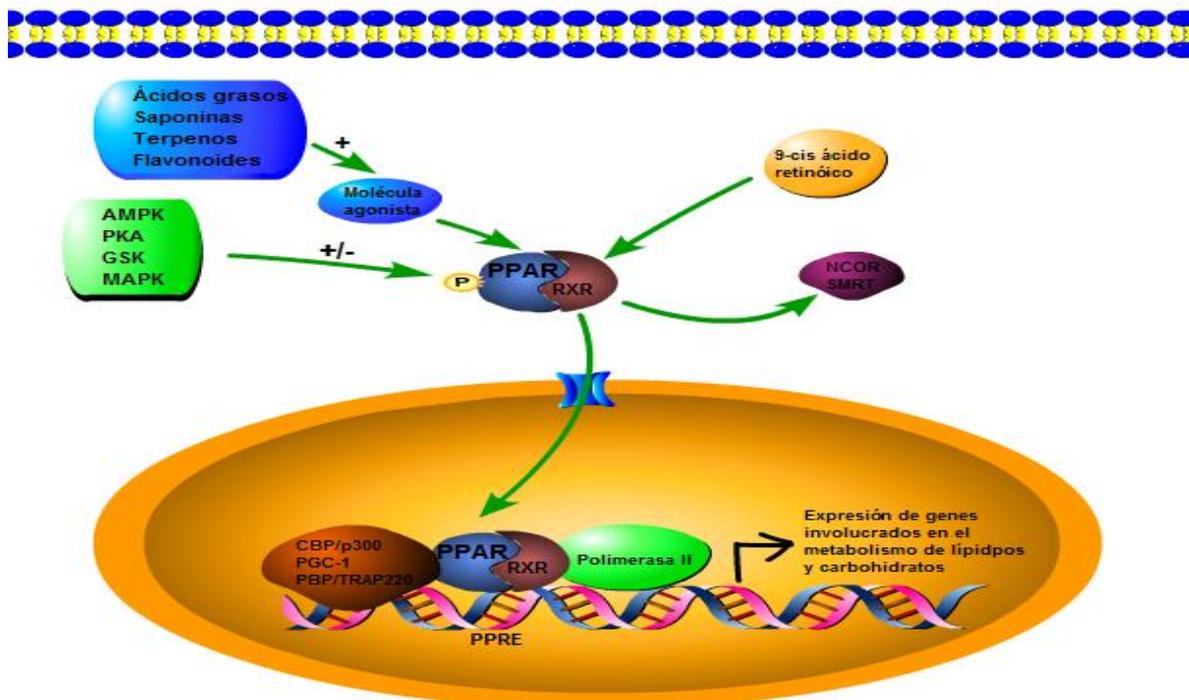


Figura 1. Representación general de la activación de los PPARs. Imagen creada a partir de (Barger y Kelly, 2000; Burns y Vanden Heuvel, 2007; Gross y Staels, 2007; Kelly, 2001).

Como hemos visto los PPARs son un blanco interesante para el tratamiento de DM2 y otras asociadas al SM, por lo cual se ha buscado moléculas en plantas medicinales y/o en sintetizar moléculas que activen a los PPARs.

3.7 Agonistas de PPAR

3.7.1 Agonistas sintéticos de PPAR α

Dentro de los agonistas de PPAR α se encuentran los fibratos (fenofibrato, clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrozilo), utilizados como fármacos hipolipidémicos, ya

que disminuyen los lípidos en sangre e incrementa el la oxidación de ácidos grasos, lo que favorece la sensibilidad a la insulina (Gross y Staels, 2007). El uso de estos fármacos han sido asociados con algunos efectos adversos, como lesiones del páncreas, problemas cardiacos, tumor en hígado y edema (Alberti *et al.*, 2007; Balakumar *et al.*, 2007; Bulchandani *et al.*, 2012; Duval *et al.*, 2004; Pinelli *et al.*, 2005) (Tabla 1), sin embargo aún no se sabe con claridad el origen de estos efectos adversos, se sugiere que estos medicamentos puedan tener efecto toxico sobre otros tejidos

3.7.2 Agonistas endógenos y naturales de PPAR α

Los ligandos naturales conocidos para PPAR α son los ácidos grasos insaturados, como el ácido araquidónico, linoléico, oleico y, en menor proporción, los ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico. Así como eicosanoides, prostaglandinas y algunos terpenos (farnesol, geraniol y geranilgeraniol) (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Takahashi *et al.*, 2002). Algunos flavonoides que constituyen la raíz de la planta *Sophora flavescens*, promueven la transactivación de PPAR α (Quang *et al.*, 2013), el ácido sargaquinóico y el ácido sargahidroquinóico, perteneciente a *Sargassum yezoense* han mostrado activar PPAR α en células 3T3-L1 (Kim *et al.*, 2008). La flavonona hesperetina promueve la expresión de PPAR α en cultivo celular de la línea 3T3-L1 (Liu *et al.*, 2008). En la medicina coreana, el complejo herbal gyeongshingangjeehwan conformado por cuatro plantas (*Liriope platyphylla* F.T. Wang & T. Tang (Liliaceae), *Platycodon grandiflorum* A. DC. (Campanulaceae), *Schisandra chinensis* K. Koch

(Magnoliaceae), y *Ephedra sínica Stapf* (Ephedraceae), inhibe la acumulación de tejido adiposo mediante la activación de PPAR α en células HepG2 (Shin et al., 2010). En estudios en células HepG2 transfectadas, algunos extractos de plantas, semillas y frutos medicinales, tales como *Arnica montana*, *Artemisia capillaris*, *Ceanothus velutinus*, *Centella asiática*, *Coix lacryma-jobi*, *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Illicium anisatum*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus virginiana*, *Pimpinella anisum*, *Platyclusus orientalis*, *Rudbeckia lanciniata*, *Sida acuta*, *Sida cordifolia*, *Terminalia arjuna*, *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula*, *Terminalia pallida*, *Thymelaea hirsuta*, *Veratum lobelianum* promueven activación de PPAR α en células de la línea celular 3T3-L1 (Yang et al., 2013).

3.7.3 Agonistas sintéticos de PPAR δ

Los agonistas sintéticos son la carbaprostaciclina y moléculas que derivan del ácido fenoxacético, como el GW501516 y GW0742. Otro agonista sintético es el L165041. Actúan regulando positivamente la expresión de genes involucrados en el catabolismo de lípidos, disminuyendo lípidos en sangre, favoreciendo la sensibilidad a la insulina. Sin embargo se ha asociado su uso a cardiopatías, principalmente arritmias, debido a que se ha descubierto que estos fármacos son agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales al activarse despolarizan la membrana celular, activando el mecanismo de contracción del músculo cardíaco. Además, es importante mencionar que otros fármacos dirigidos a la activación de este PPAR se encuentran en fase de estudio clínico I y II debido principalmente a

estos problemas mencionados (Barish *et al.*, 2006; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Luquet *et al.*, 2005; Reilly y Lee, 2008).

3.7.4 Agonistas endógenos y naturales de PPAR δ

Los agonistas endógenos para PPAR δ son los ácidos grasos de cadena larga de 14-20 carbonos, ácidos grasos poliinsaturados, e insaturados, eicosanoides, prostaglandina A1 (Barish *et al.*, 2006). Los agonistas conocidos naturales son el ácido sargaquinóico y el ácido hidrosargaquinóico quinonas constituyentes del alga *Sargassum yezoense* tiene efecto en la expresión de PPAR δ en línea celular 3T3-L1 (Kim *et al.*, 2008). Estudios han demostrado que los ácidos grasos omega 3 activan PPAR δ en ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en fructosa, disminuyendo triglicéridos, colesterol en sangre y disminución de triglicéridos en hígado (Karsenty *et al.*, 2013).

3.7.5 Agonistas sintéticos de PPAR γ

Las glitazonas como rosiglitazona y pioglitazona, son agonistas de PPAR γ en el tejido adiposo y músculo esquelético, actúan como sensibilizadores de insulina. La activación de PPAR γ regula la expresión de genes involucrados en la captura de glucosa y lípidos, además inhiben la lipólisis y la liberación de AGL, aminorando la lipotoxicidad son utilizados en el tratamiento de la DM2 (Apovian, 2011; Benz *et al.*, 2012; Kelly, 2001). Sin embargo, se ha asociado el uso de estos medicamentos al aumento de peso corporal, riesgo cardiovascular, edema, pérdida de masa ósea, riesgo de cáncer de vejiga (Apovian, 2011; Defronzo *et al.*, 2013), se creó que la ganancia de peso es debida a la acumulación de triglicéridos y glucosa en el tejido

adiposo. Sin embargo, se han asociado diversos padecimientos en el consumo de estos medicamentos; como riesgo cardiovascular, edema, pérdida de masa ósea. Aún no es claro porque estos fármacos pueden actuar en el desarrollo de estos efectos adversos. Estudios en ratones knockout ob/ob han demostrado que los agonistas pioglitazona y rosiglitazona incrementan el contenido hepático de triglicéridos y favorecen el desarrollo de esteatosis (Zhang *et al.*, 2014). La troglitazona fue retirada del mercado debido a que su consumo tenía efecto hepatotóxico (Gross y Staels, 2007). En otro estudio se comprobó que el uso de tiazolinedinedionas (TZD) está asociado a atrofia cardiaca (Gross y Staels, 2007).

3.7.6 Agonistas endógenos y naturales de PPAR γ

Los agonistas reportados son los ácidos grasos principalmente insaturados, como el ácido oleico, linoleico, linoleato, oleato y el ácido eicosapentanóico. Un agonista endógeno es el ácido araquidónico (Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Ortuno Sahagun *et al.*, 2012), así mismo, derivados de prostaglandinas (Sears *et al.*, 2007). Otros agonistas naturales son los isoprenoides farnesol, geraniol y geranilgeraniol actúan como ligandos de PPAR γ en células de la línea 3T3-L1 y HepG2 (Takahashi *et al.*, 2002). La Anandamida, un endocanabinoide demostró ser ligando de PPAR γ en células 3T3-L1. Algunos polifenoles, como la curcumina aumenta la expresión de PPAR γ en células cancerosas de colon. Los ácidos grasos omega 3 como el ácido decosahexanóico (DHA) y el ácido eicosapentaenóico (EPA) y el ácido fitánico aumentan la toma de glucosa y reduciendo la RI (Janani y Ranjitha Kumari, 2015). La genisteína, una isoflavona encontrada en la soya tiene efecto lipogénico mediante la

activación de PPAR γ (Ortuno Sahagun *et al.*, 2012). El ácido glicirrizisínico compuesto encontrado en la raíz de la planta regaliz, demostró aumentar la expresión de PPAR γ (Yoke Yin *et al.*, 2010). Otros compuesto interesante que ha mostrado ser agonista de PPAR γ , es el dialil disulfido encontrado en el ajo y la curcumina, constituyente mayoritario de la cúrcuma. Otros compuestos naturales como el resveratrol, encontrado en las uvas, regulan negativamente la expresión de PPAR γ en adipocitos viscerales humanos (Ortuno Sahagun *et al.*, 2012). Los flavonoides naringenina y hesperitina provenientes de la planta *Citrus aurantium* promueven la expresión de PPAR γ en línea celular U20s de osteosarcoma (Liu *et al.*, 2008). El honokiol, un neoglicano aislado de la planta *Magnolia officinalis* tiene efecto agonista de PPAR γ en células 3T3-L1 (Atanasov *et al.*, 2013). El gingenósido *Panax ginseng* promueve la adipogénesis y disminuye la RI mediante la activación de PPAR γ en cultivo celular 3T3-L1 (Gao *et al.*, 2013).

Varios extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de la DM2, han demostrado ser agonistas de PPAR γ en cultivo celular HepG2 transfectadas, tales como *Arbutus unedo*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Daphne gnidium*, *Foeniculum vulgare*, *Juniperus virginiana*, *Thymelaea hirsuta* (Yang *et al.*, 2013). Estudios computacionales mediante docking molecular demostraron mediante la predicción de acoplamiento flavonoide-PPAR γ , varios flavonoides que pueden ser agonistas de PPAR γ , dentro de los que destacan: 10-Gingediol, 10-gingediona, 4,5 dihidroxiflavona, 4,7 dometoxiisoflavona, genisteina, hesperidina, psi-baptigenina (Salam *et al.*, 2008), algunos otros actúan como antagonistas de PPAR γ , el protopanaxatriol, un

gingenosido constituyente de *Panax ginseng*, alivia la esteatosis en ratones Knockout *ob/ob* y en ratones con dieta alta en grasa, inhibiendo la adipogénesis a través de efecto antagonista de PPAR γ (Zhang *et al.*, 2014).

3.7.7 Agonistas sintéticos duales de PPARs

El ragaglitazar un agonista dual de PPAR α/γ (Liu *et al.*, 2013), ha demostrado tener efectos sobre estos PPARs. En otros estudios, el muraglitazar, un agonista dual similar al ragaglitazar, ha demostrado inducir ganancia de peso en ratones *db/db* e incluso produce edema (Mittra *et al.*, 2007). El tesaglitazar, otro agonista dual de PPAR γ/α , se observó que en tejido adiposo de ratones induce fibrosarcoma (Glinghammar *et al.*, 2011), sin embargo aún no se ha descubierto el mecanismo por el cual se desarrollan estos efectos adversos. El compuesto sintético híbrido tiazolidin-2,4-dion/bifenilcarbonitrilo, mediante estudio *in vivo* como *in silico* demostró aumentar la expresión de PPAR α/γ (Hidalgo-Figueroa *et al.*, 2013). Otro agonista sintético es el GFT505, el cual demostró disminuir lípidos y glucosa en sangre, además de disminuir la RI (Cariou *et al.*, 2011). El compuesto C333H indicó ser agonista dual de PPAR α/γ , con efecto mayor que el fenofibrato y la rosiglitazona respectivamente en células 3T3-L1 (Xu *et al.*, 2006). El saroglitazar es un agonista dual de PPAR α/γ recientemente aprobado en la India para el tratamiento de pacientes con DM2, hiperlipidemia e hipertrigliceridemia en pacientes que no pudieron ser controlados mediante estatinas (Bronson Joanne, 2014).

3.7.8 Agonistas naturales duales de PPARs

El amorfastilbol un compuesto aislado de las semillas de la planta *Robinia pseudoacacia* y algunos de sus derivados, tienen la capacidad de activar PPAR α / γ en cultivo de células 3T3-L1 (Kim *et al.*, 2012). Otro estudio demostró que los isoprenoles geraniol, farnesol y geranilgeraniol, son agonistas duales de PPAR α / γ en cultivo celular 3T3-L1 y HepG2 (Takahashi *et al.*, 2002). Los extractos de las plantas *Daphne gnidium* y *Thymelaea hirsuta*, los frutos *Illicium anisatum*, *Juniperus virginiana* y *Terminalia chebula* poseen actividad agonista dual de PPAR α / γ en células 3T3-L1 (Yang *et al.*, 2013).

Como hemos visto, existen muchos fármacos sintéticos para el tratamiento de la DM2, sin embargo sólo disminuyen la hiperglucemia de manera temporal, originado principalmente, por el hecho de que son agonistas potentes, además la mayoría de ellos se encuentran en fase experimental (Berger *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Fredenrich y Grimaldi, 2005; Irons y Minze, 2014). Un punto importante es que no hay agonistas duales de PPAR δ . Antes mencionado, algunos agonistas de PPAR δ tienen efectos adversos como arritmias o problemas hepáticos, y por otro lado los agonistas de PPAR γ inclinan el balance energético hacia una sola dirección, es decir, hacia la acumulación de lípidos, provocando el aumento de peso y la consecuente obesidad, que a largo plazo y en la mayoría de los casos, contribuye nuevamente al origen de la DM2.

4. ANTECEDENTES

El desbalance del metabolismo de lípidos y carbohidratos, generado por la alimentación alta en grasas y carbohidratos, el sedentarismo y algunos factores genéticos, es una condición que caracteriza a la obesidad y que promueve el desarrollo de DM2.

Los PPARs representan un blanco terapéutico interesante, ya que se encargan de regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, principalmente en la toma y oxidación de lípidos, así como también en metabolismo y captación de glucosa (Bailey, 2000; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Flores *et al.*, 2005; Janani y Ranjitha Kumari, 2015; Kelly, 2001).

Se calcula que en el mundo existen entre 200 mil y 500 mil especies de plantas superiores y en México la diversidad se estima entre 23 mil y 30 mil especies. La diversidad química en las plantas es muy amplia y poco estudiada, sólo se ha estudiado un porcentaje mínimo de especies vegetales en relación a la estructura química y propiedades biológicas de sus compuestos. El conocimiento que se tiene en la actualidad de las propiedades de los fitoquímicos ha contribuido enormemente a resolver problemas de salud ya que una alta proporción de los medicamentos que se utilizan son derivados de plantas (Montes, 2009).

En la actualidad se ha intensificado la búsqueda de moléculas dirigidas a la activación dual sobre los PPARs. En este sentido, las plantas medicinales representan una fuente importante de nuevas moléculas. La terapéutica empleando

agonistas duales de PPARs podría mejorar la condición del paciente de manera global, aumentando la sensibilidad a la insulina, favoreciendo la oxidación de AGL e incluso mejorando la condición inflamatoria presente en los pacientes. Como hemos revisado, la DM2 y otras enfermedades principalmente asociadas a la obesidad y el SM, se caracterizan por el desbalance energético regulado por los PPARs, siendo de importancia la activación dual de PPAR δ/γ , ya que esta favorece el equilibrio del metabolismo, revirtiendo la condición metabólica a la cual se encuentran sometidos estos individuos.

Se ha reportado que algunos extractos y compuestos derivados de plantas medicinales, como son ácidos grasos, flavonoides y terpenos, pueden ser agonistas de PPARs (Atanasov *et al.*, 2013; Balakumar *et al.*, 2007; Banga *et al.*, 2009; Bassaganya-Riera *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2005; Kelly, 2001; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Ortuno Sahagun *et al.*, 2012; Quang *et al.*, 2013; Salam *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2002). Por tal motivo, las plantas medicinales representan un campo de estudio muy amplio para la búsqueda de este tipo de fármacos ya que las plantas contienen una gran variedad de compuestos con propiedades benéficas para la salud, estableciendo a los que los ácidos grasos, flavonoides, terpenos y otras moléculas como potenciales agonistas de PPARs.

A nivel mundial se han reportado más de 800 plantas utilizadas empíricamente para el tratamiento de la DM2. Tan solo en México existen cerca de 170 plantas que se usan empíricamente para el tratamiento de la diabetes, dentro de estas solo una pequeña parte ha sido sometida a dilucidar su mecanismo de acción.

Dentro de las plantas con potencial efecto agonista dual de PPARs se encuentran *Hibiscus sabdariffa*, *Tillandsia usneoides* y *Psacalium decompositum*, quienes presentan diversos efectos benéficos para la salud, principalmente son utilizadas para el tratamiento de la obesidad y la DM2. A pesar de que se cuenta con diversos estudios que respaldan su actividad biológica, el mecanismo de acción por el cual actúan no ha sido descrito, y es muy probable que involucre la participación de PPARs.

4.1 Plantas medicinales como posibles agonistas de PPAR y modelos de estudio

4.1.1 *Hibiscus sabdariffa*

Esta planta es originaria de Asia, perteneciente a la familia de las Malváceas, popularmente conocida en México como “Jamaica” o “flor de Jamaica”. En México se cultiva en varios estados de la república debido a que sus flores se utilizan para preparar platillos y la preparación de bebidas; los estados con mayor cultivo son Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nayarit, Puebla, Tabasco y Veracruz. Ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional como agente antiobesidad, antihipertensivo, diaforético, diurético y coagulante. Sus principales constituyentes químicos son ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). La quercitina es un compuesto identificado en esta planta, a la que se le ha atribuido incrementar la vasorelajación a nivel renal mediante el incremento en la filtración glomerular, mientras que su efecto diurético se ha

asociado a la liberación de óxido nítrico (Alarcón-Alonso *et al.*, 2012). Asimismo, se ha reportado que reduce la hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). Otros estudios han demostrado pérdida de peso y decremento en los niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina (Mohamed *et al.*, 2013). Delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido son algunas antocianinas constitutivas de esta planta, a las que se les ha atribuido efectos hipertensivos, antioxidantes e hipocolesterolémicos (Hopkins *et al.*, 2013). También se ha comprobado una disminución en colesterol, triacilglicéridos y LDL en adolescentes con obesidad (Sabzghabae *et al.*, 2013). Se ha reportado que el extracto acuoso de esta planta inhibe la diferenciación de adipocitos a través de cascadas de señalización PI3-K (de sus siglas en inglés fosfatidil Inositol-3-fosfato) y MAPK (de sus siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinase) y consecuentemente se inhibe la adipogénesis (Gooda Sahib *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2007). Se ha sugerido que al estar involucrada en la inhibición de la adipogénesis podría estar actuando a través de PPAR γ y C/EBP α , ya que estos son reguladores en del metabolismo de lípidos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Otros estudios han demostrado que las antocianinas cianidina 3 glucósido (C3G) y cianidina (Cy) tienen efecto positivo en la expresión de leptina y adiponectina, asimismo la Cy favorece la síntesis de LPL, proteína de anclaje de ácidos grasos (aP2), UCP2 y PPAR γ . Además la administración de estas antocianinas en adipocitos, promueven la activación de AMPK mediante su fosforilación, cinasa involucrada en procesos de oxidación de ácidos grasos (Tsuda

et al., 2004). Al ser un agente antihiper glucémico, antiinflamatorio, y regular negativamente la adipogénesis su mecanismo de acción probablemente sea a través de los PPARs.

4.1.2 *Tillandsia usneoides*

Planta conocida comúnmente como “heno” o “musgo español”, pertenece a la familia Bromilaceae, originaria de México y el sur de E.U.A. Se ha utilizado para aliviar los síntomas de la DM2, ya que algunos estudios han comprobado su efecto hipoglucémico. Otros estudios han demostrado que el extracto acuoso produce su máximo efecto hipoglucémico después de 4 a 7 días a la exposición crónica y detiene el desarrollo de DM inducida por aloxana (de Queiroga *et al.*, 2004; Marles y Farnsworth, 1995). Previamente se han identificado constituyentes orgánicos tales como azúcares, ácido ascórbico, caroteno, triterpenos, esteroides libres y esterificados, flavonoides y glucósidos (Witherup *et al.*, 1995). Otros compuestos identificados, se le han atribuido propiedades hipoglucemiantes, como son el 5,39-Dihidroxi-6,7,8,49-tetrametoxiflavona , 1,3-di-O-cinnamoilglicerol y ácido caféico (de Queiroga *et al.*, 2004). Otros investigadores han identificado y propuesto algunos otros compuestos activos, tales como alicina, alil- propil disulfuro y ácido 3-hidroxi-3-metil glutárico, tienen el mismo efecto hipoglucémico (Li *et al.*, 2004). Debido a las propiedades que posee esta planta, es necesario investigar acerca de su mecanismo de acción. Algunos de sus principales constitutivos son terpenos, dentro de los que se han identificado los triterpenos cicloeucalenol, cicloartenol y el 24-

metilencicloartanol pudiendo ser alguno de estos actuar sobre PPAR δ y/o PPAR γ (Atallah, 1971).

4.1.3 *Psacalium decompositum*

Psacalium decompositum (A. Gray) H. Rob. y Brettell (Asteraceae) es un arbusto originario del norte de México, principalmente distribuido en el estado de Chihuahua y Sonora, nombrada comúnmente como “matarique”. Es utilizada empíricamente para tratar a la DM, ya que se le han atribuido propiedades hipoglucemiantes en ratones sanos (Contreras-Weber *et al.*, 2002). También, se han identificado compuestos sesquiterpenos (eremofilanos y eremofilanos ramificados), como el cacalol, cacalona, maturina, maturinona y maturonesona, que se han asociado con la liberación de insulina en las células β -pancreáticas, los cuales también se han asociado con efectos antiinflamatorios, además se de tener efecto hipoglucemiante en ratones diabéticos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2000b; Campos *et al.*, 2009; Delgado, 2006). Recientemente se ha reportado que una fracción rica en oligosacáridos (FOS) de *P. decompositum* promueve un descenso en los niveles de algunos marcadores de inflamación, como IL-6, interferón, (IFN- γ) y MCP-1, así como de triglicéridos y peso corporal, mejorando incluso la tolerancia a la glucosa en ratas Wistar (Merino-Aguilar *et al.*, 2014). Como hemos visto *P. decompositum* es una planta que posee dentro de sus componentes mayoritarios una gran cantidad de terpenos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2000a; Alarcón-Aguilar *et al.*, 2000b; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Delgado, 2006), siendo algunos de estos posibles agonistas de PPARs debido a los

efectos ya mencionados que posee esta planta, siendo la activación de los PPARs uno de sus mecanismos posibles.

4.2 Tejido adiposo como modelo de estudio

El tejido adiposo es un tejido importante en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos, es considerado un tejido endócrino debido a que produce diversas moléculas, entre ellas hormonas (adiponectina y leptina) que afectan el metabolismo y función de órganos y tejidos incluyendo músculo, hígado, vasculatura y cerebro (Hajer *et al.*, 2008). Es un tejido regulador de la sensibilidad a la insulina ya que de él depende gran parte del almacenamiento, catabolismo y liberación de lípidos, y parte de la captación de glucosa, principalmente regulada por PPAR δ y PPAR γ . El tejido adiposo es el único órgano que libera adiponectina que como hemos visto es sintetizada a partir de la activación de PPAR γ , ésta tiene efecto en varios órganos; el músculo esquelético e hígado. En el musculo esquelético promueve la oxidación de ácidos grasos, activa la síntesis de PPAR γ favoreciendo la toma de glucosa y translocación de GLUT4, en el hígado mediante su receptor AdipoR2 aumenta la síntesis de glucógeno mediante AMPK, disminuye la gluconeogénesis, además un agonista de AMPK, promueve la síntesis de PPAR α , PPAR δ y PPAR γ . AMPK también favorece la β -oxidación, inhibiendo a la acetil CoA carboxilasa (ACC) (Ceddia, 2013). La adiponectina es una hormona que favorece la sensibilidad a la insulina (Ghoshal y Bhattacharyya, 2015; Palomer *et al.*, 2005). La mayoría de los extractos y/o moléculas con efecto agonista de estos PPARs, han sido evaluados en

el tejido adiposo ya que es uno de los principales órganos que regulan el metabolismo de AG y glucosa, siendo los reguladores maestros PPAR δ y PPAR γ , además es donde se expresan mayoritariamente, de ahí la importancia de evaluarlos en este tejido.

4. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de la DM2, tanto en México como a nivel mundial, se ha incrementado drásticamente en los últimos años. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la DM2 controlan el problema sólo temporalmente y en la mayoría de los casos producen efectos adversos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1994) las plantas medicinales son fundamentales para el desarrollo de nuevos fármacos, recurriendo cada vez más a las plantas como estrategia de búsqueda de soluciones nuevas y menos costosas para el cuidado de la salud. Las plantas medicinales con propiedades antihiper glucemiantes y hipolipemiantes representan un buen campo de investigación para el desarrollo de fármacos que puedan utilizarse en el control de la DM2. Un aspecto importante en el desarrollo de la DM2 es el desequilibrio energético, lo cual implica un desbalance entre los principales reguladores del metabolismo de lípidos y carbohidratos: PPAR δ y PPAR γ . Se ha mencionado que algunos extractos y compuestos encontrados en las plantas medicinales, como

ácidos grasos, flavonoides y terpenos, pueden ser agonistas de los PPARs. La obtención e identificación de compuestos vegetales con actividad agonista dual de PPAR δ /PPAR γ podría ofrecer el desarrollo de nuevas moléculas de origen vegetal que promuevan la sensibilidad a la insulina y la oxidación de ácidos grasos, conjuntamente un incremento en la captación de glucosa y lípidos, corrigiendo el desbalance energético generado en la DM2, disminuyendo la obesidad y el proceso inflamatorio, resultando en un aumento en la sensibilidad a la insulina para la prevención y/o tratamiento de la DM2.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será la influencia de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum* sobre la expresión de PPAR, y sus genes regulados FATP y GLUT4?

6. HIPÓTESIS

Si los extractos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum* actúan como agonistas duales de PPAR, entonces aumentarán la expresión de PPAR δ y PPAR γ , incrementando producción de FATP, GLUT4.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Determinar que los extractos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum*, actúan como agonistas duales de PPAR en adipocitos 3T3-L1.

7.2 Objetivos particulares

- Corroborar en ratones el efecto antihiper glucémico de los extractos activos reportados en la literatura para *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum*.
- Estandarizar los extractos con base en su contenido de al menos un compuesto polifenólico o un ácido graso, según sea el caso.
- Determinar el efecto de los extractos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum* sobre la expresión del RNAm de PPAR δ y PPAR γ en cultivo de adipocitos.
- Determinar el efecto de los extractos activos sobre la expresión del RNAm de GLUT4 y FATP en cultivo de adipocitos.

8. METODOLOGÍA

8.1 Colecta, identificación y preparación del material vegetal

8.1.1 Colecta

Hibiscus sabdariffa L. fue colectada en diciembre de 2013 en el municipio de Axochiapa en el Estado de Morelos, cuya ubicación se encuentra bajo las siguientes coordenadas: N 18°30.931', W098°45.070' a una altitud de 1,045 msnm.

Tillandsia usneoides L. fue colectada en marzo del 2014 en el municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista en el Estado de Tlaxcala, cuya ubicación se encuentra bajo las siguientes coordenadas: N 19°29.00', O 98°32.023' a una altitud de 3,300 msnm.

Psacalium decompositum se adquirió comercialmente en el Mercado Sonora de la Ciudad de México, el mes de marzo del 2014.

8.1.2 Identificación de plantas

El cotejamiento y registro de las plantas se llevó a cabo por el M. C. Santiago Xolalpa y la M. en C. Abigaíl Aguilar en el Herbario de plantas medicinales del IMSS del Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Ciudad de México (Herbario-IMSS-M). El número de registro de los ejemplares de herbario de *H. sabdariffa* fue 16000097, *T. usneoides* fue 16000094 y *P. decompositum* 16000174.

8.1.3 Preparación del material vegetal

El material vegetal se secó bajo aireación constante hasta asegurarnos que las plantas estuvieran completamente secas.

Para *Hibiscus sabdariffa* se utilizaron los sépalos y cálices.

Para *Psacalium peltatum* se utilizó la raíz y los rizomas.

Para *Tillandsia usneoides* se utilizó toda la planta.

El material seco se trituró en un molino eléctrico (Wiley modelo 4), usando una rejilla de 1 mm de diámetro. El material resultante se utilizó para la preparación de los extractos.

8.2 Obtención de los extractos acuosos

De cada planta por separado se tomaron 100 g del material seco y molido, se adicionó 1000 mL de agua. La mezcla se colocó en un matraz de bola acoplado a un tubo refrigerante de vidrio para evitar la pérdida de agua y se calentaron a 50°C por 1 h (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2007). Posteriormente se filtró con papel filtro mediante un embudo acoplado a un matraz Kitazato y bomba de vacío. Concluido este proceso se evaporó el agua mediante aireación constante en una campana de flujo laminar.

8.3 Obtención de extractos clorofórmicos

De cada planta molida y seca se tomaron 300g; para *H. sabdariffa* y *P. decompositum*, se agregaron 600 mL de cloroformo (Merck®); para *T. usneoides* se

agregaron 1200 mL del mismo disolvente. La mezcla se colocó en un matraz de bola acoplado a un tubo refrigerante para evitar la pérdida de cloroformo y se calentó a 45 °C por 1 h. Posteriormente se filtró con papel filtro utilizando un embudo acoplado a un matraz Kitazato y bomba de vacío. El filtrado se colocó en un evaporador rotatorio (Buchi®) para concentrar el extracto, mediante la evaporación del cloroformo, posteriormente en una campana de flujo laminar con aireación constante durante 2 a 4 días para eliminar las trazas de cloroformo restantes. Los extractos resultantes se usaron en los experimentos posteriores. El rendimiento de los extractos se muestra en la tabla 4.

8.4 Estandarización de los extractos acuosos mediante CC, CCF y HPLC

8.4.1 Condiciones cromatográficas

Únicamente los extractos con efecto sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP fueron sometidos a separación por cromatografía por columna (CC) , monitoreados por cromatografía en capa fina (CCF) para la elucidación de sus compuestos e identificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y resonancia magnética (RM).

8.4.2 Extractos acuosos

Para la identificación de compuestos de los extractos acuosos de *H. sabdariffa* y *P. decompositum* se realizó una extracción con metanol a partir del extracto acuoso, con la finalidad de separar los metabolitos primarios (azúcares, proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas) de los secundarios, esto utilizando como base la polaridad de los compuestos.

Para *H. sabdariffa*, se fraccionaron mediante cromatografía por columna abierta fase reversa utilizando una columna Waters Sep-Pak 35 cc C-18 10 g y sistema de fase móvil en gradiente agua-ácido trifluoroacético 0.5% (TFA)/acetonitrilo (ACN, marca Merck®), comenzando con agua/TFA 100% y diluyendo paulatinamente con ACN (Tabla 1). Para la elucidación de sus componentes fueron monitoreándose mediante

cromatografía en capa fina (CCF) fase reversa (Sílica gel RP-18, marca Millipore®). Se eligieron las fracciones que contenían los compuestos mayoritarios de los extractos (ej. revelado con reactivo NP/PEG en presencia de flavonoides, coloración naranja; reactivo de Komarovsky para detectar terpenos). Una vez elegidas las fracciones, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna Prevail C18 5 µl de 150 mm de largo, ID 4.6 mm, marca GRACE.

Para *P. decompositum* el análisis se llevó a cabo mediante CC fase normal, sílica gel 60, con un tamaño de partícula granulométrica de 0.2-0.5 mm de la marca Merck, con un sistema de elución de diclorometano-metanol. Las fracciones fueron monitoreadas mediante CCF para la elucidación de sus componentes.

Tabla 1. Condiciones de HPLC para los extractos. Inyección de muestra 10 µL.

Tiempo(min)	Flujo (mL)	Agua 95 %/TFA 5%	ACN %
0	1	100	0
2	1	100	0
3	1	90	0
5	1	90	10
6	1	85	15
10	1	85	15
11	1	80	20
12	1	80	20
13	1	70	30
14	1	70	30
15	1	50	50
16	1	0	100
18	1	0	100
19	1	100	0
21	1	100	0

8.5 Condiciones para la separación de los compuestos de los extractos clorofórmicos mediante CC, CCF y HPLC

Los extractos clorofórmicos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. peltatum* fueron sometidos a Cromatografía en columna abierta (CC) para la separación de sus componentes.

El análisis se llevó a cabo CC fase normal, sílica gel 60, con un tamaño de partícula granulométrica de 0.2-0.5 mm de la marca Merck, con un sistema de elución de hexano-acetato de etilo. Las fracciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina (CCF) para la elucidación de sus componentes.

Para el análisis de los componentes de los extractos clorofórmicos mediante HPLC, se realizaron bajo las mismas condiciones que el extracto acuoso.

8.5.1 Fraccionamiento de los extractos clorofórmicos

Se utilizó una columna de separación de 50 cm de largo x 5 cm de diámetro, dependiendo la cantidad de gramos obtenidos se utilizó una proporción de 20 a 1 de sílica gel 60 fase normal. El extracto fue disuelto en misma sílica en proporción 1 a 1. Primero se colocó algodón dentro de la columna en la parte inferior, posteriormente se adicionó la sílica disuelta en hexano, posteriormente se agregó la mezcla de la sílica con el extracto, se tapó con un trozo de algodón y se llenó con hexano, se dejó correr 400 mL de hexano y se comenzó a recuperar fracciones.

8.6 Preparación de reveladores para CCF

- 4-hidroxibenzaldehido

Se pesaron 0.5 g de 4-hidroxibenzaldehido (marca Sigma Aldrich) en un vaso de precipitados previamente en hielo, se agregan 90 mL de etanol, manteniéndose en agitación, agregar 10 mL de ácido sulfúrico al 96% muy lentamente, y dejamos en agitación por 10 minutos.

- Sulfato cérico

Pesar 12 g de sulfato cérico amoniacal 0.1 N (marca Baker), agregar 22 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclar en un vaso de precipitados sentado en hielo.

- Reactivo de Ehrlich

En un vaso de precipitados se adicionan 50 mL de agua, 50 mL de etanol al 95%, 2 g de dietilamina (PDMAB), 30 mL de HCl 99%, mezclar con mucho cuidado.

- Revelador de flavonoides

En un vaso de precipitados se agregan 5 mL de polietilenglicol (PEG) y se disuelven en 35 mL de etanol, se agregaron 200 mL de difenilboriloxietilamina y se mezclaron.

8.6 Tratamiento de ratones cepa CD1 con los extractos

Se utilizaron ratones machos sanos de la cepa CD1, de 4 a 6 semanas de edad, obtenidos del bioterio de la UAM-I. Se formaron 9 grupos de 6 animales cada uno. Antes del estudio fueron dejados en ayuno por 12 horas y se les midió la glucosa

(tiempo 0). A continuación el grupo 1 recibió 4 mL/Kg de solución salina (el cual fungió como control para los extractos acuosos), el grupo 2 recibió 4 mL/Kg de solución Tween al 5% (control para los extractos clorofórmicos); el grupo 3 (control positivo) recibió 20 mg/kg de pioglitazona; los grupos del 4 al 9 recibieron 500 mg/kg de cada uno de los extractos (acuoso y clorofórmico), como se muestra en la Tabla 2. Todos los tratamientos fueron administrados vía intraperitoneal. Después de 20 minutos se administró dextrosa (2 g/Kg) vía intragástrica, después de este tiempo se midió la glucemia a 30, 60, 90 y 120 minutos.

Tabla 2. Grupos y tratamientos para la prueba de tolerancia a la glucosa.

Grupo	Tratamiento
1	Solución salina (4mL/Kg).
2	Solución de Tween al 5% (4mL/Kg).
3	20 mg/Kg Pioglitazona en solución salina (4mL/Kg).
4	500 mg/Kg de extracto acuoso de H. sabdariffa en solución salina (4mL/Kg).
5	500 mg/Kg de extracto clorofórmico de H. sabdariffa en Tween 5% (4mL/Kg).
6	500 mg/Kg de extracto acuoso de T. usneoides en solución salina (4mL/Kg).
7	500 mg/Kg de extracto clorofórmico de T. usneoides en Tween 5% (4mL/Kg).
8	500 mg/Kg de extracto acuoso de P. peltatum en solución salina (4mL/Kg).
9	500 mg/Kg de extracto clorofórmico de P. peltatum en Tween 5% (4mL/Kg).

8.8 Cultivo de la línea celular 3T3-L1

Se cultivaron fibroblastos de la línea 3T3-L1 murina a confluencia a 37° C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de cultivo de 6 pozos con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (8 X 10⁵ 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. El medio fue cambiado cada 2 días, hasta que se llegó a confluencia. Una vez que las células llegaron a confluencia, para inducir la diferenciación de fibroblastos a adipocitos, se trataron como se indica a continuación. En el día 0 se adicionó una mezcla conformada por isobutil metil xantina (100 μ M) de , dexametasona (200 nM), estos 2 compuestos son inhibidores de la proliferación y promotores de la diferenciación induciendo la expresión de genes específicos encargados de la diferenciación, como la proteína de unión y amplificación de la caja CAAT β (C/EBP β) y C/EBP δ (Gregoire *et al.*, 1998) e insulina bovina (80 nM) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al día 3 se adicionó insulina (5 μ g/mL) junto con medio DMEM y se continuó incubando bajo las mismas condiciones por 5 días más. La insulina, mediante la activación de su receptor, regula varias acciones que a través de vías que promueven la glucólisis, la síntesis de glucógeno y adipogénesis, además de activar factores nucleares involucrados en la diferenciación del fibroblasto en adipocito (Gregoire *et al.*, 1998). Durante toda la diferenciación se cambió el medio cada 2 días. Las células fueron usadas para experimentación al día 8 de diferenciación, al cual más del 95% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, presentando una forma circular-oval con depósitos de grasa en forma de pequeñas esferas (Figura 2).

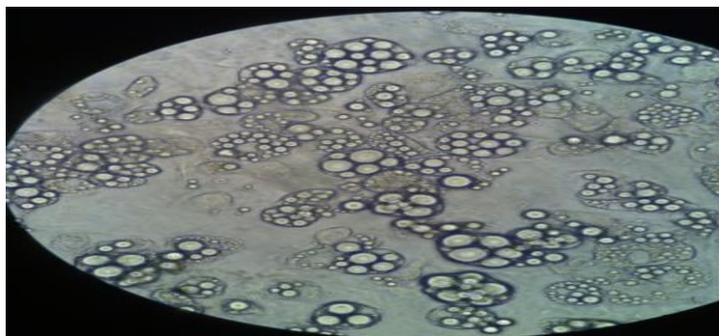


Figura 2. Adipocitos diferenciados a partir de fibroblastos. Día 8 (microscopio óptico, 40X). Se pueden observar las vesículas lipídicas en el interior de las células.

8.9 Prueba de funcionalidad celular

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en placas de 96 pozos en 200 μ L de medio DMEM, a las que se les cambió el medio cada 2 días; una vez que llegaron al 80% de confluencia se utilizaron para la prueba de funcionalidad celular. Los extractos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y *P. decompositum* se utilizaron a concentraciones de 1, 10, 100, 1000 μ g/mL (por triplicado cada dosis), para tener un amplio criterio de funcionalidad celular. Los extractos acuosos se diluyeron en agua MiliQ, para los extractos clorofórmicos se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido) ya que es un buen vehículo para moléculas no miscibles en agua (no polares). Se incluyeron dos controles: uno grupo solo recibió agua MiliQ y otro DMSO. Las células se incubaron durante 24 horas. La funcionalidad celular se determinó mediante la prueba de MTT (bromo de 3(4,5 dimetil-2-triazol-2,5) difenil tetrazoilo), compuesto que es reducido por la enzima mitocondrial integrante de la cadena transportadora de electrones (complejo II) (succinato deshidrogenasa) en formazán (figura 3), el cual colorea las

células de violeta. Siendo las células metabólicamente activas las que reducen el MTT en formazán (Figura 3).

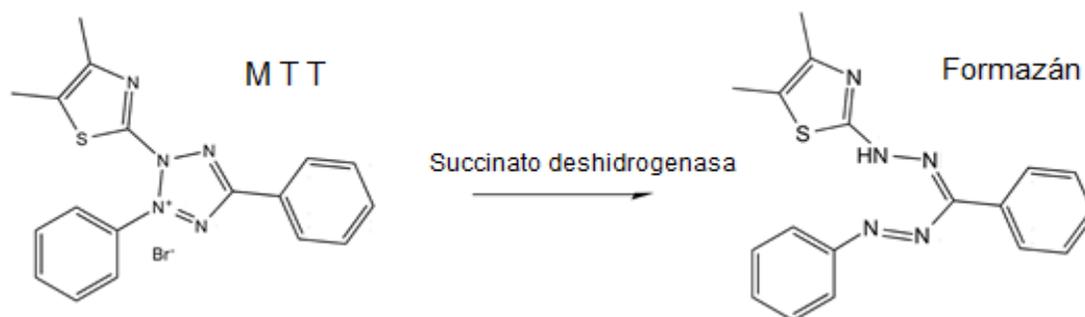


Figura 3. Reducción del MTT en formazán por la enzima mitocondrial del complejo 2, succinato deshidrogenasa.

Se prepararon 20 ml de MTT a una concentración de 0.1 mg/mL en PBS (Buffer Salino de Fosfatos); una vez retirado el tratamiento con los extractos, se les agregó 200 μ l de la preparación de MTT a cada pozo, dejando en incubación por 3 horas y cubriendo la placa con papel aluminio. Transcurrido el tiempo se les retiró la preparación de MTT y se agregaron 200 μ l de isopropanol acidificado para solubilizar el formazán con 3.2 μ L/mL de HCl (0.04 M) y se mantuvo en agitación ligera por 20 minutos. Se utilizó un lector de placas de Elisa (Thermo Scientific modelo Multiskan FC) para medir la absorbancia del compuesto colorido a 590 nm.

8.10 Tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con los extractos de las plantas

Una vez evaluados los extractos mediante la prueba de MTT, se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 y diferenciados en adipocitos de la forma ya mencionada en placas de 6 pozos. Los adipocitos se cultivaron en 1.5 mL de medio DMEM por cada pozo (n=6); como controles positivos se utilizarán pioglitazona (25 mM), fenofibrato (10mM) y L-165041 (10 μ M) en 1.5 ml de DMEM para cada uno de los pozos. Para cada uno de los extractos (n=6), acuosos y clorofórmicos, se adicionó 10 mg/ml de extracto de *H. sabdariffa* con una concentración de sambubiósido de delfinidina de 2.2 μ g/mL en 1.5 mL de DMEM por pozo, se incubaron por 24 h, transcurrido el tratamiento, se utilizaron para estudios posteriores.

8.11 Aislamiento y cuantificación del RNAm

Una vez pasado el tratamiento con los extractos se aisló el RNA total mediante el método de TRIZOL de la siguiente manera:

Homogenización. Se eliminó el medio de los pozos, se agregó 500 μ L de TRIZOL, el cual es basado en el uso de una solución monofásica constituida por fenol, isotiosinato de guanidina, que son facilitadores de la ruptura de la membrana plasmática y degradación de proteínas.

Separación. Una vez homogenizadas las células con TRIZOL, se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregó 200 μ L de cloroformo por cada mL de TRIZOL

por cada tubo, se agitó vigorosamente 20 segundos y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Y se realizó una centrifugación a 12000 g por 15 min a 4°C, lo que permitió la formación de 3 fases, una superior de color claro, que contenía el RNA, otra interface y una fase inferior roja en la que se encontraba el ADN y proteínas, se aisló la fase superior acuosa.

Precipitación. Se precipitó el RNAm con 500 µL de isopropanol por cada mL de TRIZOL, se agitó suavemente por inversión. Se incubó en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet.

Lavado de RNAm. Se agregó 1 mL de etanol al 70% por cada mL de TRIZOL utilizado. Se resuspendió el pellet con agitación (vortex) y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C.

Redisolución de RNA. Se eliminó el etanol y se dejó evaporar los residuos de etanol. Se agregó 30 µL de agua libre de RNAsas y se guardó a -70°C. Una vez aislado el ARN se cuantificó con el uso de un NanoDrop 2000 marca Thermo Scientific.

8.12 Expresión del RNAm por RT-PCR tiempo real

La reacción de transcripción en reversa (RT) se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa (Estuche ImProm II de Promega) a partir de una concentración de 2 µg de RNA (templado); se utilizaron primers al azar (random primers 0.5 µg/µL) para obtener una cantidad abundante de cDNA total. Un volumen

total de 20 μ L de la mezcla de reacción, constituida por primers 0.5mM de cada uno de los genes mostrados en la tabla 3, y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM en un volumen final de 10 μ L. se incubó bajo el siguiente programa de 45 ciclos: desnaturalización 95°C por 10 segundos; alineamiento 60°C por 7 segundos; elongación 72°C por 10 segundos para cada ciclo.

Para el análisis de expresión se utilizaron primers diseñados a partir de secuencias de genes de *Mus musculus* que se describen en la Tabla 4, utilizando como gen constitutivo al 36B4.

Una vez obtenido los productos de PCR tiempo real se realizará una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para la comprobación de los productos de PCR.

Tabla 3. Características de genes y primers utilizados para el análisis de expresión en células 3T3L1.

Genes 3TL-1	Primer directo	Primer reverso	Tamaño del producto (pb)
36B4 Gene Bank NM_007475.2	5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-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'-GATTCTGCTGCCCTTCTGTC-3'	5'-ATTGGACGCTCTCTCCTCAA-3'	168
FATP-1 Gene Bank NM_011977.3	5'-ACCAGTGTCAGGGGTACAG-3'	5'-TGTCTCCCAGCTGACATGAG-3'	174
Adipo Q Gene Bank NM_009605.4	5'-GGCTCTGTGCTCCTCCATCT-3'	5'-AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG3'	101

8.13 Análisis estadístico

Los resultados se analizarán mediante una prueba ANOVA complementada con una prueba de Tukey-Kramer 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).

9 RESULTADOS

Una vez realizada la extracción de cada una de las plantas se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de las plantas de estudio

Planta	Extracción	Rendimiento (%)
H. sabdariffa	Acuosa	23.4
	Clorofórmica	0.9
T. usneoides	Acuosa	9.1
	Clorofórmica	1.4
P. decompositum	Acuosa	7.6
	clorofórmica	4.4

9.1 Análisis y estandarización de los extractos acuosos

9.1.1 Extracto acuoso de *H. sabdariffa*

Se identificó y aisló un compuesto del extracto de *H. sabdariffa*; delfinidina 3-sambubiósido (D3SB) (Gráfico 1) mediante HPLC bajo condiciones de la tabla 1 con un tiempo de retención (TR) de 13.833 minutos, detectado a $\lambda=527$ nm.

Se utilizó el estándar conocido delfinidina 3-sambubiósido (D3SB) para realizar una curva de calibración para conocer la concentración de este compuesto en el extracto acuoso (Gráfico 2 y Tabla 5).

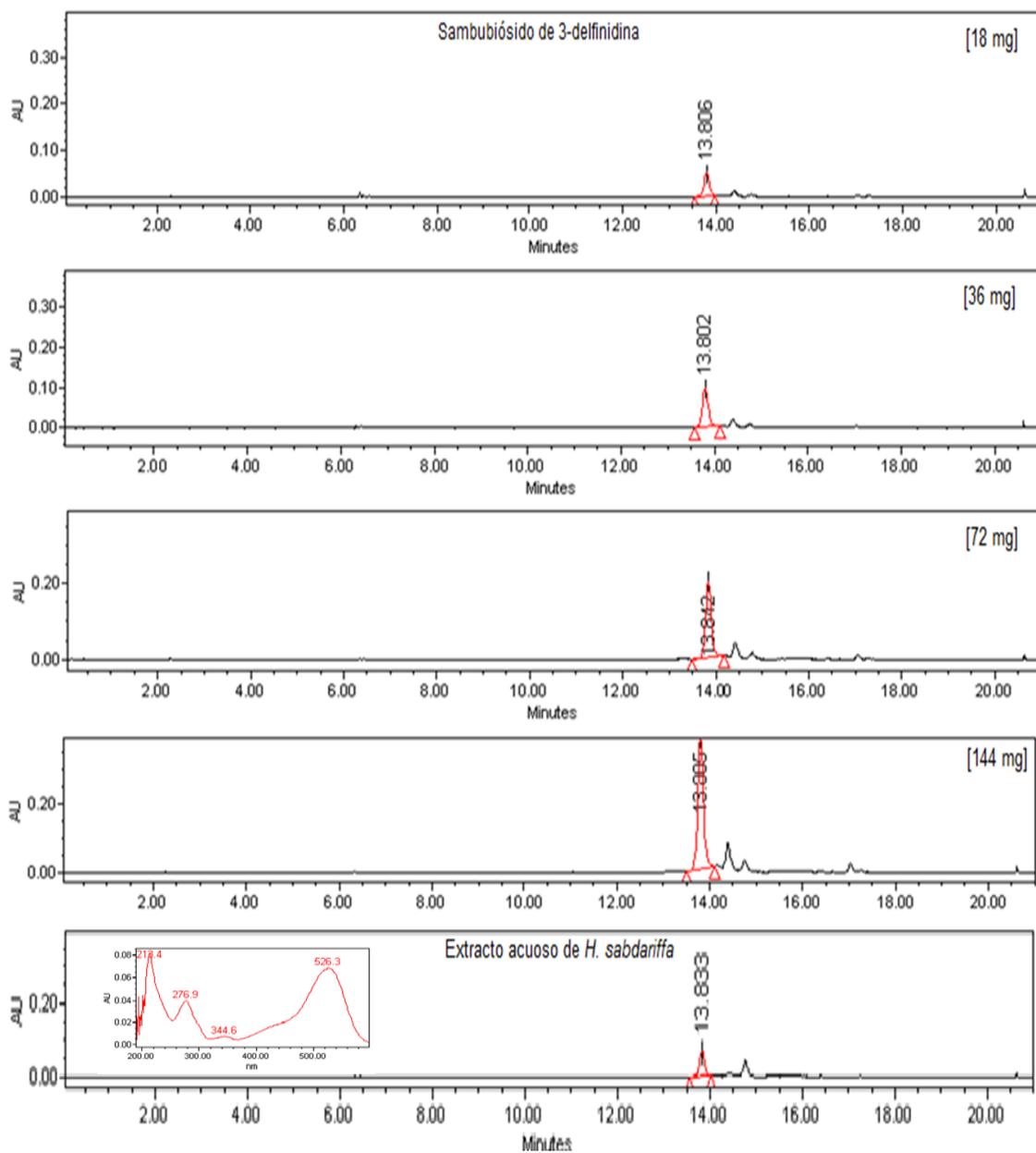


Gráfico 1. Espectros cromatográficos de D3SB a varias concentraciones 18, 36, 72 y 144 mg. Delfinidina 3-sambubiósido con un TR de 13.833 minutos detectado a $\lambda=527$ nm.

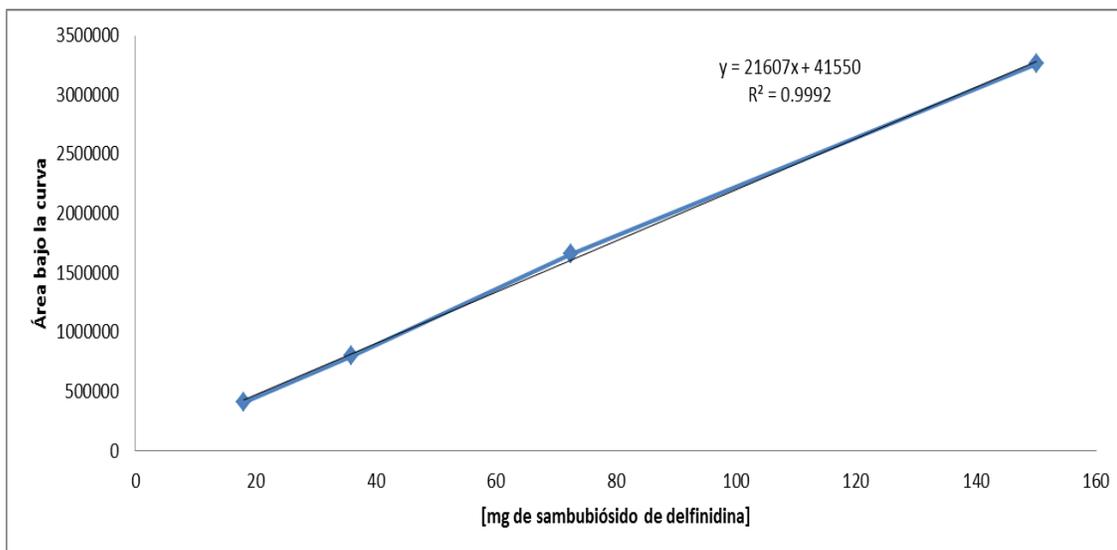


Gráfico 2. Curva de calibración para estandarización de extracto acuoso de *H. sabdariffa* utilizando D3SB como estándar en el programa Microsoft Excel 2010.

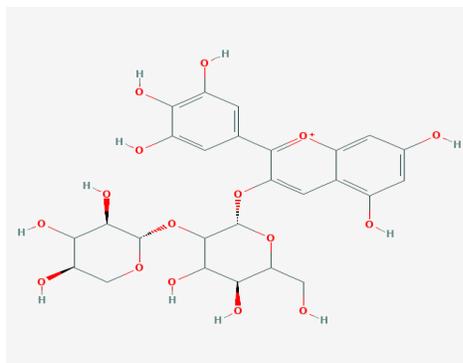


Figura 4. Estructura química de la delphinidina 3-sambubiósido. Imagen tomada Pubchem.

Tabla 5. Datos obtenidos del análisis de HPLC para el D3SB. T.R.=tiempo de retención; Area1-3= áreas bajo la curva de D3SB a diferentes concentraciones, analizado a 527 nm.

[mg SD] estandar	T.R.	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
18	13.8	4143364	408650	414363	412459.3
36	13.8	805147	805147	802088	804127
72.5	13.842	1668020	1654554	1661132	1661235.2
150	13.805	3266502	3281334	3240426	3262754
[mg de extracto]					
700	13.871	530993	534731	530993	532239

Mediante la fórmula de la gráfica de la recta $y=mx+b$ se calculó la concentración de D3SB en el extracto de *H. sabdariffa* acuoso siendo 22.7097237 mg de D3SB/ g de extracto acuoso de *H. sabdariffa*.

9.1.2 Extracto acuoso de *P. decompositum*

Se eligieron 3 fracciones (fracciones 18, 19, 20), de acuerdo a la identificación de compuestos mayoritarios partir del análisis de CCF y HPLC (Figura 5 y gráfico 3). Se revelaron con 4-hidroxibenzaldehído y observados con luz UV λ -260nm y analizados en HPLC (Gráfico 3) bajo condiciones de la tabla 1. Condiciones de CCF fase reversa sistema agua 70 %/ ACN 30 %.

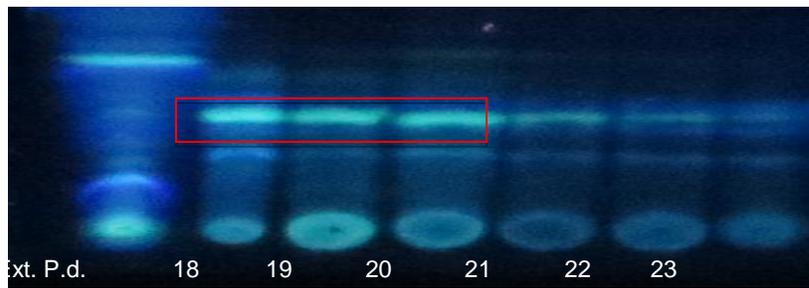


Figura 5. CCF a partir de extracto acuoso de *P. decompositum*. Ext. P.d.= extracto acuoso de *P. decompositum*; Fracciones 18-23. Marcado en rojo compuestos mayoritarios, posibles cardenólidos.

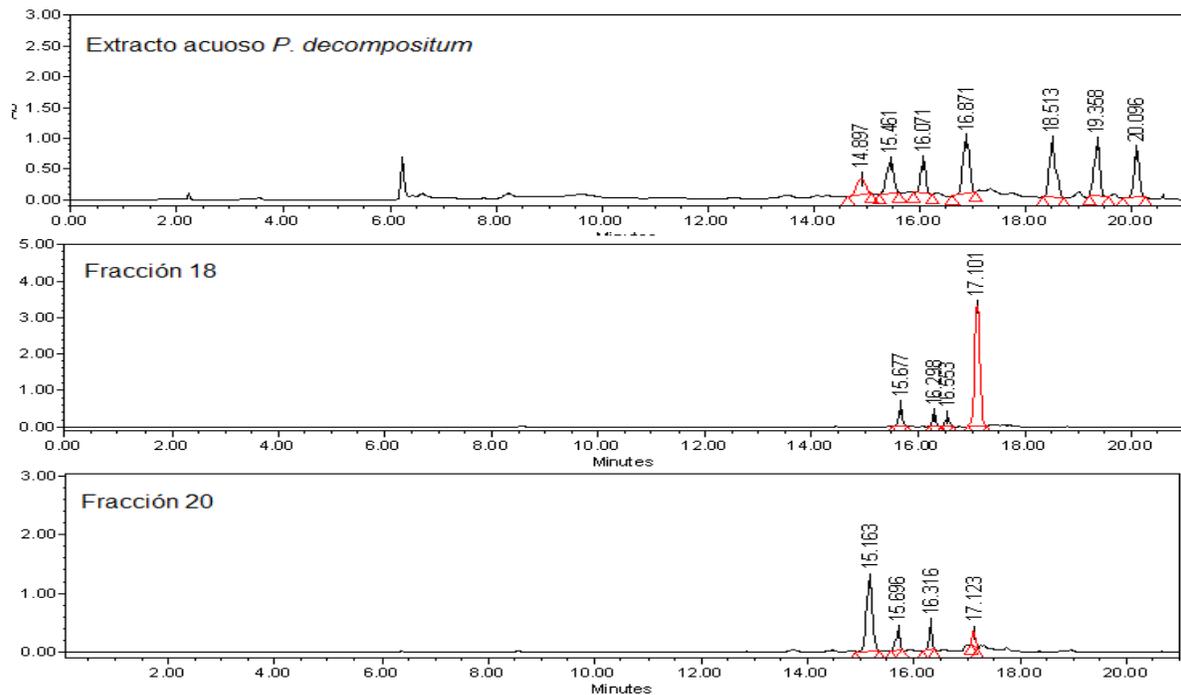


Gráfico 3. Espectros de absorción del extracto acuoso de *P. decompositum* detectado a λ -520 nm. Arriba: espectro de absorción del extracto completo; en medio: espectro de absorción de la fracción 18, pico con TR 17.01 ácido ferúlico; abajo, fracción 20 posibles cardenólidos.

9.2 Análisis y estandarización de los extractos clorofórmicos

9.2.1 Extracto clorofórmico de *T. usneoides*

Mediante CCF se lograron identificar 3 fracciones ricas en terpenos (fracciones 9,10, 11) (Figura 6).

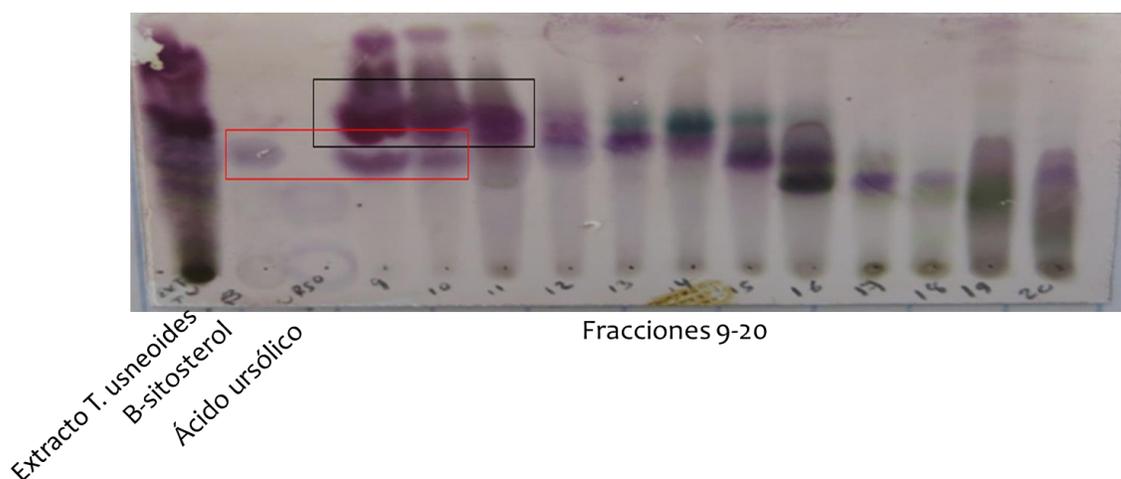


Figura 6. CCF del extracto clorofórmico de *T. usneoides* desarrollada en fase normal en un sistema hexano 70%/AcoEt 30%, revelada con 4-hidroxibenzaldehido. Se identificó el compuesto β -sitosterol en las fracciones 9 y 10 (enmarcado en rojo), recuadro en negro se detectaron 3 fracciones ricas en terpenos.

9.2.2 Extracto clorofórmico de *P. decompositum*

Mediante la separación por CC y el monitoreo por CCF se seleccionaron 3 fracciones que tenían un solo compuesto (columna 1, fracciones 7-10), el cual cristalizó y fue analizado e identificado mediante HPLC y RMN, el compuesto se trataba de acetato de maturina (AM) (Figura 7), posteriormente fue corroborado mediante espectrometría de masas (EM). Se utilizó el estándar AM, para realizar una curva de

calibración (115, 460 y 920 mg) para cuantificar la concentración del compuesto presente en el extracto clorofórmico de *P. decompositum* (Gráfico 4). Mediante la fórmula de la gráfica de la recta $y=mx+b$ se calculó la concentración de AM (Tabla 6, gráfico 5).

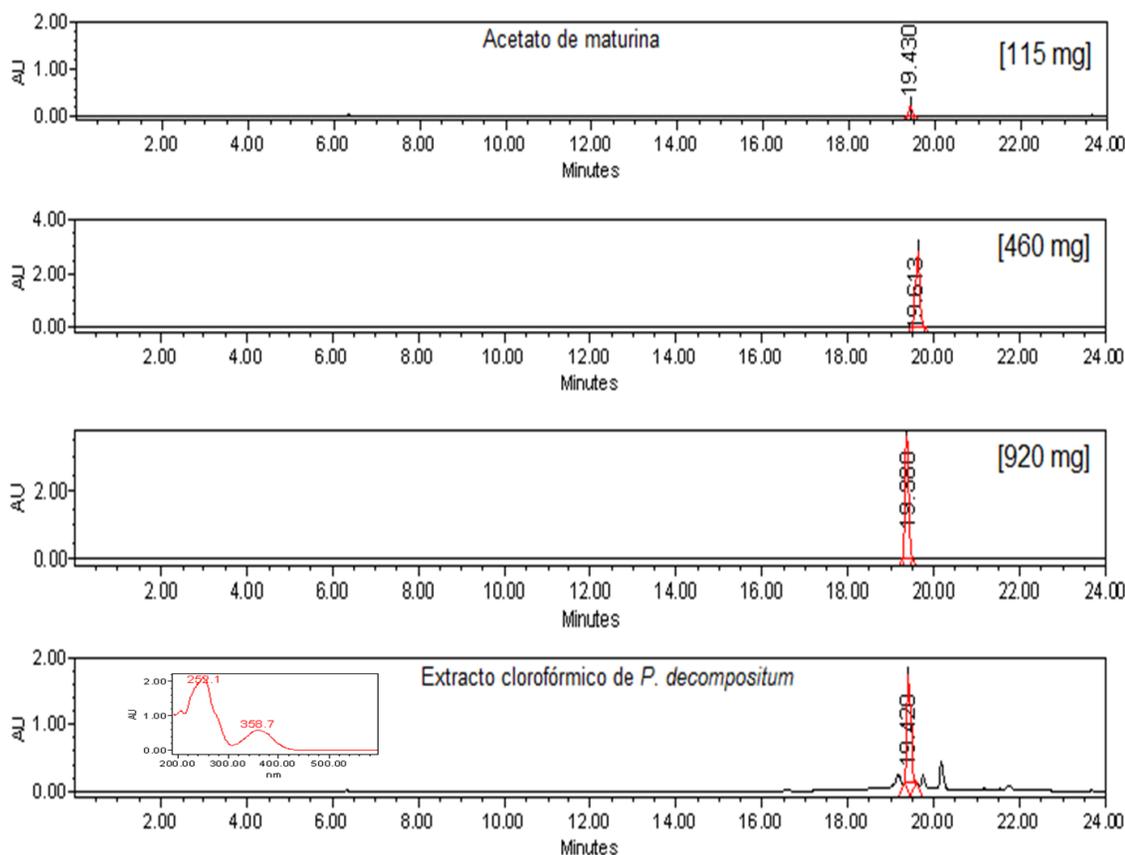


Gráfico 4. Espectro cromatográfico del AM. T.R. de 19.420 minutos, detectado a λ -277 nm a diferentes concentraciones. 3 primeros gráficos AM a diferentes concentraciones (115, 460, 920 mg respectivamente) Abajo, espectro cromatográfico del extracto clorofórmico de *P. decompositum*.

Tabla 6. Datos obtenidos del análisis de HPLC del AM. T.R.=tiempo de retención; Area1-3= áreas bajo la curva de acetato de maturina a diferentes concentraciones.

[mg de AM] estandar	T.R.	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
115	19.431	2501043	2501787	2501787	2501539
230	19.395	5009015	5009015	5009015	5009015
460	19.613	10065185	10017404	10017409	10033332.7
920	19.379	15043537	15043537	15043537	15043537
Extracto					
10	19.464	9929066	9814457	9616892	9786805

Mediante la fórmula de la gráfica de la recta $y=mx+b$ se calculó la concentración de AM en el extracto clorofórmico de *P. decompositum* siendo 50.68 mg de AM por cada g de extracto.

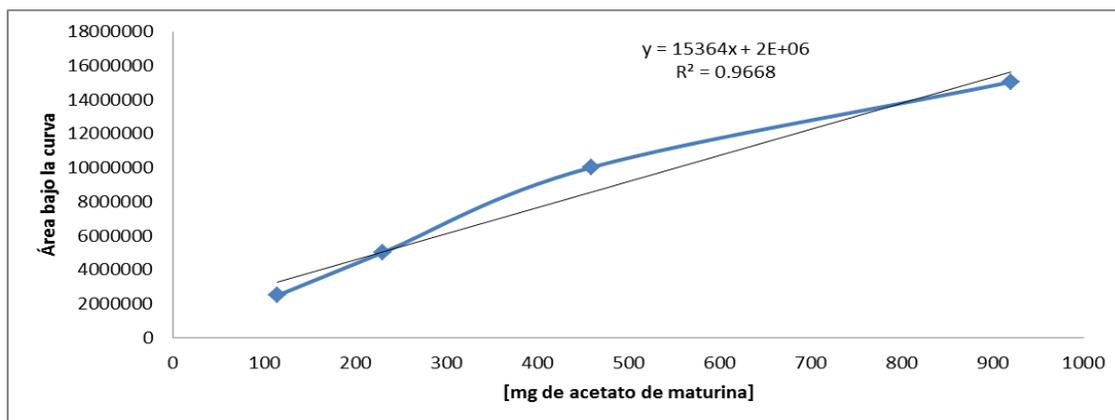


Gráfico 5. Curva de calibración para estandarización de extracto clorofórmico de *P. decompositum* utilizando AM como estándar en el programa Microsoft Excel 2010.

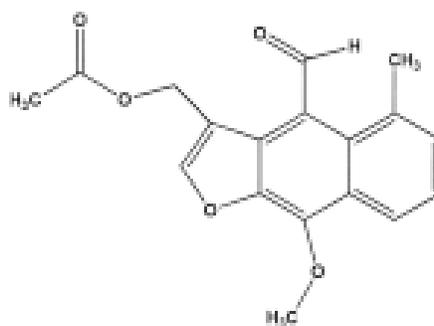


Figura 7. Estructura química del AM.

9.2.3 Extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*

Mediante la separación por CC y el monitoreo por CCF se identificó el compuesto 5-hidroximetil furfural ((5-HMF, figura 8) el cual fue analizado y detectado mediante HPLC (Figura 11), RMN, posteriormente fue corroborado mediante EM. La tabla 7 muestra los valores de las áreas bajo la curva obtenidas en el análisis mediante HPLC a diferentes concentraciones del 5-HMF (Gráfico 6), y se realizó una curva de calibración de la cual se obtuvo la concentración de éste en el extracto (Gráfico 7).

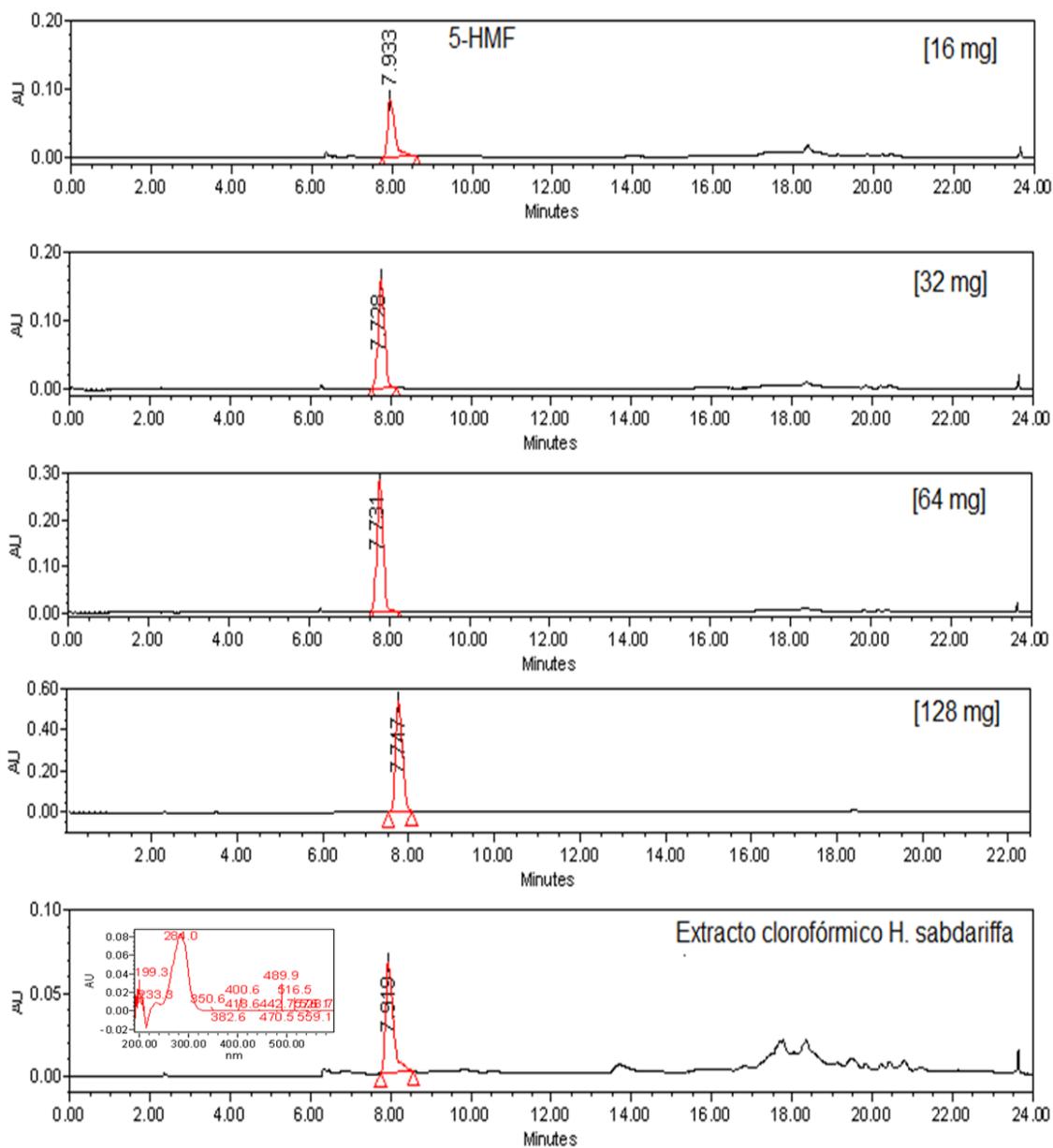


Gráfico 6. Espectro cromatográfico del 5-HMF detectado a $\lambda=285$ nm del a diferentes concentraciones (16, 32, 64, 128 mg), abajo se muestra el espectro cromatográfico del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* con un T.R. de 7.919 minutos.

Tabla 7. Datos obtenidos del análisis de HPLC del 5-HMF. T.R.=tiempo de retención; Area1-3= áreas bajo la curva a diferentes concentraciones, analizado a λ -285 nm.

[mg de HMF] estandar	T.R.	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio
16	7.933	849419	84411	861408	598412.666
32	7.728	1632413	1641139	1632413	1635321.667
64	7.731	3008973	3001977	3001977	3004309
128	7.747	6175672	6175672	6175672	6175672
Extracto					
2	7.919	916121	916121	917419	916553.666

Mediante la fórmula de la gráfica de la recta $y=mx+b$ (Grafico 7) se calculó la concentración de 5-HMF en el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* siendo 9.93 mg por cada g de extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*.

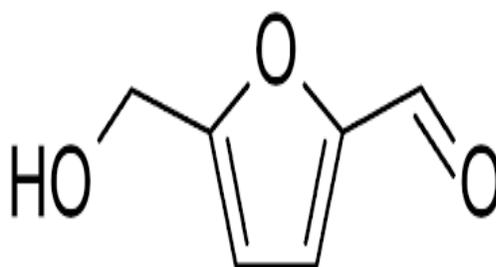


Figura 8. Estructura química del 5-HMF.

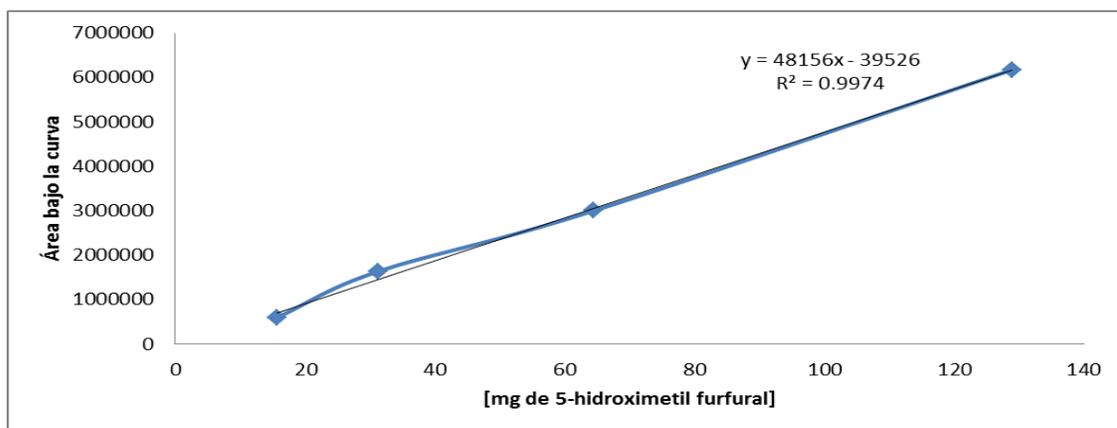


Gráfico 7. Curva de calibración para estandarización de extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* utilizando 5-HMF como estándar en el programa Microsoft Excel 2010.

Mediante HPLC se identificaron 6 grupos de compuestos principales del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*, el extracto se estandarizó con el compuesto 5-HMF mostrados en el gráfico 7.

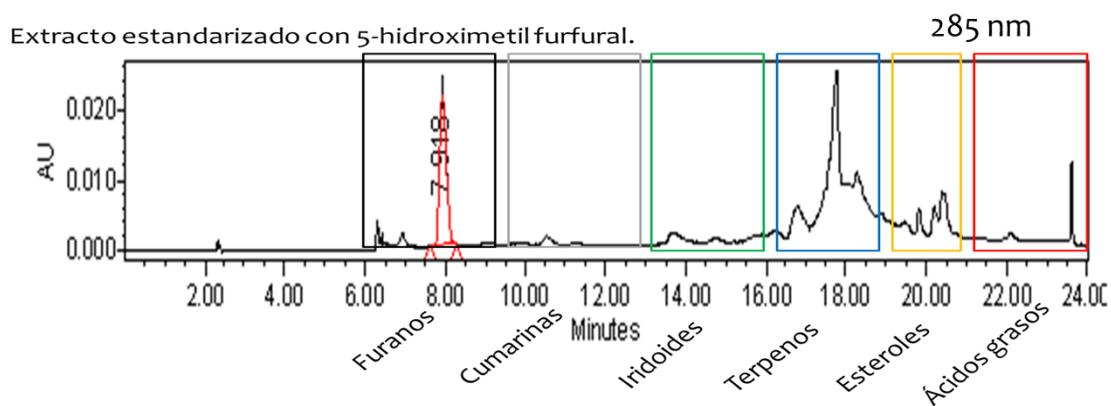


Gráfico 8. Espectro cromatográfico del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*. Analizado en HPLC a $\lambda=285$ nm. Se muestran 6 grupos de compuestos principales;

de más polar a menos polar, de izquierda a derecha: furanos, cumarinas, iridoides, terpenos, esteroides y ácidos grasos. El pico en rojo muestra al compuesto con el que se estandarizó el extracto; 5-HMF, con un T.R. de 7.918 minutos.

El siguiente gráfico muestra el efecto de los extractos acuosos sobre la glucemia, en donde se muestra que los extractos acuosos de *H. sabdariffa* y *P. decompositum* disminuyen el pico hiperglucémico después de 30 minutos de la administración, sin embargo el extracto acuoso de *T. usneoides* aumentó la glucemia.

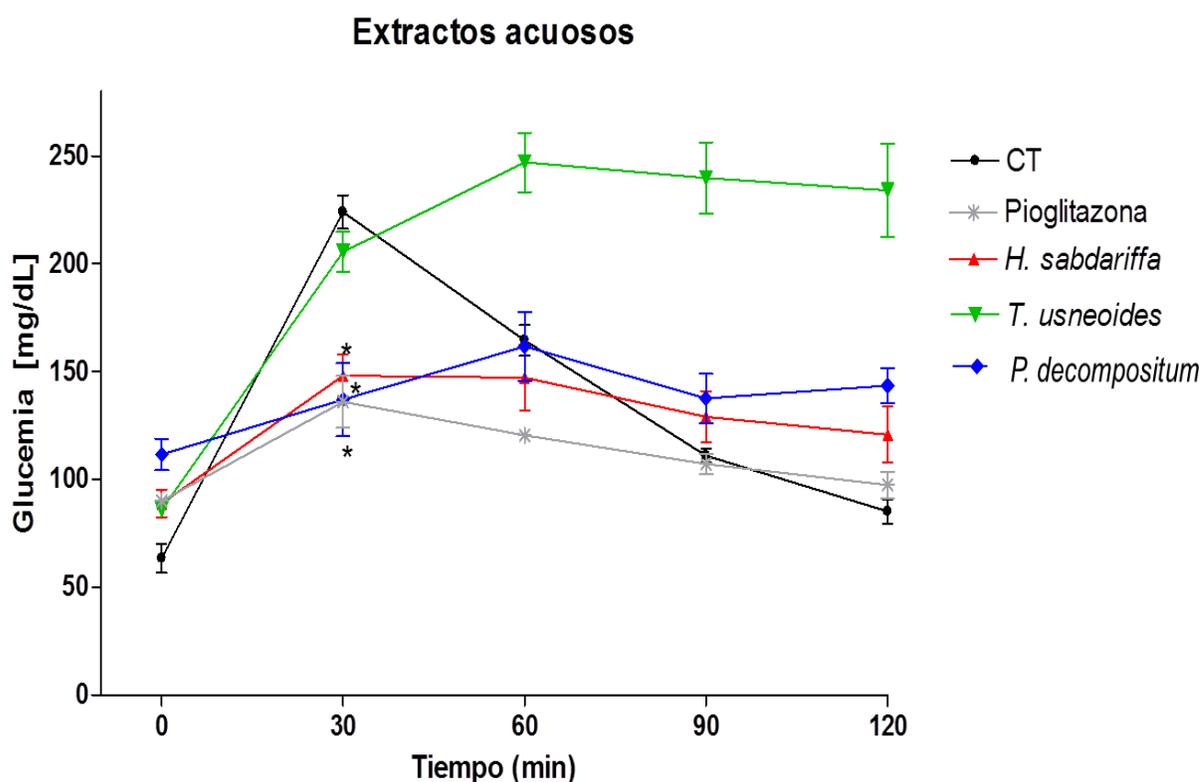


Gráfico 9. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral en ratones CD1 normales con ayuno de 12 h, administración intraperitoneal de los extractos acuosos. Media \pm E.E.M. n=6. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

El siguiente gráfico muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la glucemia, en donde se muestra que los extractos clorofórmicos de las 3 plantas, reducen significativamente la glucemia a los 30 minutos después de la administración, sin embargo no se comportaron como el control positivo (Pioglitazona).

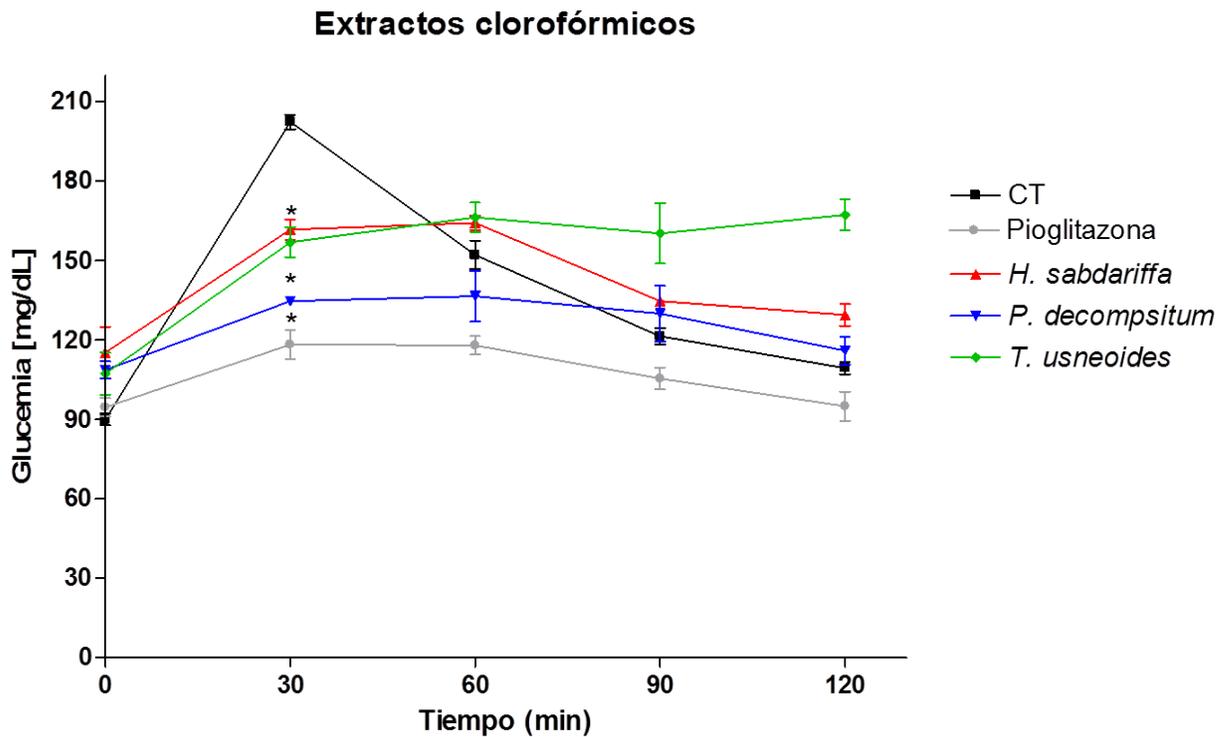


Gráfico 10. Prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones CD1 normales con ayuno de 12 h, administraron intraperitoneal de los extractos clorofórmicos. Media \pm E.E.M. n=6. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

9.3 Prueba de funcionalidad celular

Como criterio para seleccionar la concentración apropiada para continuar con los experimentos posteriores, se consideró a aquella cuya funcionalidad resultara >80%.

La concentración seleccionada fue la de 10 µg/ml (Gráficos 11-16).

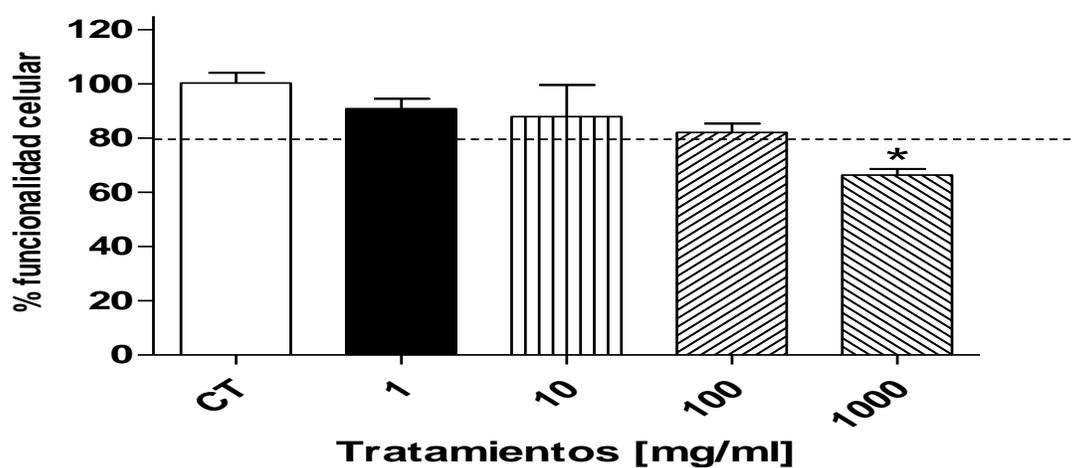


Gráfico 11. Efecto del extracto acuoso de *H. sabdariffa* sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

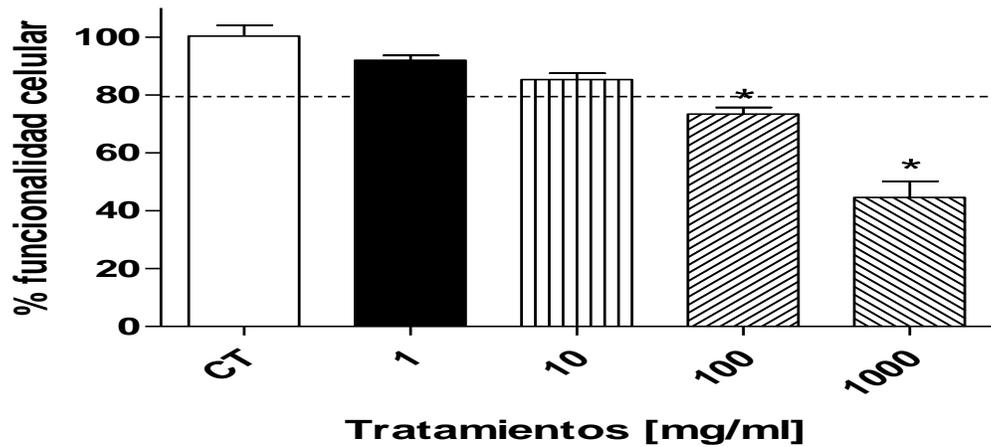


Gráfico 12. Efecto del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

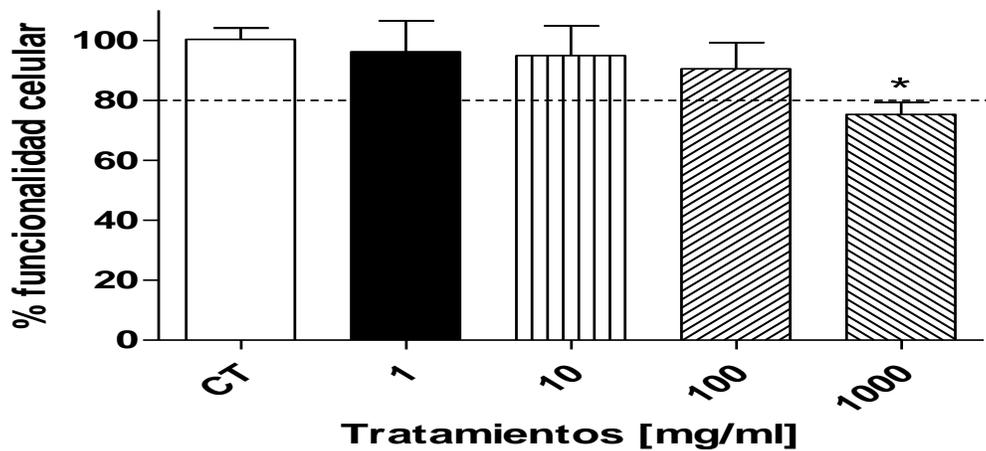


Gráfico 13. Efecto del extracto acuoso de *T. usneoides* sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

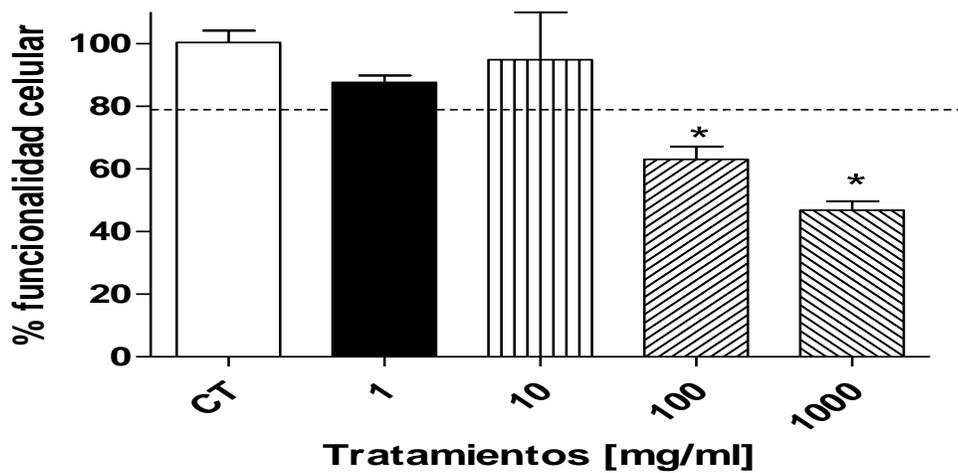


Gráfico 14. Efecto del extracto clorofórmico de *T. usneoides* sobre la funcionalidad celular de fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

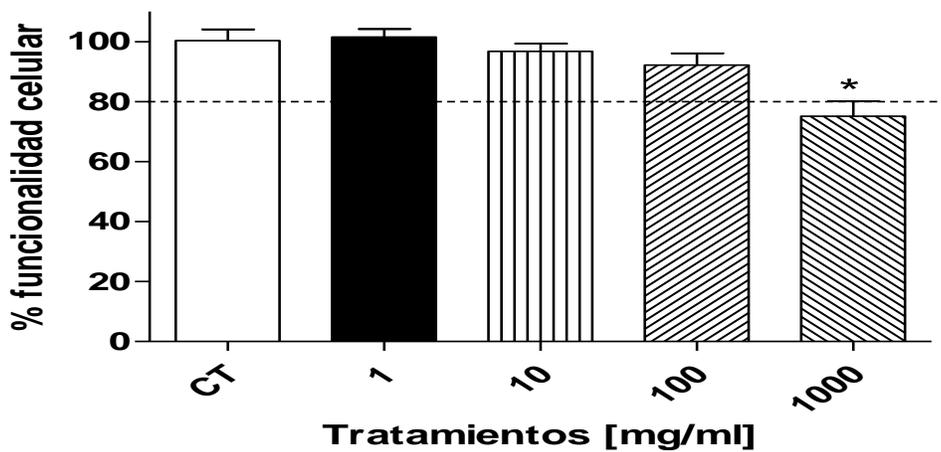


Gráfico 15. Efecto del extracto acuoso de *P. decompositum* sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

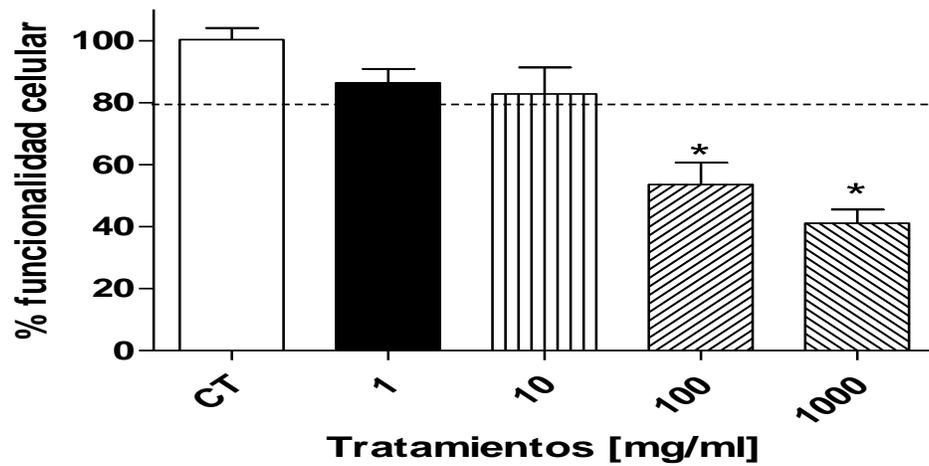


Gráfico 16. Efecto del extracto clorofórmico de *P. decompositum* sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

9.4 Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de PPAR δ , PPAR γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP.

Los resultados a continuación se obtuvieron a partir de los datos obtenidos de la cuantificación de los RNAm en PCR-RT tal como se indicó en la metodología.

El efecto de los extractos acuosos no tuvo efecto sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ , sin embargo, como era de esperarse, el agonista L-1654 aumento en más de 5 veces la expresión de PPAR δ (Gráfico 17) y la pioglitazona en más de 2 veces la expresión de PPAR γ (Gráfico 18).

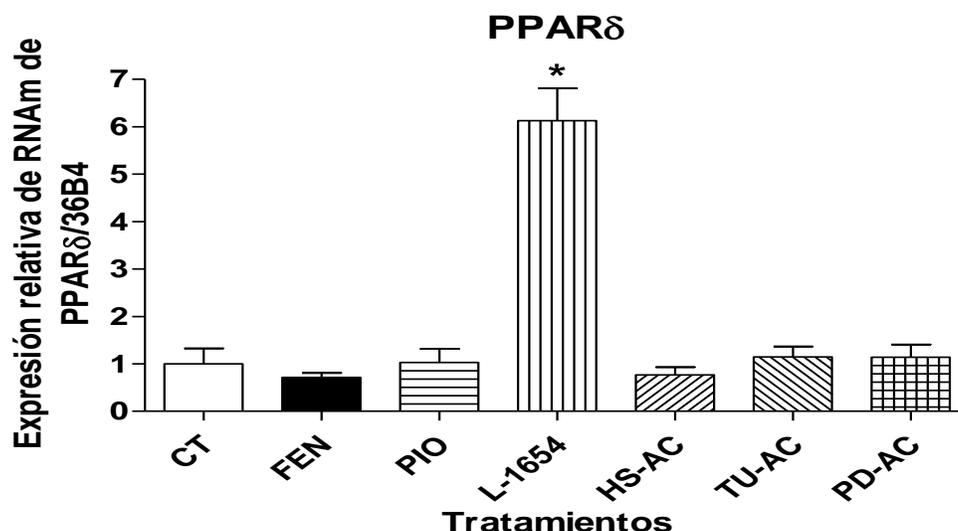


Gráfico 17. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de PPAR δ . CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-AC: extracto acuoso de *H. sabdariffa*; TU-AC: extracto acuoso de *T. usneoides*; PD-AC: extracto acuoso de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

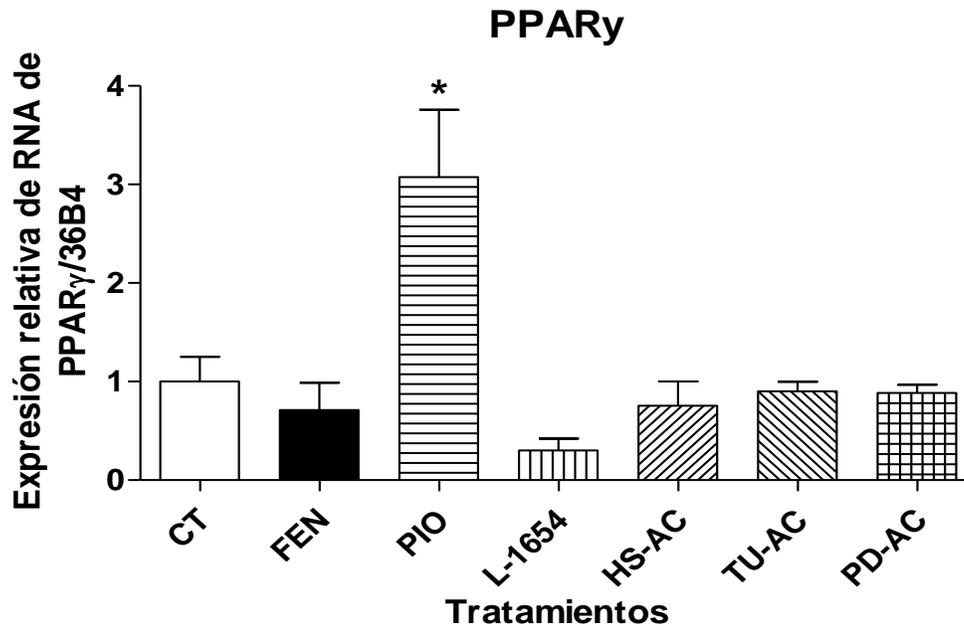


Gráfico 18. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de RNAm de PPAR γ . CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-AC: extracto acuoso de *H. sabdariffa*; TU-AC: extracto acuoso de *T. usneoides*; PD-AC: extracto acuoso de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

El gráfico 19 muestra el efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de GLUT4; ningún extracto tuvo efecto positivo sobre la expresión de este transportador de glucosa, únicamente y como era de esperarse la pioglitazona tuvo un efecto significativo con respecto al CT.

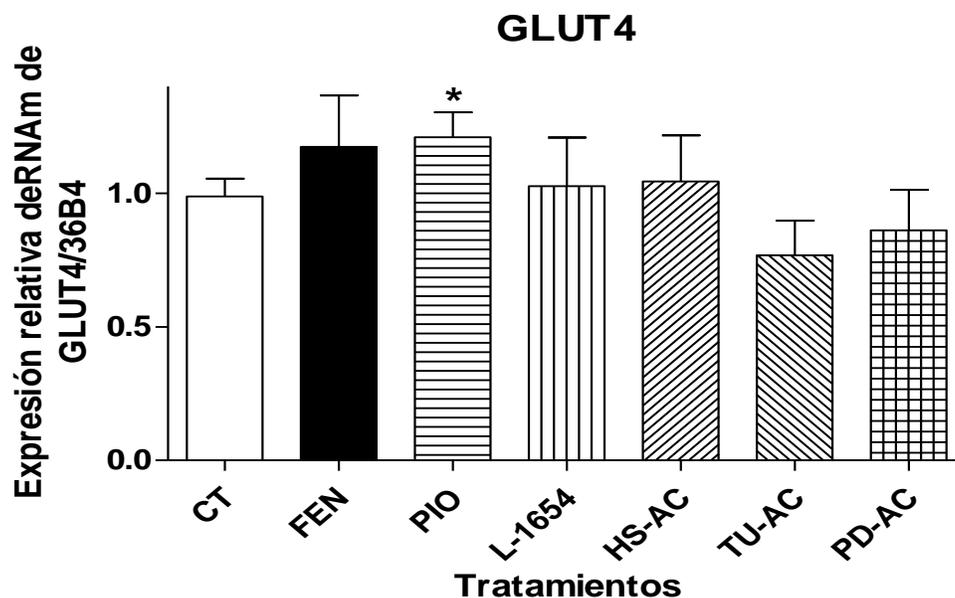


Gráfico 19. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de RNAm de GLUT4. CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-AC: extracto acuoso de *H. sabdariffa*; TU-AC: extracto acuoso de *T. usneoides*; PD-AC: extracto acuoso de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

El gráfico 20 muestra el efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de FATP. Dentro de los controles positivos, la pioglitazona y el L-1654 tuvieron un efecto en el aumento de la expresión de FATP y solamente el extracto acuoso de *H. sabdariffa* tuvo un efecto positivo sobre la expresión de este transportador.

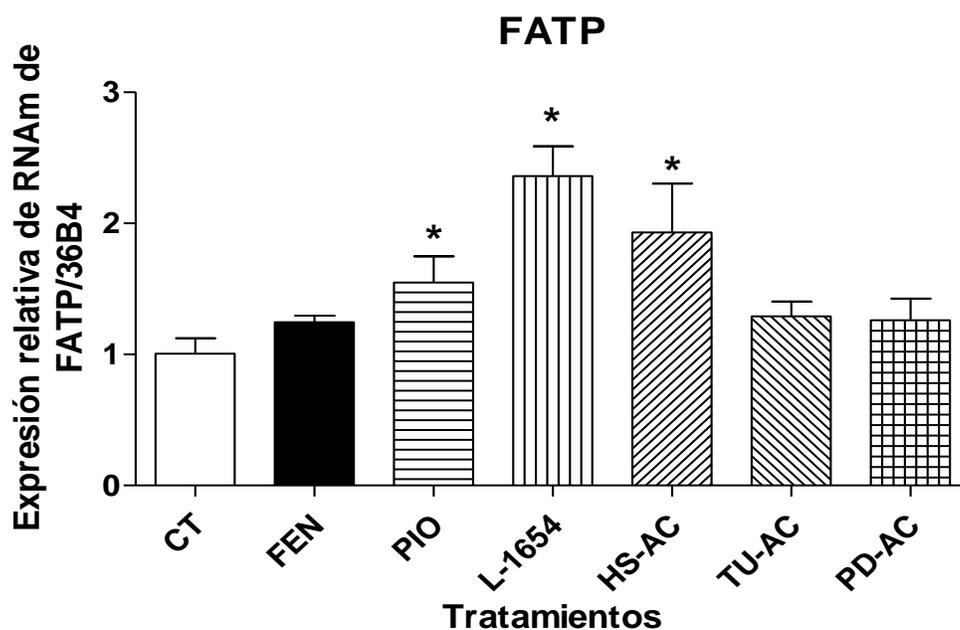


Gráfico 20. Efecto de los extractos acuosos sobre la expresión de RNAm de FATP. CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-AC: extracto acuoso de *H. sabdariffa*; TU-AC: extracto acuoso de *T. usneoides*; PD-AC: extracto acuoso de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

9.5 Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR δ , PPAR γ y sus genes regulados GLUT4 y FATP.

El gráfico siguiente muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR δ ; se puede observar que el agonista L-1654 tuvo un efecto, aumentando la expresión de este PPAR en más de 5 veces, de manera similar, el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* aumentó en más del doble la expresión de este PPAR.

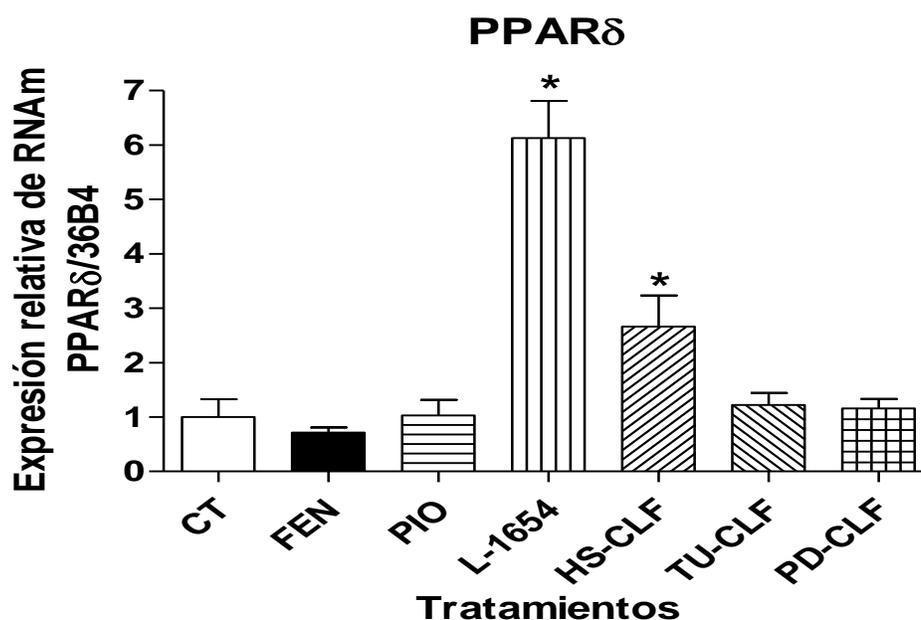


Gráfico 21. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión del RNAm de PPAR δ . CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-CLF: extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*; TU-CLF: extracto clorofórmico de *T. usneoides*; PD-CLF: extracto clorofórmico de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5.

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

A continuación se muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de PPAR γ , siendo los extractos de *H. sabdariffa* y *P. decompositum* los que tuvieron efecto sobre la expresión de este PPAR, siendo importante destacar que el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* posee efecto dual sobre la expresión de RNAm de PPAR δ/γ , con respecto al agonista sintético de PPAR δ L-1654 disminuyó la expresión de este PPAR con respecto al CT (Gráfico 22).

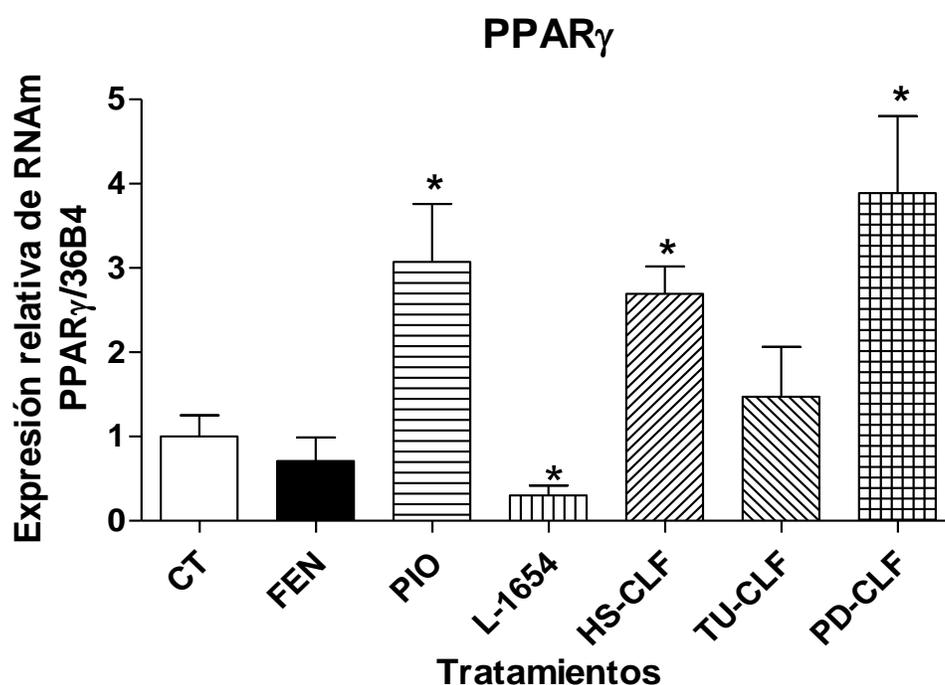


Gráfico 22. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión del RNAm de PPAR γ . CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-CLF: extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*; TU-CLF: extracto clorofórmico de *T. usneoides*; PD-CLF: extracto clorofórmico de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

En el gráfico 23 se muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de GLUT4, en donde se muestra que los extractos clorofórmicos de *H. sabdariffa* y *P. decompositum* poseen efecto positivo sobre la expresión de éste transportador de glucosa.

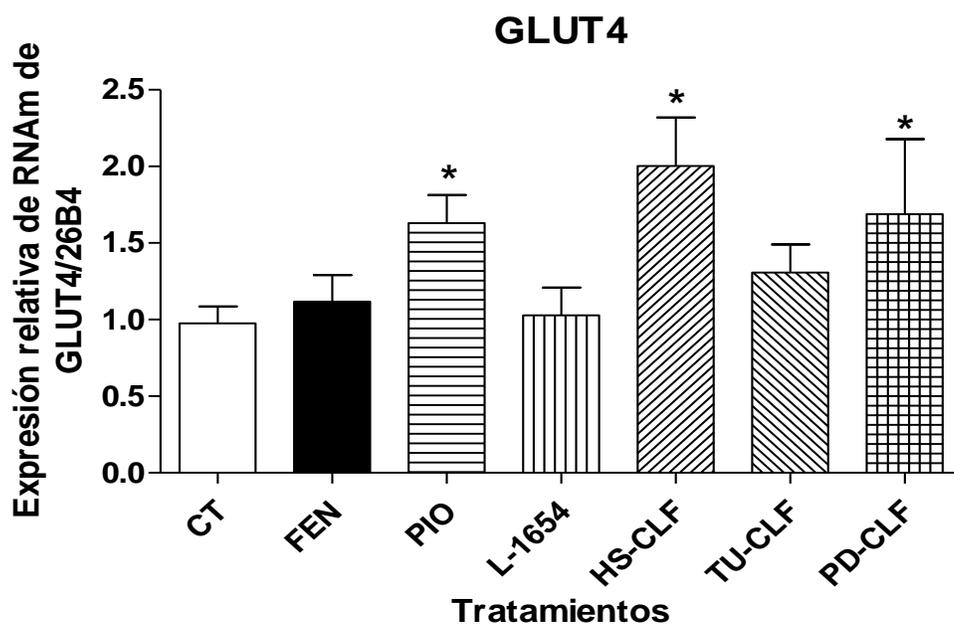


Gráfico 23. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión del RNAm de GLUT4. CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-1654: agonista de PPAR δ ; HS-CLF: extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*; TU-CLF: extracto clorofórmico de *T. usneoides*; PD-CLF: extracto clorofórmico de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5.
*Diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

A continuación se muestra el efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión de FATP, en donde los controles positivos fenofibrato, Pioglitazona y L-1654 tienen un efecto significativo con respecto al control, siendo el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* el que tuvo mayor efecto sobre la expresión de este transportador de AG (Gráfico 19).

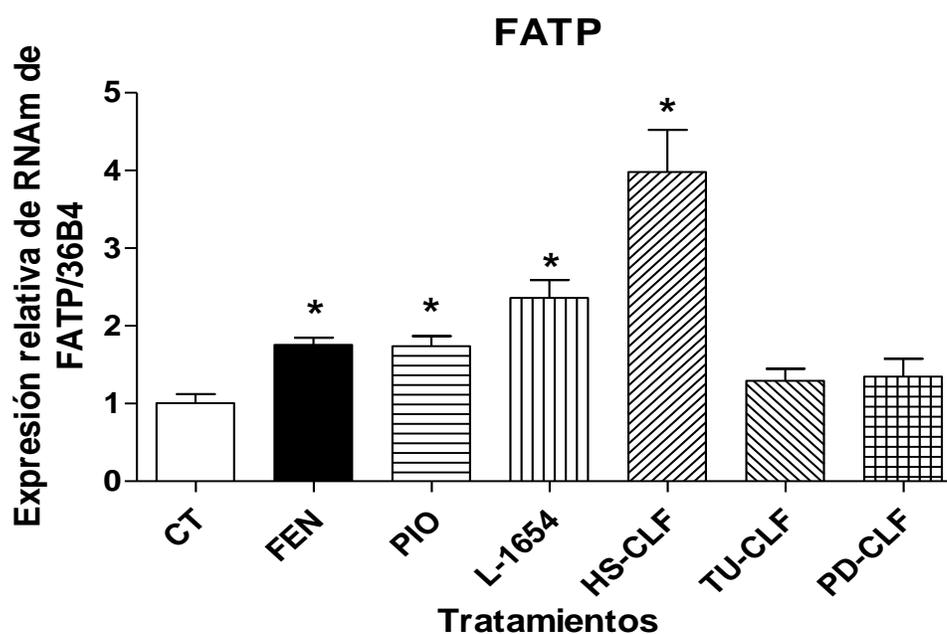


Gráfico 23. Efecto de los extractos clorofórmicos sobre la expresión del RNAm de FATP. CT: control; FEN: fenofibrato; PIO: pioglitazona; L-16504: agonista de PPAR δ ; HS-CLF: extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*; TU-CLF: extracto clorofórmico de *T. usneoides*; PD-CLF: extracto clorofórmico de *P. decompositum*. Media \pm E.E.M. n=5. *Diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$).

10. DISCUSIÓN

La diversidad química en las plantas es muy amplia y poco estudiada, siendo el conocimiento de la diversidad química de estas especies hasta el momento limitado. Se calcula que se conoce la estructura química de alrededor de 100 mil metabolitos secundarios y podría haber al menos un millón de ellos en todas las especies que faltan por estudiar. Sin embargo el conocimiento que se tiene en la actualidad de las propiedades de los fitoquímicos ha contribuido enormemente a resolver problemas de salud ya que una alta proporción de los medicamentos que se utilizan son derivados de plantas (Montes, 2009).

La gran variedad de metabolitos que producen las plantas ayudarán a enfrentarse al ecosistema que los rodea, como las fluctuaciones de temperatura, desbalance osmótico, hipoxia, radiación UV, disponibilidad de minerales, patógenos y herbívoros, por lo que tanto las concentraciones como la diversidad de compuestos en las plantas varía (Iriti y Faoro, 2009). Siendo así, el rendimiento de los extractos obtenidos fue variado dependiendo el tipo de planta, la parte utilizada de estas, las condiciones a las cuales se encontraban sometidas y el tipo por el cual se realizó la extracción. Por tal motivo, la proporción y variedad de los constituyentes de cada planta es diferente. Principalmente los extractos acuosos de *H. sabdariffa*, *T. usneoides* y el extracto clorofórmico de *P. decompositum* fueron altos con respecto a los demás extractos. Al realizar la separación mediante CC e identificar compuestos de manera cualitativa mediante CCF logramos identificar en los extractos acuosos de

H. sabdariffa y *T. usneoides* una gran cantidad de carbohidratos. Mediante CCF se identificaron una gran cantidad de compuestos polifenólicos en el extracto acuoso de *H. sabdariffa* los cuales son moléculas importantes antioxidantes, asociadas a disminuir el proceso inflamatorio además de tener efecto antiadipogénico (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007). Como se observa en el gráfico 4, los extractos acuosos de *H. sabdariffa* y *P. decompositum* disminuyeron de manera significativa la glucemia con respecto al CT después de 30 minutos de la administración de estos extractos, evitando el pico hiperglucémico inicial, evento importante para el tratamiento de la DM2, ya que evita concentraciones altas en sangre, asociadas a enfermedades como hipertensión, aterosclerosis, estado protrombótico y disfunción endotelial, entre otras (Gross y Staels, 2007). Sin embargo el extracto acuoso de *T. usneoides* aumentó la glucemia, lo que podría deberse al alto contenido de carbohidratos que tiene este extracto, lo que pudo haber aumentado la glucemia. Todos los extractos clorofórmicos poseen efecto antihiperglucemiante con respecto al CT a los 30 minutos (Gráfico 5), evitando el pico hiperglucémico con respecto al grupo CT, siendo el extracto acuoso de *T. usneoides* el que no tuvo efecto sobre la glucemia. Es importante mencionar que el efecto que tienen estos extractos sobre la glucemia es relevante, ya que en personas que padecen DM2 podría ayudar a la regulación del metabolismo de carbohidratos así como también la disminución de la glucemia, la cual es problema fundamental de ésta enfermedad, además también se sabe que la hiperglucemia puede inducir un estado de coma diabético y otras complicaciones como retinopatías, nefropatías y

otras complicaciones que acompañan a la DM2 y otras enfermedades asociadas al SM (Alsahli y Gerich, 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de RT-PCR, el extracto acuoso de *H. sabdariffa* tiene efecto sobre la expresión del RNAm de FATP (Gráfico 14), sin embargo estudios han demostrado que el extracto acuoso, inhibe la expresión de factores adipogénicos como PPAR γ y C/EBP α , además tiene efecto inhibitorio sobre la cascada de señalización PI3K/Akt durante la adipogénesis (Kim *et al.*, 2007), lo que es interesante, ya que la activación de PPAR γ promueve la expresión de FATP, considerándose que este extracto posee otras formas indirectas de promover la activación de PPAR γ y la consecuente transcripción de FATP. Sin embargo se cree que el efecto de este extracto pudiera ser actuando a través de PPAR α , ya que se sabe que este PPAR promueve la transcripción de FATP (Gross y Staels, 2007). Por otra parte, el extracto acuoso de *P. decompositum* no tiene efecto sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ ni sus genes regulados GLUT4 y FATP (Gráficos 15-18). Sin embargo el extracto clorofórmico de la raíz de esta planta tiene un efecto agonista sobre PPAR γ y además de promover su expresión, también promueve la expresión de GLUT4 (Gráficos 16 y 17), sugiriendo que este extracto tiene una o varias moléculas que activan a este PPAR. Por otro lado, los extractos acuoso y clorofórmico de *T. usneoides* no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ ni alguno de sus genes regulados GLUT4 o FATP (Gráficos 15-18), siendo aún una interrogante el mecanismo de acción por el cual actúan, ya que existen reportes que demuestran que el extracto acuoso de esta planta posee efecto

hipoglucémico y antidiabético (Marles y Farnsworth, 1995; Witherup *et al.*, 1995). El extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* mostró tener efecto dual sobre la expresión del RNAm de PPAR δ , PPAR γ y algunos de sus genes regulados (GLUT4 y FATP), lo que sugiere fuertemente que éste extracto posea moléculas agonistas duales de PPAR δ/γ , ya que para la expresión del RNAm de estas dos proteínas transportadoras de glucosa (GLUT4) y AG (FATP) respectivamente, se necesita de la activación de estos dos PPARs. Como se mencionó en este trabajo, se identificaron 6 grupos de compuestos en el extracto clorofórmico de esta planta, dentro de los cuales los terpenos y ácidos grasos pudieran ser los encargados del efecto agonista dual de PPAR δ y PPAR γ (Barish *et al.*, 2006; Fatehi-Hassanabad y Chan, 2005; Janani y Ranjitha Kumari, 2015; Karsenty *et al.*, 2013; Salam *et al.*, 2008), sin descartar que 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 punto importante es que el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* pudiera actuar a través de vías de señalización para la expresión y activación de PPAR δ 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 que regulan. Por ejemplo, se sabe que la expresión del RNAm de PPAR δ y algunos de sus genes regulados puede ser a través de la activación de AMPK (Ceddia, 2013; O'Neill *et al.*, 2013). Otros investigadores demostraron que algunos compuestos encontrados en la hoja del árbol de mango regulan las vías AMPK y Akt, vías involucradas en el catabolismo de lípidos, y catabolismo/anabolismo de glucosa respectivamente (Zhang *et al.*, 2013),

siendo estas vías las que también se encuentran involucradas en la activación de PPAR δ y PPAR γ respectivamente, sugiriendo la posible acción indirecta de este extracto, dando como consecuencia la regulación de PPAR δ 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 y su misma expresión en cultivo de células HepG2 (Hansen *et al.*, 2001; Lazennec *et al.*, 2000). También se sabe que la activación de PKA puede activar a AMPK, siendo una posibilidad de que alguna molécula del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* tenga su efecto a través de alguna de estas vías. Otro ejemplo es el 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR) que es un análogo de AMP, el cuál ha sido utilizado clínicamente para activar a AMPK (ya que su sustrato es AMP), favoreciendo la expresión y activación de PPAR δ (Ceddia, 2013; Russo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009), siendo estas algunas maneras de efecto indirecto y posiblemente por las cuales actúa el extracto clorofórmico de que esta planta ejerza su acción. Es importante mencionar que este extracto también puede actuar a través de la vía Akt o bien río arriba en esta cascada de señalización, 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).

Otro punto importante es que las moléculas contenidas en el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* 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).

Tanto la homeostasis y efecto sinérgico que tienen las vías AMPK y Akt sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos es importante en la regulación metabólica, generalmente cuando una vía se encuentra encendida, la otra permanece prácticamente apagada, siendo lógico, ya que el organismo activa una u otra dependiendo las necesidades a las cuales se encuentra sometida la célula. Ambas vías tienen regulación sobre la otra, lo cual es importante en mantenerlas activas, de tal manera que se regule el metabolismo tanto de lípidos como de glucosa. La activación dual de PPAR δ/γ es importante en el tratamiento de enfermedades como la DM2 y otras enfermedades asociadas al SM, ya que en estas, el metabolismo tanto de lípidos como de carbohidratos se encuentra en desbalance, siendo importante por un lado favorecer el transporte y utilización de AG a través de la β -oxidación mediante la activación de PPAR δ para evitar la acumulación de estos y por otro lado, promover la acumulación y la toma de glucosa activando la homeostasis metabólica. Se sabe que los altos niveles de AG en sangre están involucrados en la RI, principalmente inhibiendo las acciones de la insulina, generalmente inhibiendo la vía Akt, impidiendo eventos como la toma de glucosa, glucogenogénesis y adipogénesis, los cuales son importantes en la sensibilidad a la insulina, por lo cual, la activación dual de PPAR δ/γ mejora el tráfico de estas vías. Así mismo, la activación de PPAR γ promueve la expresión de adiponectina, una hormona que tiene

efectos sensibilizadores a la insulina en otros órganos como el músculo esquelético, hígado y el mismo tejido adiposo. El efecto dual que ejerce el extracto clorofórmico sobre la activación de PPAR δ y PPAR γ es importante, debido a que favorece de manera general la homeostasis del metabolismo, lo cual es importante para contrarrestar y revertir el desbalance metabólico presente en la DM2 y otras asociadas al SM, sin embargo es necesario continuar con la investigación para conocer cuáles son las moléculas responsables de este efecto y cuál es su mecanismo de acción lo que permitirá sentar las bases para el desarrollo de un nuevo fármaco de origen natural para el tratamiento de estas enfermedades.

Se estandarizaron los extractos que tuvieron efecto sobre los PPARs o alguno que tuviera efecto sobre la expresión de sus genes regulados. El compuesto con el que se estandarizó el extracto acuoso de *H. sabdariffa*, el D3SB es una antocianina mayoritaria en este extracto, a la cual se le ha adjudicado tener propiedades antihipercolesterolémicas, siendo una posibilidad que esta molécula tenga su efecto mediante la inhibición de PPAR γ y/o bien activando PPAR δ , evitando el proceso adipogénico y/o favoreciendo el catabolismo de AG. Además a esta molécula se le ha adjudicado otras propiedades medicinales; como agente antihipertensivo y antioxidante (Hopkins *et al.*, 2013). La estandarización del extracto clorofórmico de *P. decompositum* se realizó con el aislamiento de AM, sesquiterpeno al cual se le ha adjudicado tener efecto antihiperglucemiante (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2000a), el cual pudiera tener su efecto a través de la activación de PPARs. El compuesto con el que se estandarizó el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*, el 5-HMF, ha sido

identificado en algunos granos como el trigo, además en algunos otros productos como los jugos de frutas embotellados, formado a partir de la descomposición de los glúcidos, se ha demostrado que en ratones con daño oxidativo hepático inducido por alcohol, éste compuesto disminuye la concentración de ALT (alanina aminotransferasa), AST (aspartato transaminasa), TC (colesterol total), TG (triglicéridos), LDL (lipoproteína de baja densidad) en sangre y niveles de MDA (malondialdeído) en tejido hepático (Li *et al.*, 2015). Si bien se conocen algunos de los efectos del extracto acuoso de *H. sabdariffa*, poco se sabe de las propiedades del extracto clorofórmico, ya que este cuenta con características químicas diferentes al acuoso y con ello diferentes constituyentes químicos. Aunado a esto, se desconoce las moléculas responsables de la activación dual sobre PPAR δ / γ que ejerce el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*. Otro punto importante es que no existen agonistas duales comerciales de PPAR δ / γ , por lo que es importante continuar en la investigación acerca del mecanismo de acción, así como también descubrir que moléculas están involucradas en éste mecanismo. Siendo importante asentar las bases para el desarrollo de nuevos fármacos a partir del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* para el tratamiento de la DM2 y de otras enfermedades asociadas al SM.

11. CONCLUSIONES

Las plantas medicinales siguen siendo una fuente amplia de moléculas bioactivas para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DM2 y enfermedades asociadas al SM.

Se logró estandarizar los extractos con efecto agonista de PPARs.

El extracto acuoso de *H. sabdariffa* mostró tener efecto sobre la expresión de FATP, sin embargo no se conoce el mecanismo de acción por el cual aumenta la expresión de FATP ya que no se observó aumento en la expresión de PPAR γ .

El extracto clorofórmico de *P. decompositum* mostró efecto activador sobre PPAR γ y la consecuente expresión de GLUT4.

El extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* demostró tener efecto agonista dual de PPAR δ/γ y algunos de los genes que regulan (GLUT4 y FATP), en línea de adipocitos 3T3-L1, lo cual muy posiblemente se encuentra favoreciendo el equilibrio metabólico, ya que el extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* promueve la expresión de los RNAm de GLUT4 y FATP evento que sugiere que aumentará la toma de glucosa y AG, lo cual favorecería la sensibilidad a la insulina.

12. PERSPECTIVAS

1. Identificar las moléculas encargadas del efecto agonista dual del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa*.
2. Dilucidar el mecanismo de acción que ejercen la o las moléculas del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* para la activación de PPAR δ / γ .
3. Evaluar el efecto de las moléculas responsables del efecto dual de PPAR δ / γ sobre algunos de los genes regulados por estos a nivel de proteína.
4. Evaluar el efecto de las moléculas agonistas de PPAR δ y PPAR γ del extracto clorofórmico de *H. sabdariffa* sobre las vías de señalización Akt y AMPK.
5. Demostrar que el efecto de las moléculas con efecto dual de PPAR δ / γ regulan la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1.
6. Evaluar el efecto de las moléculas con efecto dual en línea de miocitos c2c12 sobre la expresión de PPAR δ y PPAR γ y algunos de sus genes regulados a nivel de RNAm y proteína, ya que también es un tejido del cual depende en gran medida la sensibilidad a la insulina.
7. Evaluar el efecto de las moléculas agonistas duales de PPAR δ / γ en un modelo *in vivo* diabético (DM2).

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, K (2014). Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *J Tradit Chin Med* 34, 234-237.
2. Ainuddin, J, Karim, N, Hasan, AA y Naqvi, SA (2015). Metformin versus insulin treatment in gestational diabetes in pregnancy in a developing country. A randomized control trial. *Diabetes Res Clin Pract* 107, 290-299.
3. Alarcón-Aguilar, FJ, Jiménez-Estrada, M, Reyes-Chilpa, R, González-Paredes, B, Contreras, CC y Román-Ramos, R (2000a). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol* 69, 207-215.
4. Alarcón-Aguilar, FJ, Jimenez-Estrada, M, Reyes-Chilpa, R y Roman-Ramos, R (2000b). Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 72, 21-27.
5. Alarcón-Aguilar, FJ, Zamilpa, A, Pérez-García, MD, Almanza-Pérez, JC, Romero-Nuñez, E, Campos-Sepulveda, EA, Vázquez-Carrillo, LI y Román-Ramos, R (2007). Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J Ethnopharmacol* 114, 66-71.
6. Alarcón-Alonso, J, Zamilpa, A, Aguilar, FA, Herrera-Ruiz, M, Tortoriello, J y Jimenez-Ferrer, E (2012). Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *J Ethnopharmacol* 139, 751-756.
7. Alberti, KG, Zimmet, P y Shaw, J (2007). International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med* 24, 451-463.
8. Alsahli, M y Gerich, JE (2014). Hypoglycemia, Chronic Kidney Disease, and Diabetes Mellitus. *Mayo Clin Proc*.
9. Andrade-Cetto, A y Heinrich, M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99, 325-348.
10. Apovian, CM (2011). Management of diabetes across the course of disease: minimizing obesity-associated complications. *Diabetes Metab Syndr Obes* 4, 353-369.
11. Atallah, NHJ (1971). Triterpenoids and steroid constituents of Florida spanish moss. *Phytochemistry* 10, Pergamon Press, Printed in England Vol. 10, p p. 3139 to 3145.
12. Atanasov, AG, Wang, JN, Gu, SP, Bu, J, Kramer, MP, Baumgartner, L, Fakhrudin, N, Ladurner, A, Malainer, C, Vuorinen, A, Noha, SM, Schwaiger, S, Rollinger, JM, Schuster, D, Stuppner, H, Dirsch, VM y Heiss, EH (2013). Honokiol: a non-adipogenic PPAR γ agonist from nature. *Biochim Biophys Acta* 1830, 4813-4819.

13. Bailey, CJ (2000). Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 21, 259-265.
14. Balakumar, P, Rose, M, Ganti, SS, Krishan, P y Singh, M (2007). PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol Res* 56, 91-98.
15. Banga, A, Unal, R, Tripathi, P, Pokrovskaya, I, Owens, RJ, Kern, PA y Ranganathan, G (2009). Adiponectin translation is increased by the PPARgamma agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E480-489.
16. Bano, G (2013). Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 27, 715-726.
17. Barger, PM y Kelly, DP (2000). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10, 238-245.
18. Barish, GD, Narkar, VA y Evans, RM (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116, 590-597.
19. Bassaganya-Riera, J, Reynolds, K, Martino-Catt, S, Cui, Y, Hennighausen, L, Gonzalez, F, Rohrer, J, Benninghoff, AU y Hontecillas, R (2004). Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 127, 777-791.
20. Bastarrachea, RA, Lopez-Alvarenga, JC, Bolado-Garcia, VE, Tellez-Mendoza, J, Laviada-Molina, H y Comuzzie, AG (2007). Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance. *Gac Med Mex* 143, 505-512.
21. Benjamin, S y Spener, F (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab (Lond)* 6, 36.
22. Benz, V, Kintscher, U y Foryst-Ludwig, A (2012). Sex-specific differences in Type 2 Diabetes Mellitus and dyslipidemia therapy: PPAR agonists. *Handb Exp Pharmacol*, 387-410.
23. Berger, JP, Akiyama, TE y Meinke, PT (2005). PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 26, 244-251.
24. Boden, G y Shulman, GI (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 *Suppl* 3, 14-23.
25. Bronson Joanne, BA, Dhar Murali, Ellsworth, Merrit J. Robert (2014). *To Market, To Market-2013*. Elsevier Inc. 49, 52-53.
26. Bulchandani, D, Nachnani, JS, Herndon, B, Molteni, A, Pathan, MH, Quinn, T, Hamdan, HA, Alba, LM y Graves, L (2012). Effect of exendin (exenatide)--GLP 1 receptor agonist on the thyroid and parathyroid gland in a rat model. *Eur J Pharmacol* 691, 292-296.

27. Burns, KA y Vanden Heuvel, JP (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1771, 952-960.
28. Campos, MG, Oropeza, M, Torres-Sosa, C, Jimenez-Estrada, M y Reyes-Chilpa, R (2009). Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium decompositum* block ATP sensitive potassium channels. *J Ethnopharmacol* 123, 489-493.
29. Capuano, A, Sportiello, L, Maiorino, MI, Rossi, F, Giugliano, D y Esposito, K (2013). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy--focus on alogliptin. *Drug Des Devel Ther* 7, 989-1001.
30. Cariou, B, Zair, Y, Staels, B y Bruckert, E (2011). Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 34, 2008-2014.
31. Ceddia, RB (2013). The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 366, 194-203.
32. Contreras-Weber, C, Perez-Gutierrez, S, Alarcon-Aguilar, F y Roman-Ramos, R (2002). Anti-hyperglycemic effect of *Psacalium peltatum*. *Proc West Pharmacol Soc* 45, 134-136.
33. Correa, PJ, Vargas, JF, Sen, S y Illanes, SE (2014). Prediction of gestational diabetes early in pregnancy: targeting the long-term complications. *Gynecol Obstet Invest* 77, 145-149.
34. Chang, JH, Tseng, CF y Wang, JY (2007). Hypoglycemia-induced myocardial infarction: an unusual adverse effect of sulfonylureas. *Int J Cardiol* 115, 414-416.
35. Chang, YH, Chang, DM, Lin, KC, Shin, SJ y Lee, YJ (2011). Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev* 27, 515-527.
36. Da-Costa-Rocha, I, Bonnlaender, B, Sievers, H, Pischel, I y Heinrich, M (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem* 165, 424-443.
37. de Queiroga, MA, de Andrade, LM, Florencio, KC, de Fatima Agra, M, da Silva, MS, Barbosa-Filho, JM y da-Cunha, EV (2004). Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia* 75, 423-425.
38. DeFronzo, RA, Mehta, RJ y Schnure, JJ (2013). Pleiotropic effects of thiazolidinediones: implications for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. *Hosp Pract* (1995) 41, 132-147.
39. Delgado, G (2006). Investigación sobre la química de productos naturales en el Instituto de Química de la UNAM. Estudios iniciales y química de eremofilanos, bisabolanos y sesquiterpenos relacionados. *Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química UNAM*, 2-19.

40. Duval, C, Fruchart, JC y Staels, B (2004). PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 97, 665-672.
41. Fatehi-Hassanabad, Z y Chan, CB (2005). Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic beta-cell function. *Nutr Metab (Lond)* 2, 1.
42. Flores-Padilla, L, Solorio-Paez, IC, Melo-Rey, ML y Trejo-Franco, J (2014). [Pregnancy and obesity: risk of developing gestational diabetes in the northern border area of Mexico]. *Gac Med Mex* 150 Suppl 1, 73-78.
43. Flores, AM, Li, L, McHugh, NG y Aneskievich, BJ (2005). Enzyme association with PPARgamma: evidence of a new role for 15-lipoxygenase type 2. *Chem Biol Interact* 151, 121-132.
44. Fredenrich, A y Grimaldi, PA (2005). PPAR delta: an incompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab* 31, 23-27.
45. Gallwitz, B (2013). Emerging DPP-4 inhibitors: focus on linagliptin for type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 6, 1-9.
46. Gao, Y, Yang, MF, Su, YP, Jiang, HM, You, XJ, Yang, YJ y Zhang, HL (2013). Ginsenoside Re reduces insulin resistance through activation of PPAR-gamma pathway and inhibition of TNF-alpha production. *J Ethnopharmacol* 147, 509-516.
47. Ghoshal, K y Bhattacharyya, M (2015). Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World J Diabetes* 6, 151-166.
48. Gilardi, F, Giudici, M, Mitro, N, Maschi, O, Guerrini, U, Rando, G, Maggi, A, Cermenati, G, Laghezza, A, Liodice, F, Pochetti, G, Lavecchia, A, Caruso, D, De Fabiani, E, Bamberg, K y Crestani, M (2014). LT175 is a novel PPARalpha/gamma ligand with potent insulin sensitizing effects and reduced adipogenic properties. *J Biol Chem*.
49. Glinghammar, B, Berg, AL, Bjurstrom, S, Stockling, K, Blomgren, B, Westerberg, R, Skanberg, I, Hellmold, H y Andersson, U (2011). Proliferative and molecular effects of the dual PPARalpha/gamma agonist tesaglitazar in rat adipose tissues: relevance for induction of fibrosarcoma. *Toxicol Pathol* 39, 325-336.
50. Gooda Sahib, N, Saari, N, Ismail, A, Khatib, A, Mahomoodally, F y Abdul Hamid, A (2012). Plants' metabolites as potential antiobesity agents. *ScientificWorldJournal* 2012, 436039.
51. Gregoire, FM, Smas, CM y Sul, HS (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809.
52. Gross, B y Staels, B (2007). PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21, 687-710.
53. Guariguata, L (2013). Contribute data to the 6th edition of the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract* 100, 280-281.

54. Guo, S (2014). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 220, T1-T23.
55. Hajer, GR, van Haefen, TW y Visseren, FL (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29, 2959-2971.
56. Hansen, JB, Zhang, H, Rasmussen, TH, Petersen, RK, Flindt, EN y Kristiansen, K (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* 276, 3175-3182.
57. 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. *Biochem J* 459, 275-287.
58. Hidalgo-Figueroa, S, Ramirez-Espinosa, JJ, Estrada-Soto, S, Almanza-Perez, JC, Roman-Ramos, R, Alarcon-Aguilar, FJ, Hernandez-Rosado, JV, Moreno-Diaz, H, Diaz-Coutino, D y Navarrete-Vazquez, G (2013). Discovery of thiazolidine-2,4-dione/biphenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR alpha/gamma modulator with antidiabetic effect: in vitro, in silico and in vivo approaches. *Chem Biol Drug Des* 81, 474-483.
59. Hopkins, AL, Lamm, MG, Funk, JL y Ritenbaugh, C (2013). Hibiscus sabdariffa L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia* 85, 84-94.
60. Iriti, M y Faoro, F (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int J Mol Sci* 10, 3371-3399.
61. Irons, BK y Minze, MG (2014). Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 15-24.
62. Janani, C y Ranjitha Kumari, BD (2015). PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr* 9, 46-50.
63. Kao, ES, Hsu, JD, Wang, CJ, Yang, SH, Cheng, SY y Lee, HJ (2009). Polyphenols extracted from Hibiscus sabdariffa L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating cyclooxygenase-2 expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 385-390.
64. 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. *Eur J Nutr* 52, 1865-1874.
65. Kelly, DP (2001). The pleiotropic nature of the vascular PPAR gene regulatory pathway. *Circ Res* 89, 935-937.
66. Kim, JK, So, H, Youn, MJ, Kim, HJ, Kim, Y, Park, C, Kim, SJ, Ha, YA, Chai, KY, Kim, SM, Kim, KY y Park, R (2007). Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits

the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. *J Ethnopharmacol* 114, 260-267.

67. Kim, SN, Choi, HY, Lee, W, Park, GM, Shin, WS y Kim, YK (2008). Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from *Sargassum yezeense* stimulate adipocyte differentiation through PPARalpha/gamma activation in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 582, 3465-3472.

68. Kim, T, Lee, W, Jeong, KH, Song, JH, Park, SH, Choi, P, Kim, SN, Lee, S y Ham, J (2012). Total synthesis and dual PPARalpha/gamma agonist effects of amorphastilbol and its synthetic derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4122-4126.

69. Komatsu, M, Tong, Y, Li, Y, Nakajima, T, Li, G, Hu, R, Sugiyama, E, Kamijo, Y, Tanaka, N, Hara, A y Aoyama, T (2010). Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. *Genes Cells* 15, 91-100.

70. Krentz, AJ y Bailey, CJ (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65, 385-411.

71. 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. *Mol Endocrinol* 14, 1962-1975.

72. Li, W, Qu, XN, Han, Y, Zheng, SW, Wang, J y Wang, YP (2015). Ameliorative effects of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) from *Schisandra chinensis* on alcoholic liver oxidative injury in mice. *Int J Mol Sci* 16, 2446-2457.

73. Li, WL, Zheng, HC, Bukuru, J y De Kimpe, N (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 92, 1-21.

74. Liu, L, Ma, Y, Wang, RL, Xu, WR, Wang, SQ y Chou, KC (2013). Find novel dual-agonist drugs for treating type 2 diabetes by means of cheminformatics. *Drug Des Devel Ther* 7, 279-288.

75. Liu, L, Shan, S, Zhang, K, Ning, ZQ, Lu, XP y Cheng, YY (2008). Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res* 22, 1400-1403.

76. Luquet, S, Gaudel, C, Holst, D, Lopez-Soriano, J, Jehl-Pietri, C, Fredenrich, A y Grimaldi, PA (2005). Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1740, 313-317.

77. Makaryus, AN y McFarlane, SI (2006). Diabetes insipidus: diagnosis and treatment of a complex disease. *Cleve Clin J Med* 73, 65-71.

78. Marles, RJ y Farnsworth, NR (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 137-189.

79. Merino-Aguilar, H, Arrieta-Baez, D, Jimenez-Estrada, M, Magos-Guerrero, G, Hernandez-Bautista, RJ, Susunaga-Notario Adel, C, Almanza-Perez, JC, Blancas-

- Flores, G, Roman-Ramos, R y Alarcon-Aguilar, FJ (2014). Effect of fructooligosaccharides fraction from *Psacalium decompositum* on inflammation and dyslipidemia in rats with fructose-induced obesity. *Nutrients* 6, 591-604.
80. Mittra, S, Sangle, G, Tandon, R, Sharma, S, Roy, S, Khanna, V, Gupta, A, Sattigeri, J, Sharma, L, Priyadarsiny, P, Khattar, SK, Bora, RS, Saini, KS y Bansal, VS (2007). Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPARalpha/gamma agonist, in db/db mice: adipogenesis/or oedema? *Br J Pharmacol* 150, 480-487.
81. Mohamed, J, Shing, SW, Idris, MH, Budin, SB y Zainalabidin, S (2013). The protective effect of aqueous extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. UKMR-2) against red blood cell membrane oxidative stress in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinics (Sao Paulo)* 68, 1358-1363.
82. Montes, BR (2009). Chemical diversity in plants against phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Micología* 29: 73-82.
83. O'Neill, HM, Holloway, GP y Steinberg, GR (2013). AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. *Mol Cell Endocrinol* 366, 135-151.
84. OMS (1994). *Plants That Save Lives: a Report from an International Symposium on Medicinal Plants*. Botanic Gardens Conservation International 2, number 3.
85. Ortuno Sahagun, D, Marquez-Aguirre, AL, Quintero-Fabian, S, Lopez-Roa, RI y Rojas-Mayorquin, AE (2012). Modulation of PPAR-gamma by Nutraceuticals as Complementary Treatment for Obesity-Related Disorders and Inflammatory Diseases. *PPAR Res* 2012, 318613.
86. Palomer, X, Perez, A y Blanco-Vaca, F (2005). Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease. *Med Clin (Barc)* 124, 388-395.
87. Pinelli, A, Godio, C, Laghezza, A, Mitro, N, Fracchiolla, G, Tortorella, V, Lavecchia, A, Novellino, E, Fruchart, JC, Staels, B, Crestani, M y Liodice, F (2005). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling investigation of new chiral fibrates with PPARalpha and PPARgamma agonist activity. *J Med Chem* 48, 5509-5519.
88. Quang, TH, Ngan, NT, Minh, CV, Kiem, PV, Tai, BH, Nhiem, NX, Thao, NP, Luyen, BT, Yang, SY y Kim, YH (2013). Anti-inflammatory and PPAR transactivational properties of flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Phytother Res* 27, 1300-1307.
89. Reilly, SM y Lee, CH (2008). PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett* 582, 26-31.
90. Russo, GL, Russo, M y Ungaro, P (2013). AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochem Pharmacol* 86, 339-350.

91. Sabzghabae, AM, Ataei, E, Kelishadi, R, Ghannadi, A, Soltani, R, Badri, S y Shirani, S (2013). Effect of Hibiscus sabdariffa Calices on Dyslipidemia in Obese Adolescents: A Triple-masked Randomized Controlled Trial. *Mater Sociomed* 25, 76-79.
92. Salam, NK, Huang, TH, Kota, BP, Kim, MS, Li, Y y Hibbs, DE (2008). Novel PPAR-gamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening, induced-fit docking and biological assay study. *Chem Biol Drug Des* 71, 57-70.
93. Sears, DD, Hsiao, A, Ofrecio, JM, Chapman, J, He, W y Olefsky, JM (2007). Selective modulation of promoter recruitment and transcriptional activity of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 515-521.
94. Seimandi, M, Lemaire, G, Pillon, A, Perrin, A, Carlavan, I, Voegel, JJ, Vignon, F, Nicolas, JC y Balaguer, P (2005). Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* 344, 8-15.
95. Stepan, CM y Lazar, MA (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 18-23.
96. Takahashi, N, Kawada, T, Goto, T, Yamamoto, T, Taimatsu, A, Matsui, N, Kimura, K, Saito, M, Hosokawa, M, Miyashita, K y Fushiki, T (2002). Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Lett* 514, 315-322.
97. Toyoda, T, Kamei, Y, Kato, H, Sugita, S, Takeya, M, Suganami, T y Ogawa, Y (2008). Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1199-1207.
98. Tsuda, T, Ueno, Y, Aoki, H, Koda, T, Horio, F, Takahashi, N, Kawada, T y Osawa, T (2004). Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 149-157.
99. Witherup, KM, McLaughlin, JL, Judd, RL, Ziegler, MH, Medon, PJ y Keller, WJ (1995). Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*). *J Nat Prod* 58, 1285-1290.
100. Xu, C, Wang, LL, Liu, HY, Zhou, XB, Cao, YL y Li, S (2006). C333H, a novel PPARalpha/gamma dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism. *Acta Pharmacol Sin* 27, 223-228.
101. Yang, MH, Avula, B, Smillie, T, Khan, IA y Khan, SI (2013). Screening of medicinal plants for PPARalpha and PPARgamma activation and evaluation of their effects on glucose uptake and 3T3-L1 adipogenesis. *Planta Med* 79, 1084-1095.

102. Yoke Yin, C, So Ha, T y Abdul Kadir, K (2010). Effects of Glycyrrhizic Acid on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma), Lipoprotein Lipase (LPL), Serum Lipid and HOMA-IR in Rats. *PPAR Res* 2010, 530265.
103. Zhang, BB, Zhou, G y Li, C (2009). AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9, 407-416.
104. Zhang, Y, Liu, X, Han, L, Gao, X, Liu, E y Wang, T (2013). Regulation of lipid and glucose homeostasis by mango tree leaf extract is mediated by AMPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Food Chem* 141, 2896-2905.
105. Zhang, Y, Yu, L, Cai, W, Fan, S, Feng, L, Ji, G y Huang, C (2014). Protopanaxatriol, a novel PPARgamma antagonist from *Panax ginseng*, alleviates steatosis in mice. *Sci Rep* 4, 7375.
106. Zuo, Y, Qiang, L y Farmer, SR (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. *J Biol Chem* 281, 7960-7967.