

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en B.E. Rosario Wendoline Rosiles Alanis

Matrícula: 2143800991

TÍTULO DE LA TESIS:

**“ESTUDIO QUÍMICO BODIRIGIDO DE *Cucurbita ficifolia* Bouché EN
MODELOS HIPOGLUCÉMICOS Y ANTIHIPERGLUCÉMICOS: ANÁLISIS *IN*
VIVO, IN VITRO E IN SILICO”.**

Codirectores:

Dr. Julio César Almanza Perez

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Asesora:

Dra. Rebeca García Macedo

Iztapalapa, Ciudad de México, 25 de mayo 2022.

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe Rosario Wendoline Rosiles Alanis, alumno (a) del posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Estudio químico biodirigido de *Cucurbita ficifolia* Bouché en modelos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos: análisis *In vivo*, *In vitro* e *In silico*”.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante La Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental para lo obtención del grado de Doctor (a) en Biología Experimental, es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 16 de mayo del 2022.

Atentamente


Rosario Wendoline Rosiles Alanis

Nombre y firma del alumno

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 16 de mayo de 2022.

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El(La) que suscribe **Rosario Wendoline Rosiles Alanis**, alumno(a) con número de matrícula **2143800991**, del posgrado en **Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Estudio químico biodirigido de *Cucurbita ficifolia* Bouché en modelos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos: análisis *In vivo*, *In vitro* e *In silico*”**, a desarrollar en el **Laboratorio de Toxicología y Farmacología en la UAM-Iztapalapa, en el laboratorio de Fitoquímica en CIBIS-IMSS y en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades en CMN-SXXI-IMSS**, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.


Rosario Wendoline Rosiles Alanis

Nombre completo y firma autógrafa*

COMITÉ TUTORAL

Co-Director:

Dr. Julio César Almanza Perez.

Profesor Titular C.

Depto. Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

jcap@xanum.uam.mx

Co-Director:

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

Investigador Titular B.

Laboratorio de Fitoquímica.

Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) – IMSS.

azamilpa_2000@yahoo.com.mx

Asesora:

Dra. Rebeca García Macedo

Investigadora Asociada C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades

CMN SXXI. IMSS

gamareb@yahoo.es

El programa de doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 0904-0) pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y cuenta con el apoyo del mismo consejo mediante el programa PNP-CONACyT-SEP a través del convenio número 309-0 y clave del programa C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa, bajo la codirección del Dr. Julio César Almanza Pérez, en el laboratorio de Fitoquímica del Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur, IMSS, bajo la codirección del Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y en el laboratorio de Investigación Médica en Bioquímica en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la asesoría de la Dra. Rebeca García Macedo.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de CONACyT; FORDECYT/PRONACES (Ciencia de Frontera 377882)

Este trabajo de investigación se realizó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, con número de becario 636179 y CVU 636179)

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Estudio químico biodirigido de *Cucurbita ficifolia* Bouché en modelos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos: análisis *In vivo*, *In vitro* e *In silico***” con fecha del 25 de mayo de 2022.

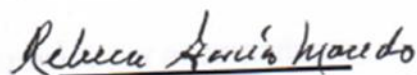
Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
aaaf@xanum.uam.mx



Dra. Rebeca García Macedo.

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.
Hospital de Especialidades,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
gamarbk@gmail.com



Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Laboratorio de Investigación
Biomédica en Productos Naturales.
dr.marcorodriguez@gmail.com



Dr. Manasés Gonzalez Cortazar.

Departamento de Fitoquímica Farmacológica,
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS.
gmanases@hotmail.com



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio Almanza, por guiarme, brindarme su amistad y acompañamiento desde el principio y durante todo mi proceso formativo. Por compartir su conocimiento.

Al Dr. Alejandro Zamilpa, por abrirme las puertas de su laboratorio, introducirme al maravilloso mundo de la fitoquímica, por su amabilidad y colaboración durante todo este proceso.

A la Dra. Rebeca, por apoyarme y brindarme un lugar en donde trabajar cuando fue necesario, por su orientación, atención y sugerencias que me brindo, haciendo posible este trabajo.

A los Doctores Manasés y Marco Aurelio por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Alarcón, por sus preciados comentarios y por el tiempo invertido en la mejora de este trabajo y su orientación en los momentos que la he necesitado.

A todos los compañeros del laboratorio de farmacología, gracias por acompañarme en esta etapa y por haber hecho de nuestro segundo hogar, el laboratorio, un recinto tan agradable, gracias a su amistad y solidaridad invaluable que siempre me hicieron sentir como estar en familia. Por su compañía, su ayuda y amistad que hicieron que el tiempo en el laboratorio fuera agradable.

A mis amigos Beatriz, Abraham, Gibrán, Betty, Joel, Lorena y Diana por ser mi apoyo siempre, por su compañía, amistad. Gracias por escucharme y acompañarme durante todo este tiempo en donde me han dado momentos invaluable.

A Yuri por todo el apoyo, la paciencia en los momentos de estrés, por siempre creer en que tengo la capacidad de hacer lo que me proponga.

A mis padres por darme todo su amor, paciencia, cariño y por inculcarme la curiosidad y el amor al conocimiento.

RESUMEN

Introducción

La diabetes mellitus tiene como característica principal un estado sostenido de hiperglucemia, resultante de una deficiente secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas, resistencia a su acción en tejidos diana, o ambas. Se trata de un padecimiento complejo que involucra diversas alteraciones metabólicas. *Cucurbita ficifolia* Bouché es una especie vegetal utilizada comúnmente como antidiabético dentro de la medicina tradicional mexicana. En estudios previos ha mostrado efectos hipoglucemiantes, antioxidante y antiinflamatorio, entre otros. A pesar de ello, aún no se cuenta con un análisis fitoquímico biodirigido que permita conocer los compuestos bioactivos y responsables de estas acciones, en particular de la acción hipoglucemiante. Dentro de los puntos clave en la regulación de la glucosa, existen tejidos clave como el músculo esquelético, el tejido adiposo, el páncreas y el hígado, cada uno de ellos involucrado en actividades como la oxidación, el almacenamiento de energía y la producción de insulina. Por ello, las células que conforman estos tejidos representan modelos biológicos útiles para llevar a cabo un fraccionamiento biodirigido a partir del extracto activo de *C. ficifolia*.

Material y métodos

Se obtuvieron tres preparaciones a partir de *C. ficifolia* utilizando disolventes de distinta polaridad: extracto acetónico, extracto acuoso y bipartición del extracto acuoso en acetato de etilo denominada fracción de AcOEt. Se evaluó su efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico *in vivo* para seleccionar el extracto o fracción más activa y realizar su fraccionamiento por cromatografía. Las fracciones y subfracciones se sometieron a bioensayos *in vitro*: en células pancreáticas RINm5F para evaluar su efecto sobre la secreción de insulina y en miocitos C2C12 para evaluar la expresión del ARNm de GLUT-4. Ambos modelos fueron empleados como modelos de monitoreo para llevar a cabo una separación guiada, así como la purificación e identificación de los compuestos presentes en la fracción activa. Los compuestos identificados fueron también evaluados en estos mismos ensayos biológicos, así como en células HepG2 para evaluar su efecto sobre la acumulación

de glucógeno y en un modelo in vivo usando ratones diabéticos. Además, con los compuestos identificados se realizó un análisis de acoplamiento molecular sobre los receptores PPAR γ y GPR40.

Resultados

La fracción de acetato de etilo derivada del extracto acuoso mostró efecto hipoglucemiante en el modelo agudo y un contundente efecto antihiperoglucemiante en la prueba de tolerancia a la glucosa oral, por lo que se procedió a la separación química de sus componentes.

Las fracciones y subfracciones obtenidas se evaluaron en modelos in vivo e in vitro y a partir de ellas se logró identificar los compuestos β -sitosterol y ácido 4-hidroxibenzoico, que mostraron acción dual sobre la expresión de GLUT-4 y secreción de insulina, así como incremento en la expresión de adiponectina y PPAR γ , además de incremento en la deposición de glucógeno en células hepáticas. β -sitosterol mostró efecto antihiperoglucémico, mientras que el ácido 4-hidroxibenzoico exhibió mayor efecto hipoglucémico en ratones diabéticos. En los estudios in silico, ambos compuestos mostraron potencial como agonistas parciales de receptores GPR40 y PPAR γ .

Conclusión

A través de un fraccionamiento químico guiado por ensayos biológicos se identificaron los compuestos β -sitosterol y ácido 4-hidroxibenzoico como los compuestos mayoritarios de la fracción de acetato de etilo de *C. ficifolia*, los cuales mostraron acción secretagoga de insulina y acción agonista sobre PPAR γ , además de efecto sobre la deposición de glucógeno. Estos compuestos podrían explicar, en parte, los efectos hipoglucemiante y antihiperoglucémico de *C. ficifolia*, representando dos entidades químicas significantes para el diseño de nuevos fármacos con múltiples blancos moleculares con utilidad en el tratamiento de enfermedades metabólicas.

Summary

Introduction

Diabetes mellitus comprises a wide range of metabolic diseases and is mainly characterized by a chronic state of hyperglycemia, resulting from defects on the secretion and action of the insulin in peripheral tissues. Chronic hyperglycemia is associated with dysfunction and damage on the long term, such as organ failure, especially eyes, kidneys, nerves, heart, and vascular system. *Cucurbita ficifolia* Bouché is a plant commonly used in traditional Mexican medicine to treat diabetes mellitus. In previous studies it has shown diverse effects such as hypoglycemic, antioxidant, and antiinflammatory. However, there is still no phytochemical analysis that will allow the identification of bioactive compounds responsible for their hypoglycaemic effect. Among the key points in glucose regulation are the cells of the skeletal muscle, adipose tissue, pancreas and liver, which are involved in activities such as oxidation, energy storage, and insulin production. These cells can serve as biological models for performing a chemical fractionation guided by bioassay of the active extract of *C. ficifolia*.

Material and methods

Three extracts of different polarity of *C. ficifolia* were obtained: acetonetic extract, aqueous extract, and a bipartition of the aqueous extract in ethyl acetate (AcOEt fraction). The hypoglycemic and antihyperglycemic effects of these extracts were evaluated in models *in vivo* to select the most active extract or fraction and carry out a chromatographic fractionation. The fractions and subfractions were subjected to bioassays in RINm5F pancreatic cells to evaluate their effect on insulin secretion, as well as in C2C12 myoblasts to evaluate the expression of GLUT-4 mRNA. Both were used as monitoring models to perform a guided separation, as well as the purification and identification of chemical compounds. The identified compounds were also evaluated in these *in vitro* models, and in HepG2 cells to evaluate effect on glycogen accumulation, as well as in diabetic mice. In addition, with the identified compounds, a molecular docking analysis on PPAR γ and GPR40 was conducted.

Results

Aqueous extract exhibited hypoglycemic effect in an acute *In vivo* model. Ethyl acetate fraction derived from aqueous extract showed a robust antihyperglycemic effect in oral glucose tolerance test (OGTT) and was further fractionated. Chemical separation of fractions was guided by biological *In vitro* activity over GLUT-4 expression in C2C12 muscular cells, and insulin secretion in RINm5F pancreatic cells. The fractions and subfractions that increased expression of glucose transporter GLUT-4, and insulin secretion, were further separated and analyzed. β -sitosterol and 4-hydroxybenzoic acid were identified as active compounds of ethyl acetate fraction and active subfractions. Isolated compounds were evaluated *In vitro* and found to increase both insulin secretion and GLUT4 mRNA expression. Additionally, compounds increased glycogen synthesis in HepG2 cells, β -sitosterol exhibited an antihyperglycemic effect, on oral glucose tolerance test in diabetic mice, while 4-hydroxybenzoic acid had a hypoglycemic effect in acute *In vivo* model. Molecular docking revealed potential as partial agonists over GPR40 and PPAR γ receptors.

Conclusion

Through a method guided by biological assays, β -sitosterol and 4-hydroxybenzoic acid were identified as majoritarian compounds in an ethyl acetate fraction of *C. ficifolia*, with insulin secretagogue action and agonist action on PPAR γ , showing an effect on glycogen deposition. These compounds could be associated with the hypoglycemic and antihyperglycemic effects exerted by *C. ficifolia*. Both compounds represent important chemical entities for the design of new drugs with multiple molecular targets and utility in the treatment of metabolic diseases.

ABREVIATURAS

FID: Federación Internacional de Diabetes

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

GLUT-2: Transportador de glucosa tipo 2

ATP: Adenosin trifosfato

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico.

UDP: Uracilo difosfato

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4

PPARs: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

FATP-1: Proteína transportadora de ácidos grasos 1

LPL-1: Lipoproteín-lipasa tipo 1

FABP4: Proteína de unión a ácidos grasos 4

IRS-1: Sustrato del receptor a Insulina 1

IRS-2: Sustrato del receptor a Insulina 2

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

T2D: Diabetes tipo 2

ACSL: Ligasa 1 de ácidos grasos de cadena larga

PKC: Proteín-cinasa C

eNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

GNE: Glicosilación no enzimática

AGEs: Productos finales de glicación avanzada

DT1: Diabetes tipo 2

DT2: Diabetes tipo 2

ADA: American Diabetes Association

MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
VCAM-1: Proteína 1 de adhesión celular vascular
LDL: Lipoproteína de baja densidad
DQI: D-quirositol
IL-6: Interleucina 6
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-10: Interleucina 10
DM: Diabetes mellitus
OMS: Organización Mundial de la Salud
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social
FAcOEtO: Fracción de acetato de etilo
CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución
CG/EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
RMN: Resonancia magnética nuclear
NIH: Instituto Nacional de Salud
STZ: Streptozotocina
SNT: Suero de neonato de ternera
SFB: Suero fetal bovino
IBMX: Iso butil metil xantina
MTT: Azul de tiazolil tetrazolio bromuro
PBS: Buffer salino de fosfatos
RNA: Ácido ribonucleico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
GPR40: Receptor 40 acoplado a proteína G
ANOVA: Análisis de varianza
COSY: Espectroscopia de correlaciones
HSQC: Coherencia heteronuclear cuántica simple
HMBC: Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples

4-HBA: Ácido 4-hidroxibenzoico
 4-HFAA: Ácido 4-hidroxifenilacético
 EHA: (5-{3-[(6-benzoil-1-propil-2-naftil) oxi]propoxi-1h-indol-1-yl) ácido acético
 AMPK: Cinasa activada por AMP
 PI3K: Fosfatidil-inositol-3 cinasa
 IKK: Inhibidor de kappa B cinasa
 ECA: Enzima convertidora de angiotensina
 ROS: Especies reactivas de oxígeno

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Prevalencia de la diabetes mellitus.....	2
1.3 Metabolismo y control de glucosa en el organismo	3
1.3.1 Páncreas	3
1.3.2 Hígado.....	4
1.3.3 Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs).....	5
1.3.4 Tejido adiposo.....	6
1.3.5 Músculo esquelético.....	7
1.4 Mecanismos por los cuales se produce daño celular debido a la hiperglucemia.	8
1.4.1 Vía de los polioles	8
1.4.2 Proteín cinasa C (PKC)	9
1.4.3 Formación de productos de glicación avanzada	9
1.4.4 Aumento de la actividad de la vía de la hexosamina.....	10

1.4.5 Alteraciones hemorreológicas	10
1.4.6 Estrés oxidante	10
1.5 Clasificación de la diabetes	10
1.6 Complicaciones vasculares derivadas de diabetes mellitus	13
1.7 Terapéutica en el tratamiento de la diabetes y patologías asociadas.....	14
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVO GENERAL.....	18
6.1Objetivos particulares	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7.1 Obtención del material vegetal	19
7.2 Preparación de los extractos	19
7.3 Fraccionamiento químico del extracto más activo	20
7.4 Análisis fitoquímico de los extractos y fracciones	21
7.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)....	22
7.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)	22
7.7 Animales experimentales.....	23
7.7.1 Evaluación del efecto hipoglucemiante de las fracciones obtenidas	23
7.7.2 Evaluación del efecto antihiperglucemiante de las fracciones obtenidas	24
7.7.3 Efecto hipoglucemiante y antihiperglucemiante de los compuestos en ratones diabéticos.	24
7.8 Establecimiento de líneas celulares.....	25
7.8.1 Cultivo de la línea celular C2C12	25

7.8.2 Cultivo de células RINm5F	25
7.8.3 Cultivo de células HepG2.....	25
7.9 Ensayos de funcionalidad celular por MTT	26
7.10 Análisis de expresión relativa	26
7.11 Cuantificación de secreción de insulina	27
7.12 Cuantificación de glucógeno.....	28
7.13 Estudios <i>In silico</i> de docking molecular	28
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
9. RESULTADOS.....	30
10. DISCUSIÓN	68
11. CONCLUSIÓN	78
12. PERSPECTIVAS.....	79
13. REFERENCIAS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estudio agudo en ratones CD-1 por vía intragástrica.	31
Figura 2. Estudio agudo en ratones CD-1 por vía intraperitoneal.	31
Figura 3. Prueba de tolerancia a la glucosa con extractos.	32
Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa con fracciones derivadas de la fracción de acetato de etilo.	33
Figura 5. Cromatogramas del extracto acuoso de <i>C. ficifolia</i> y de la fracción de acetato de etilo.	34
Figura 6. Cromatofolios de las fracciones obtenidas de la separación de la fracción de acetato de etilo.	35
Figura 7. Cromatogramas de la fracción de acetato de etilo y sus fracciones derivadas.	35

Figura 8. Pruebas de funcionalidad celular por MTT con las fracciones primarias en células C2C12.	37
Figura 9. Secreción de insulina en células RinM5F con las fracciones primarias	38
Figura 10. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12.	38
Figura 11. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares Rinm5F y C2C12, tratadas con las subfracciones derivadas de C1F1.	39
Figura 12. Secreción de insulina en células RinM5F, tratadas con las subfracciones derivadas de C1F1.	39
Figura 13. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12 tratadas con las subfracciones derivadas de C1F1.	40
Figura 14. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares a) RinM5f y b) C2C12, tratadas con las subfracciones derivadas de C1F2.	43
Figura 15. Secreción de insulina en células RinM5F con los tratamientos de las subfracciones C1F2.	43
Figura 16. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, tratadas con subfracciones derivadas de C1F2.	44
Figura 17. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹ H de la fracción F2.4.	45
Figura 18. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³ C (RMN) de la subfracción F2.4.	45
Figura 19. Espectro de correlación (COSY) de la fracción F2.4.	46
Figura 20. Espectro de correlación cuántica única heteronuclear (HSQC) de la fracción F2.4.	47
Figura 21. Espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC) de la fracción F2.4.	48
Figura 22. Cromatograma de la fracción F2.4.	49
Figura 23. Cromatogramas de CLAR de la fracción 2.4, fracción de acetato de etilo y 4-HBA.	50
Figura 24. Curva de calibración 4-HBA.	51
Figura 25. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares C2C12, Rinm5F, y HepG2 tratadas con 4-HBA.	53

Figura 26. Secreción de insulina en células RinM5F tratadas con 4-HBA y β -sitosterol.	54
Figura 27. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12 tratadas con 4-HBA y β -sitosterol.	55
Figura 28. Expresión relativa de PPAR γ en células C2C12 tratadas con 4-HBA y β -sitosterol.	56
Figura 29. Expresión relativa de adiponectina en células C2C12 tratadas con 4-HBA y β -sitosterol.	56
Figura 30. Deposición de glucógeno en células hepáticas HepG2 tratadas con 4-HBA y β -sitosterol.	57
Figura 31. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares C2C12, Rinm5F, y HepG2 tratadas con ácido hidroxifenilacético, salicina, ácido cumárico y ácido gálico.	59
Figura 32. Secreción de insulina en células RinM5F tratadas con ácido hidroxifenilacético, salicina, ácido cumárico y ácido gálico.	60
Figura 33. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12 tratadas con ácido hidroxifenilacético, salicina, ácido cumárico y ácido gálico.	61
Figura 34. Deposición de glucógeno en células hepáticas HepG2 tratadas con ácido hidroxifenilacético, salicina, ácido cumárico y ácido gálico.	62
Figura 35. Docking molecular con PPAR γ .	64
Figura 36. Docking molecular con GPR40.	65
Figura 37. Estudio agudo en ratones diabéticos.	67
Figura 38. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) en ratones diabéticos	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para expresión génica	27
Tabla 2. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta de la fracción de acetato de etilo.	35
Tabla 3. Compuestos químicos contenidos en las subfracciones F1.1, F1.2, F1.3, derivadas de C1F1, identificados por análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).	41
Tabla 4. Desplazamientos químicos del compuesto ácido 4-hidroxibenzoico obtenido de la fracción F2.4	49
Tabla 5. Curva estándar de ácido 4-hidroxibenzoico.	51
Tabla 6. Compuestos encontrados en la fracción de acetato de etilo y tiempos de retención en CLAR.	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus comprende un grupo de padecimientos metabólicos. Su característica principal es una hiperglucemia constante, producto de defectos en la secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas, en la acción que la insulina tiene en sus tejidos sensibles, o ambas (Gerich, 2000).

La insulina tiene como función primaria permitir la entrada de glucosa que se encuentra en la sangre al interior de las células, para su utilización como fuente de energía y como sustrato para almacenar energía de distintas formas, según el tejido. Cuando la glucosa circulante no es internalizada a las células, se produce un estado paradójico en donde los niveles de glucosa se acumulan en sangre y son elevados, sin que las células pueden producir suficiente energía para llevar a cabo sus funciones.

La diabetes es una enfermedad metabólica, sistémica y crónico-degenerativa. La hiperglucemia crónica se considera como la responsable de los daños y disfunciones a largo plazo, debido al aumento en el estrés generado por la fricción en vasos sanguíneos, autooxidación de glucosa, o por otras vías inducidas por la misma hiperglucemia, como incremento en la actividad de ciclooxigenasa o autooxidación de productos finales de glicación avanzada. El daño vascular posteriormente puede agravarse en falla orgánica en ojos, riñones, nervios y corazón, por lo que las personas que padecen diabetes tienden a presentar disminución de su calidad de vida derivada de la enfermedad (Alam et al, 2014; Hotamisligil, 2006).

Los mecanismos por los cuales se acumula daño son variados; anomalías en la señalización celular, expresión génica y regulación de la biología y fisiología celular. Aparentemente, estas anomalías operan simultáneamente durante el desarrollo de las complicaciones vasculares. Algunos de estos mecanismos pueden estar activos, preferencialmente en el tejido vascular de un órgano, pero generalmente son relevantes en el desarrollo de complicaciones multiorgánicas (Rask-Madsen & King, 2013) .

1.2 Prevalencia de la diabetes mellitus

La Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó para el año 2019 la prevalencia del padecimiento a nivel mundial en 9.3 por ciento, es decir, 463 millones de adultos, y se calcula que aumente a 578 millones para 2030 y a 700 millones para 2045, con una frecuencia de 10.9 por ciento (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

La proporción es mayor en la población urbana que en la rural, esto posiblemente por el estilo de vida de menor actividad física y de mayor consumo de alimentos procesados con alto contenido calórico dentro de la población urbana. Se sabe que una de cada dos personas que tiene diabetes, no sabe que la padece. La mortalidad reportada en el mundo en 2019 fue de 4.2 millones de personas y el gasto estimado fue de 760.3 mil millones de dólares, el cual se prevé aumentará a 845 mil millones de dólares para 2045 (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en 2018 había 82 767 605 personas de 20 años y más, de las cuales, 10.32% reportaron un diagnóstico previo de diabetes mellitus. Por sexo, 13.22% (5.1 millones) de las mujeres de 20 años y más disponían de este diagnóstico y 7.75% (3.4 millones) en los hombres de 20 años y más. Es decir, la enfermedad está presente con mayor frecuencia en las mujeres que en los hombres (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018).

Se ha reportado un incremento del diagnóstico de la enfermedad conforme aumenta la edad de las personas; a nivel nacional poco más de una cuarta parte de la población de 60 a 69 años (25.8%) declaró diagnóstico previo de diabetes, lo que representa 2.3 millones de personas. En el caso de las mujeres en este grupo de edad, se presenta la prevalencia más alta, con 35.6% (1.4 millones). Es en los hombres del grupo de 70 y más años donde se concentra la prevalencia más alta, del 18.4% de casos de diagnóstico previo de diabetes (714 mil personas) (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018).

En el año 2020, fue la tercera causa de muerte en México (13.9%), después de enfermedades del corazón (20.2%) y de COVID-19 (18.5), siendo el número de

muerdes más alto que en años anteriores (INEGI, 2021). Según la ENSANUT 2018, hay una prevalencia de casos conocidos de 10.3%, y hoy en día posiblemente se encuentre cercano o superior al 15%. A nivel mundial, México ocupa el sexto lugar entre los países con mayor número de personas con diabetes mellitus (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018).

1.3 Metabolismo y control de glucosa en el organismo

En individuos saludables los niveles de glucosa en sangre son regulados por distintos tipos celulares y distintas vías, manteniendo los niveles de glucosa en sangre de 70 a 100 mg/dl en ayunas y de menos de 140 mg/dl después de la ingesta de alimentos. En individuos diabéticos oscilan de 126 a más de 200 mg/dl (American Diabetes, 2015).

Uno de los principales órganos en regular el metabolismo de glucosa es el páncreas. Por ello, es de los órganos que presentan mayor daño en pacientes con diabetes severa. Sin embargo, existen otros órganos implicados en el metabolismo de carbohidratos que tienen una participación significativa en la fisiopatología de la enfermedad, como el hígado, el tejido adiposo y el músculo.

1.3.1 Páncreas

Cuando la concentración de glucosa plasmática es superior al valor normal (5 mM o 90 mg/dL), las células beta pancreáticas captan rápidamente el monosacárido mediante la proteína transportadora de glucosa GLUT-2. La elevada tasa constante de transporte propia de este acarreador permite la entrada de glucosa siguiendo una cinética lineal y no saturable en condiciones fisiológicas. En el interior de la célula, la glucosa, por acción catalítica de la glucocinasa, se convierte inmediatamente en glucosa-6-fosfato, que sigue la vía glucolítica. La activación de esta ruta favorece la entrada de calcio a las células pancreáticas a través de los canales situados en la membrana plasmática y, como consecuencia, la liberación de insulina por exocitosis (Ashcroft & Rorsman, 2012).

Una vez en el torrente sanguíneo, la insulina se une a sus receptores específicos presentes en la membrana plasmática de células de tejidos sensibles a la acción de

la insulina, como lo son el tejido adiposo y el músculo esquelético, principalmente. Los receptores de insulina son proteínas que atraviesan la membrana plasmática y poseen actividad de tirosina-cinasa, a las que se une la insulina para iniciar una cascada de señalización que regula la transcripción de genes específicos, síntesis de proteínas y actividad de enzimas citosólicas (Rosengren et al., 2012).

Por otra parte, en el páncreas se da la regulación de la glucosa por medio de la secreción de glucagón, que se une a receptores específicos en hepatocitos y adipocitos, que a su vez se acoplan a proteínas G heterotriméricas. Esto activa la cascada de señalización del adenilato ciclasa, enzima asociada con la membrana plasmática que cataliza la transformación de ATP en AMPc, segundo mensajero que, al unirse a algunas proteínas citosólicas, modula su actividad biológica. El glucagón se secreta cuando los niveles de glucosa en sangre comienzan a bajar, produce un aumento en la gluconeogénesis y tiene efecto en el hígado, permitiendo que el glucógeno ahí almacenado pueda ser utilizado. El páncreas es el órgano esencial para el control de la glucemia, haciendo posible el mantenimiento constante de la concentración de glucosa en sangre. Esta función la desempeña a través de modificaciones en la relación de concentraciones plasmáticas de insulina y glucagón que el propio órgano biosintetiza y secreta (Roden, 2016).

1.3.2 Hígado

La mayor parte de los carbohidratos consumidos en la dieta acceden al hígado a través de la vena porta; los hepatocitos captan estos nutrientes, en mayor o menor cantidad, dependiendo de factores como la dieta y el intervalo de tiempo entre cada ingesta. La elevación de la concentración de glucosa en plasma y la consiguiente liberación de insulina por parte del páncreas, motiva en el hígado la activación de síntesis de glucógeno, glucólisis y transformación del piruvato generado en acetil coenzima A. La insulina favorece la captación de la glucosa por las células y el almacenamiento de su exceso en forma de glucógeno y estimula los procesos que hacen posible la transformación del azúcar en lípidos de reserva (Mohamed et al., 2016).

El hígado también juega un papel importante en la regulación de los niveles de glucosa, se encarga de almacenarla en forma de glucógeno, para que pueda ser utilizado en caso de que sus niveles plasmáticos descieran. Después de la ingesta de alimentos, el hígado es capaz de incorporar glucosa proveniente de los alimentos gracias al transportador de glucosa GLUT-2, para ser convertida rápidamente en glucógeno por medio de la fosforilación por la glucocinasa a glucosa-6-fosfato y, posteriormente, en glucosa-1-fosfato por la fosfoglucomutasa; la UDP-glucosa pirofosforilasa o uridil transferasa convierte este producto en UDP-glucosa para que la enzima glucógeno sintasa acople a las moléculas resultantes sobre un primer de glucógeno, de manera ramificada. De manera inversa, el glucógeno sufre degradación, generando glucosa que saldrá del hepatocito a la sangre para mantener niveles de glucosa plasmática dentro de los límites normales. La acción y translocación de GLUT-2 es independiente de la acción la insulina, a diferencia de GLUT-4, que se encuentra más abundantemente en tejidos sensibles a la insulina como tejido adiposo y músculo esquelético (Yan, Zhang, Zhang, & Zheng, 2016).

1.3.3 Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Las señales que modulan la adaptación frente a un cambio en la cantidad y tipo de sustrato energético, provienen tanto del medio externo como del ambiente interno. Dichas señales ejercen su efecto a través de distintos mecanismos celulares. El más conocido involucra sistemas de transducción mediados por receptores mensajeros intracelulares que inducen cambios en la actividad de enzimas de las rutas metabólicas responsables de la homeostasis energética. En el caso de tejidos como músculo esquelético y tejido adiposo, llevan a cabo su regulación por medio de diversos factores de transcripción. Entre ellos, la superfamilia de receptores nucleares PPAR (receptores activados por proliferadores de peroxisomas), regulan los efectos a nivel del control de la expresión génica de factores implicados en el metabolismo, adipogénesis, lipogénesis y en la respuesta inflamatoria, como el transportador de glucosa 4 (GLUT-4), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP-1), acetil coenzima A, lipoproteín-lipasa (LPL), proteína de unión a ácidos grasos (FABP-4), entre otros (Lee et al., 2016).

Dada la participación que tienen los PPARs sobre el metabolismo, se sugiere que estos, a través de sus genes expresados, establecen un balance energético entre la energía gastada y la almacenada ya que, por un lado, los PPARs se encargan de regular el almacenamiento de energía en forma de glucosa y, por otro, también regulan la combustión de la energía almacenada, el metabolismo lipídico, la gluconeogénesis y la termogénesis. Se ha reportado que, en casos patológicos como la obesidad, este balance energético se pierde y se favorece la actividad de PPARs que favorecen el almacenamiento de energía (Uauy et al., 2000).

Los PPARs muestran una distribución tisular amplia, aunque su patrón de expresión es característico de cada isoforma. Se conocen 4 isoformas; α , β , γ y δ , en donde PPAR α está relacionado con procesos de lipólisis y oxidación de ácidos grasos; PPAR β se encuentra expresado de manera ubicua, con mayor expresión en músculo esquelético, tejido cardíaco y cerebelo; PPAR γ se encuentra predominantemente en tejido adiposo blanco y músculo esquelético. Se conocen de manera más detallada las funciones de la isoforma α , que estimula la oxidación de ácidos grasos en tejidos que característicamente utilizan dichos sustratos energéticos, como hígado, corazón, riñones y tejido adiposo pardo, y la isoforma γ , que regula la diferenciación de células precursoras de adipocitos y favorece acumulación de triglicéridos en ellas (Gross, Pawlak, Lefebvre, & Staels, 2016).

1.3.4 Tejido adiposo

El tejido adiposo es por excelencia un reservorio de energía. En este tejido, en respuesta a la elevación de glucosa post-prandial, la insulina promueve el depósito de glucosa en forma de triglicéridos, los cuales son posteriormente utilizados como sustrato energético en períodos prolongados de ayuno, en donde los niveles de glucosa en sangre disminuyen. Por ello, el tejido adiposo es considerado también un órgano relacionado con la regulación de glucosa que permite que sus niveles en sangre permanezcan relativamente estables durante el día. Además, también es un tejido con actividad endócrina, productor de adipocinas, moléculas que influyen directamente sobre los mecanismos productores de insulinoresistencia (leptina, adiponectina, TNF- α , resistina, entre otras) y de disfunción insular. De igual manera,

la producción controlada y combinada de adipocinas y hormonas de los islotes pancreáticos, como insulina y glucagón, establecen una compleja red de moduladores del balance energético del organismo que controlan varios procesos, como el metabolismo de lípidos, el sistema inmune y la homeostasis vascular (De & De Berrazueta, 2007).

En casos patológicos de obesidad, en donde el desbalance energético conlleva a trastornos metabólicos, la manifestación más típica es la resistencia de tejidos periféricos a la acción de insulina, principalmente músculo esquelético y tejido adiposo que, en etapas avanzadas, conduce a la diabetes mellitus tipo 2. Dada la asociación observada entre obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, la búsqueda de un nexo molecular entre estas condiciones suscita gran interés, de modo que se ha encontrado resistencia a la insulina asociada a mutaciones en proteínas como receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2, fosfatidilinositol-3-cinasa y PPAR γ (Agarwal, Yadav, & Chaturvedi, 2016).

La hipótesis de la función de PPAR γ en la respuesta a insulina es avalada por el efecto de las drogas derivadas de las tiazolidinedionas (TZD) y otros agonistas de PPAR γ , ya que estas drogas mejoran la sensibilidad a la insulina. Se ha determinado que la activación de PPAR γ por las TZD estimula la transcripción del gen que codifica para el transportador de glucosa a GLUT-4, el cual se expresa mayoritariamente en tejidos que son sensibles a insulina, como lo son el tejido adiposo y el músculo esquelético. Así mismo, PPAR α es considerado blanco terapéutico de algunos fármacos que son utilizados para el descenso de los lípidos, tal es el caso del bezafibrato, que por su acción agonista de PPAR α promueve la expresión de genes importantes en el metabolismo de lípidos, como la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) y acil coenzima A sintetasa (ACSL) (Suzawa et al., 2003).

1.3.5 Músculo esquelético

El músculo juega un rol central en la regulación del metabolismo de glucosa de todo el cuerpo. Debido a su masa, es el principal tejido responsable de ingresar glucosa dependiente de insulina, captando más del 80% de glucosa de todo el cuerpo. Bajo

condiciones de ayuno, el músculo es responsable de aproximadamente el 10% de captación de glucosa de todo el cuerpo, pues el sistema nervioso central tiene prioridad en la entrega de glucosa. Sin embargo, cuando la glucosa circulante incrementa, el músculo se vuelve el tejido más importante consumidor de glucosa sanguínea. Los niveles intracelulares de glucosa no cambian, puesto que es rápidamente metabolizada por el músculo. Las rutas metabólicas para apoyar el metabolismo del músculo esquelético dependen del tipo y función de las fibras presentes. A diferencia del hígado, el músculo no es capaz de proveer de glucosa a la circulación sanguínea, debido a la ausencia de glucosa-6-fosfatasa, sin embargo, es capaz de proveer al hígado de sustratos que pueden convertirse en glucosa, como lactato, piruvato y alanina (Li et al., 2016).

Se ha observado por microscopía electrónica y anticuerpos de transportadores específicos, que los transportadores GLUT-4 experimentan una translocación a la superficie del sarcolema, así como a la membrana de los túbulos T, mientras que los transportadores GLUT-1 pueden estar involucrados en el transporte basal de glucosa en ausencia de insulina y parecen ser más abundantes en la membrana plasmática del músculo esquelético humano (Friedman, 2002).

1.4 Mecanismos por los cuales se produce daño celular debido a la hiperglucemia.

Los distintos mecanismos que contribuyen a acumular daños que posteriormente incrementarán el riesgo de complicaciones son los siguientes:

1.4.1 Vía de los polioles

En esta vía se dan modificaciones dentro de las células en la cantidad de unidades hidroxilo presentes en la glucosa. En la vía del sorbitol, la glucosa es transformada a sorbitol y posteriormente en fructosa por medio de la enzima aldosa-reductasa. Cuando la vía de los polioles se incrementa, la aldosa-reductasa debe reducir a nivel celular los aldehídos que causan toxicidad a alcoholes inactivos. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia, esta enzima reduce la glucosa a sorbitol, que luego se oxida a fructosa. Durante este proceso la enzima consume NADPH e incrementa el estrés oxidativo intracelular, a la vez que la fructosa incrementa la osmolaridad intracelular (Rehman & Akash, 2017).

El aumento de sorbitol y fructosa provocan la actividad osmótica intracelular y la deficiencia de mio-inositol. A su vez, la acumulación de sorbitol en el interior de la célula produce que se retenga agua por el incremento en la osmolaridad, alterando la función celular en los tejidos que llevan a cabo esta vía metabólica, como son el cristalino, el riñón, los vasos sanguíneos y los nervios, de ahí que sean los más afectados con este padecimiento (Rehman & Akash, 2017).

Las concentraciones de mioinositol disminuyen la síntesis de fosfatidilinositol, provocando una anomalía en la proteína cinasa C (PKC) y en la bomba sodio-potasio-ATPasa, alterando la función celular y la conducción nerviosa, fenómenos íntimamente asociados a las neuropatías periféricas que se presentan comúnmente como parte de las complicaciones (Rehman & Akash, 2017).

1.4.2 Proteína cinasa C (PKC)

La proteína-cinasa C o PKC se activa por la hiperglucemia y afecta la expresión de algunos genes; disminuye eNOS de efecto vasodilatador, endotelina-1 de efecto vasoconstrictor, factor de crecimiento transformador β que causa oclusión en capilares y PAI-1 que causa oclusión vascular, NF κ B de efecto proinflamatorio y aumento de las NADPH oxidasas que generan especies reactivas de oxígeno (Ighodaro, 2018).

1.4.3 Formación de productos de glicación avanzada

Con la abundancia de glucosa en sangre, la reacción entre azúcares y proteínas, lípidos y ácidos nucleicos es más acelerada, de modo en que se dan modificaciones en dichas moléculas por reducción de azúcares. Esto recibe el nombre de glicosilación no enzimática (GNE) o glicación y resulta en la formación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs). Estos AGEs dañan las células por: a) modificación de proteínas intracelulares, incluidas proteínas de regulación de genes de transcripción, modificación de moléculas extracelulares, modificando las señales entre matriz extracelular y la célula, modificando proteínas circulantes como la albúmina y estas proteínas modificadas pueden activar el receptor de AGE, produciendo citocinas inflamatorias y factores de crecimiento que contribuyen a la patología vascular (Ighodaro, 2018).

Algunas de las consecuencias relevantes de esto es la alteración del colágeno tipo IC y algunas otras proteínas de la matriz extracelular, que ocasionan engrosamiento de las membranas basales; hemoglobina glicosilada que aumenta la afinidad por el oxígeno y altera la respuesta a 2,3-difosfoglicerato (Fiorentino et al., 2013)

1.4.4 Aumento de la actividad de la vía de la hexosamina

Los niveles elevados de glucosa dentro de la célula son estabilizados por medio del metabolismo de glucosa por la vía glucolítica. Parte de uno de los intermediarios, la fructosa-6P. Sigue la vía en la cual la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa convierte la fructosa-6P en glucosamina-6P y finalmente a UDP, que toma residuos de factores de transcripción de la serina y treonina, fosforilándolos y ocasionando cambios en genes de expresión dañinos para los vasos sanguíneos (Kang & Yang, 2020).

1.4.5 Alteraciones hemorreológicas

La viscosidad de la sangre incrementa en las personas que padecen diabetes disminuye también la deformabilidad de los hematíes y se incrementa la agregación plaquetaria, por lo que se da un estado de hipercoagulabilidad que facilita el desarrollo de macroangiopatía (Verbovoy et al., 2019).

1.4.6 Estrés oxidante

La capacidad de eliminación de radicales libres está disminuida por una alteración y disminución de otros mecanismos de protección oxidativa endógena. Esto hace que se establezca un estrés oxidativo que deriva en daño y disfunción vascular, incluida la reducción de vida media o inactivación del óxido nítrico, alteración de la actividad de óxido nítrico sintasa, liberación de prostanoïdes vasoconstrictores y vasoconstricción del lecho vascular (Rehman & Akash, 2017).

1.5 Clasificación de la diabetes

Según su ontología, la diabetes puede clasificarse en distintos tipos.

1) Diabetes mellitus tipo 1 (DT1): Se piensa que es provocada por la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas y la consecuente deficiencia o incluso ausencia en la secreción de insulina. Anteriormente era conocida como “diabetes

juvenil”, puesto que su diagnóstico es más común en etapas tempranas del desarrollo y los síntomas aparecen rápidamente. No tiene relación con la dieta o estilo de vida y es irreversible. También es conocida como diabetes insulino-dependiente, ya que el manejo de los niveles de glucosa en sangre se controla con insulina exógena (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014).

2) Diabetes mellitus tipo 2 (DT2), en este tipo las células β del páncreas tienen una producción y secreción de insulina insuficiente y la respuesta a la insulina por parte de los tejidos sensibles está disminuida; la señalización de la hormona puede ser defectuosa. La respuesta a la insulina está disminuida provocando un estado de resistencia a la insulina. Durante este estado, la insulina es inefectiva, lo cual inicialmente es compensado por un incremento en la producción de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa, pero, eventualmente, la producción de insulina disminuye, resultando en este tipo de diabetes. Los niveles altos de glucosa se pueden manejar a través de terapia farmacológica, pérdida de peso, aumento en la actividad física y alimentación balanceada, reduciendo el riesgo de complicaciones derivadas de la patología e incluso evitando que empeore. Representa aproximadamente el 90% de todos los casos de diabetes. Se conocen diversos factores que incrementan el riesgo de presentar esta patología. El riesgo incrementa a partir de los 40. El sobrepeso o la obesidad, especialmente la obesidad central y el historial familiar también son factores de riesgo. Cada vez es más común ver esta patología en personas más jóvenes debido a los niveles de obesidad que van en aumento, la inactividad física y las dietas hipercalóricas (Koeck et al., 2015).

3) Diabetes gestacional, caracterizada por un periodo de hiperglucemia temporal. Aunque puede aparecer durante cualquier período del embarazo, generalmente afecta mujeres embarazadas durante el segundo y tercer trimestre. Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA), afecta al 7% de las mujeres embarazadas, que no han sido afectadas por la diabetes anteriormente. Tanto la mujer embarazada como su producto tienen un riesgo elevado de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en el futuro y deberán de tener un control de la glucosa que incluya una alimentación balanceada y mantenerse físicamente activa. En este tipo

de diabetes, la causa está en los cambios físicos y hormonales que el cuerpo de la persona gestante experimenta, en donde puede haber cambios en la efectividad de la insulina en los tejidos diana. En ocasiones la producción de insulina es insuficiente para compensar este fenómeno y provoca incrementos en la glucosa en sangre. Aunque no se puede prevenir, se puede reducir el riesgo controlando el peso, llevando una dieta balanceada y manteniendo actividad física antes del embarazo (Barbour et al., 2007).

4) Otros tipos de diabetes, causada por otras condiciones y clasificada según su posible etiología. Como ejemplos se tiene la diabetes monogénica, que consiste en una mutación genética en un gen dominante autosomal, o la diabetes secundaria, que es causada por alguna complicación que afecte el páncreas o cause disturbios hormonales, provenientes de otra enfermedad o del uso de drogas, como los corticosteroides (Dhiman et al., 2012).

De los distintos tipos, la DT2 representa del 90-95% de los casos de diabetes, en donde la mayoría de los pacientes padecen obesidad, probablemente una de las causas del desarrollo de resistencia a la insulina. Este tipo de diabetes frecuentemente permanece sin diagnóstico por años, puesto que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente en etapas tempranas y a menudo no es lo suficientemente severa para dar los síntomas clásicos de diabetes. Sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar problemas vasculares.

Este tipo de diabetes está dado por diversos factores, dentro de los que destacan la predisposición genética y algunos factores como la mala alimentación, la poca actividad física y estilo de vida sedentario, tabaquismo temprano que puede condicionar entre otros problemas, a la resistencia a la insulina, y el riesgo que existe para desarrollar este tipo de diabetes que incrementa con la edad (American Diabetes, 2015).

Dentro de la alimentación, encontramos que el consumo frecuente de bebidas azucaradas, alimentos con contenido calórico alto, ricos en grasas saturadas y sustancias alcohólicas, elevan la prevalencia de obesidad, la cual está íntimamente ligada con el desarrollo de esta (Khavandi et al., 2013).

Entre las complicaciones a largo plazo que se pueden presentar por el padecimiento de diabetes, incluyen retinopatías con posible pérdida de la visión, nefropatía y falla renal, neuropatía periférica con riesgo de presentar úlceras en los pies y en el peor de los casos amputaciones e incrementar el riesgo de padecer aterosclerosis y accidentes cerebrovasculares, así como hipertensión, todo esto por lo general provocado por daños a la micro y macrovasculatura (Olokoba, Obateru, & Olokoba, 2012).

Los síntomas entre estos tipos de diabetes son similares, entre ellos la polidipsia o sensación de sed abundante, la poliuria o excesiva producción de orina, el cansancio persistente, pérdida de peso, picor genital y visión borrosa (American Diabetes Association, 2010).

1.6 Complicaciones vasculares derivadas de diabetes mellitus

Las complicaciones vasculares son principalmente resultado de la hiperglucemia, que puede producir daño a los tejidos por diferentes vías. En respuesta al aumento de estrés oxidante, que se presente como resultado de distintas vías, se da la producción de factores quimiotácticos, como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), moléculas de adhesión (VCAM-1) y factores de crecimiento que favorecen la transmigración de monocitos al subendotelio vascular, en donde se transforman en macrófagos, captan lipoproteínas de baja densidad modificadas (LDL) y dan lugar a las células espumosas, lo cual representa la lesión inicial de la aterosclerosis. El microambiente inflamatorio que produce la diabetes está íntimamente relacionado con el desarrollo de estas afectaciones (Dymkowska, 2016).

En la diabetes mellitus existe un estado que predispone a anomalías en los sistemas de coagulación y fibrinólisis, así como de funcionalidad plaquetaria, lo cual favorece el proceso trombótico. La glicosilación no enzimática afecta la antitrombina III, disminuyendo su actividad. La adhesividad al endotelio vascular y agregabilidad plaquetaria también están aumentadas, lo que incrementa el riesgo de desarrollar trombosis a nivel micro y macrovascular. Por otro lado, el paciente diabético

presenta también disminución del tamaño arterial a nivel coronario, lo cual favorece la oclusión. En arterias pequeñas se ha encontrado un remodelado hipertrófico hacia adentro; estas dos remodelaciones contribuyen al daño vascular a nivel de los órganos que comúnmente encontramos dañados en esta enfermedad (Verbovoy et al., 2019).

1.7 Terapéutica en el tratamiento de la diabetes y patologías asociadas.

La resistencia a la insulina es una condición presente que caracteriza a la DT2. Puede verse como un fenómeno molecular y genético que tiene un papel muy importante en la fisiopatología de dicha enfermedad. Es la base de otras patologías como la hipertensión, dislipidemia, intolerancia a la glucosa, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, junto con la DT2, por lo que resulta clave corregir o prevenir la resistencia a la insulina. En los últimos años se ha generado mucha información acerca de la etiología de la resistencia a la insulina con el uso de modelos animales, en donde la acción de la insulina ha sido modulada en distintos modelos experimentales (Barbour et al., 2007).

En la práctica clínica los agentes hipoglucémicos orales pueden ser categorizados en 5 grupos generales: 1) secretagogos, 2) sensibilizadores a la insulina, 3) biguanidas, 4) inhibidores de α -glucosidasas e 5) inhibidores de alfa-amilasas. Estos medicamentos son agentes hipoglucemiantes orales que han sido utilizados actualmente para el control de la hiperglucemia, sin embargo, no suprimen otras complicaciones asociadas con la enfermedad, a la vez que algunos de ellos presentan efectos secundarios o citotoxicidad. De manera general, se pueden ubicar dos grandes efectos de estos agentes sobre la glucemia. El primero de ellos induce el descenso de la concentración de glucosa (hipoglucémico); en la mayoría de las ocasiones se incluyen mecanismos pancreáticos. El segundo evitará un aumento importante en la concentración de glucosa (antihiperglucémico), mediante mecanismos diversos, la mayoría de ellos extra-pancreáticos. Por lo tanto, resulta de suma importancia descubrir nuevos agentes con propiedades hipoglucémicas o antihiperglucémicas. Una de las fuentes importantes de nuevos fármacos, o de

moléculas que sirvan de base para la síntesis de nuevos compuestos es la especie vegetal *Cucurbita ficifolia*.

2. ANTECEDENTES

Cucurbita ficifolia, conocida también como “chilacayote”, es una de las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de algunos padecimientos, entre ellos, la diabetes. Se han llevado a cabo estudios en diversos modelos para determinar sus efectos. En el 2001, Acosta-Patiño y colaboradores (Acosta-Patino et al., 2001) administraron a pacientes con DT2 un extracto acuoso crudo de *C. ficifolia* (4 ml/kg) y observaron un descenso significativo en los niveles de glucosa después de 3 horas de haber tomado el extracto. En 2002, Alarcón y colaboradores (Alarcon-Aguilar et al., 2002) administraron por vía intraperitoneal y oral un extracto acuoso (500 mg del jugo de *C. ficifolia*/Kg peso corporal en un modelo agudo en ratones sanos y diabéticos, en donde observaron un descenso significativo en la glucemia (disminución de hasta 50 mg/dl). Este efecto también se observó en ratas a las cuales se les indujo diabetes experimental con alloxana, bajo un esquema de tratamiento que involucró la administración diaria (500 mg/Kg) vía oral, del jugo de *C. ficifolia* durante 14 días, en donde se observó una disminución de glucosa de manera progresiva.

Desde el punto de vista fitoquímico, Xia y Wang propusieron al D-quirositol (D-QI) como la molécula responsable del efecto hipoglucémico del fruto de *C. ficifolia*, mismo que fue utilizado para estandarizar un extracto acuoso para ser evaluado en un modelo murino de diabetes experimental. La administración oral del extracto acuoso (10 y 20 mg de extracto de *C. ficifolia*, con base en el contenido de DQI/kg) durante 30 días, causó disminución significativa de glucosa en sangre, además de aumentar los niveles de glucógeno hepático, hemoglobina total e insulina plasmática (Xia & Wang, 2006). Estos autores reportaron la presencia del compuesto, pero no se proporciona un análisis fitoquímico.

En otros estudios, el análisis histológico de páncreas de ratones que recibieron el extracto de *C. ficifolia*, reveló un incremento en el número de islotes pancreáticos, proponiendo que las células pancreáticas expuestas a diferentes dosis de *C. ficifolia*

aumenta su proliferación, así como la producción y liberación de insulina, lo cual podría explicar el efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* (García-González, 2011). En el 2012, Hernandez-Rosado observó que el extracto acuoso aumenta la expresión de PPAR γ y PPAR α , así como de GLUT-2 en hepatocitos HepG2, así como de GLUT-4 y FATP-1 en adipocitos 3T3-L1. Sin embargo, el compuesto D-QI por sí solo no mostró el mismo comportamiento que el extracto acuoso. En el mismo año, Miranda-Perez y col. confirmaron que tanto el extracto acuoso de *C. ficifolia* como D-QI, aumenta la expresión de insulina y Kir6.2, así como un aumento de calcio intracelular y en la secreción de insulina en células RINm5F (Miranda-Perez et al., 2016).

En el 2016, administramos el extracto acuoso de *C. ficifolia* estandarizado con base en su contenido de salicina, compuesto identificado por García-González y col. Este extracto fue administrado en un sistema de co-cultivo de adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7, utilizado como aproximación farmacodinámica a un modelo de tejido adiposo con gran infiltración de macrófagos, condición presente en patologías como la obesidad, y que se encuentra íntimamente ligada al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes. En este estudio se observó que el tratamiento con el extracto acuoso de *C. ficifolia* redujo la liberación de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10, así como elevó la expresión de GLUT-4 (Rosiles, 2016). Adicionalmente, con el antecedente del aumento de transportadores de glucosa en hígado y tejido adiposo, así como mayor deposición de glucógeno en hígado, se logró demostrar, en una prueba de tolerancia a la glucosa oral en modelo murino, efecto antihyperglucemiante de la fracción de acetato de etilo de *C. ficifolia*.

A pesar de que se ha sugerido que D-QI es el compuesto responsable de la actividad hipoglucemiante de *C. ficifolia*, se ha observado que sus efectos no son los mismos que los resultantes con el extracto acuoso. En algunos estudios se han observado concentraciones muy bajas del mismo compuesto con efectos biológicos importantes, aún a pesar de concentraciones nulas de DQI en los extractos. Esto nos ha llevado a plantear la necesidad de encontrar otros compuestos presentes en el extracto que pudieran ser responsables de los efectos benéficos que se han

reportado con la administración del extracto acuoso de *C. ficifolia* e incluso proponer una posible sinergia entre los compuestos presentes, lo cual permita explicar los diversos efectos biológicos que se han descrito hasta ahora.

En suma, el fruto de *C. ficifolia* es comúnmente usado como un agente antidiabético. Existen trabajos en donde se han estudiado algunos de sus efectos. Sin embargo, la molécula responsable de su efecto hipoglucémico aún es desconocida. El presente trabajo está dirigido a determinar las moléculas responsables del efecto hipoglucémico de *C. ficifolia*, así como evaluar dichas moléculas sobre marcadores moleculares clave en el metabolismo de tejido adiposo, hígado, páncreas y músculo.

Los estudios fitoquímicos han denotado un gran avance en el aislamiento y purificación de metabolitos bioactivos. El fraccionamiento biodirigido representa una estrategia determinante en la obtención de resultados satisfactorios. La gran ventaja de este método es el ahorro en tiempo, ya que sólo se someten al proceso de separación de los extractos que demuestren alguna actividad biológica en particular, de lo contrario, se tendría que invertir mucho tiempo en el aislamiento de todos los componentes presentes en los extractos.

3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el sedentarismo son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina, que cada vez están presentes en una mayor proporción de la población y en etapas más tempranas. La obesidad, predominantemente abdominal, lleva a una mayor secreción de ácidos grasos libres y producción de citocinas proinflamatorias, factores que autoperpetúan la inflamación y llevan a estados de inflamación crónica, misma que juega un importante papel en la resistencia a la insulina. A pesar de que existen fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2 y de patologías asociadas al síndrome metabólico, en la actualidad existe una revaloración de las fuentes naturales para la obtención de nuevos medicamentos, lo cual se ha justificado por razones económicas, de eficacia y seguridad, así como de costumbres. Más de 800 plantas han sido reportadas con potencial terapéutico en el control de la DM. Sin embargo, pocas han sido evaluadas

médica y científicamente para validar su eficacia y menos son las plantas que cuentan con sustento molecular que explique sus mecanismos de acción.

Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (OMS, 2008), por lo que es importante el estudio de las especies utilizadas y el conocimiento de los compuestos que poseen, así como una aproximación a los mecanismos por los cuales tienen sus efectos para asegurar tanto su seguridad como su efectividad. En este sentido, resulta necesario llevar a cabo estudios fitoquímicos sobre *C. ficifolia*, además de ensayos biológicos en tipos celulares involucrados en la regulación y metabolismo de glucosa.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles es la o las moléculas responsables de la acción hipoglucemiante o antihiperoglucemiante de *C. ficifolia* y qué efectos tienen sobre marcadores moleculares clave en células involucradas en la regulación del metabolismo de glucosa?

5. HIPÓTESIS

Los extractos de *C. ficifolia*, contienen moléculas con acción hipoglucemiante o antihiperoglucemiante que modificarán la dinámica molecular de los principales tipos celulares involucrados en el metabolismo de carbohidratos.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar el o los compuestos responsables de la acción hipoglucemiante o antihiperoglucémica de *C. ficifolia* y evaluar su efecto en modelos celulares importantes en la fisiopatología de la diabetes mellitus.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un ensayo biodirigido para la identificación de moléculas con acción hipoglucemiante de *C. ficifolia*.
2. Evaluar los compuestos identificados en la fracción activa sobre la producción de insulina en células β -pancreáticas.
3. Determinar el efecto de los compuestos identificados sobre la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 y del factor de transcripción PPAR γ en mioblastos C2C12.
4. Evaluar el efecto de los compuestos sobre la acumulación de glucógeno en la línea celular HepG2.
5. Determinar mediante un ensayo de acoplamiento molecular la capacidad agonista de las moléculas identificadas sobre los receptores PPAR γ y GPR40.
6. Evaluar la capacidad hipoglucemiante/antihiperoglucemiante de los compuestos identificados en un modelo diabético *In vivo*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención del material vegetal

La colecta del material vegetal se realizó en la localidad de San Bartolo el Chico, Acolman, Estado de México, México, la misma localidad que se ha usado por el grupo de investigación en estudios previos de esta especie vegetal, la cual ya ha sido identificada y cuenta con los registros taxonómicos en el herbario de plantas medicinales del IMSS (Herbario-IMSS-M) que se encuentra en Centro Médico Siglo XXI, IMSS, CDMX, con el voucher no. 11119. Los frutos fueron cosechados en los meses de septiembre-noviembre. Se eligieron frutos maduros de aproximadamente 3-4 kg y con un diámetro de 18-20 cm.

7.2 Preparación de los extractos

El mesocarpio de los frutos maduros, libres de epicarpio y semillas, se rebanó en capas delgadas para su posterior deshidratación a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar. El material vegetal completamente seco se trituró

para la obtención de polvo, con un tamiz de 6 mm de diámetro. Este material seco y pulverizado se dispuso en dos lotes que fueron extraídos por separado por maceración en agua y en acetona, respectivamente (Merck KGaA, 6471 Darmstadt, Alemania), con una relación de 1 L de disolvente/100g de planta seca. La maceración se llevó a cabo por 72 h; la fase líquida fue recuperada cada 24 h y el disolvente de cada extracción se eliminó mediante un proceso de destilación a presión reducida en un rotavaporador provisto de una bomba de vacío (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Alemania), seguido de un proceso de liofilización (en el caso del extracto acuoso) para garantizar la eliminación total del disolvente. Estos extractos se almacenaron a -4 °C hasta el momento de su evaluación biológica o análisis químico. La fracción de acetato de etilo (AcOEtO) se obtuvo por separación líquido/líquido, con partes iguales de extracto acuoso y acetato de etilo, mezclados en un embudo de separación. La mezcla se dejó reposar hasta lograr su separación en dos fases; recuperamos la parte orgánica o fase de acetato de etilo.

7.3 Fraccionamiento químico del extracto más activo

La fracción de acetato de etilo (FAcOEtO) presentó el mayor efecto antihiper glucemiante y fue sometida a un proceso de separación química por cromatografía en columna abierta (400 x 25 mm) empacada con sílica gel 60 (Merck, malla de 70-230) como fase estacionaria. Se utilizó un sistema de gradiente de diclorometano/metanol como fase móvil, empezando con un 100% de diclorometano con aumentos graduales del 5% en la proporción de metanol, hasta que el sistema de gradiente consistió en una mezcla 50:50. El volumen de colecta de cada muestra fue de 250 ml, que fueron concentradas en un rotavapor rotatorio con alto vacío, para obtener 56 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF), y posteriormente reunidas de acuerdo con su similitud química, cinco de las fracciones que están constituidas de la siguiente manera: C1F1 (95:5), C1F2 (95:5), C1F3 (90:10), C1F4 (90:10) y C1F5 (85:15) para su evaluación biológica en modelos *In vitro* e *In vivo*.

Basados en los resultados de las pruebas biológicas, la fracción activa C1F1 fue sometida a separación secundaria en cromatografía de columna abierta (400x25 mm) de sílica gel 60 de fase normal (0.2-0.5 mm, Merck) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó un sistema de gradiente de diclorometano/metanol, empezando con un 100% de diclorometano con aumentos graduales del 5% en la proporción de metanol, hasta que el sistema de gradientes alcanzó en una mezcla 50:50. Las fracciones colectadas fueron analizadas por cromatografía de capa fina y reunidas por sus similitudes químicas. De esta separación destacaron 3 subfracciones por sus características y rendimientos: F1.1, F1.2 y F1.3.

La fracción C1F2 también fue considerada de interés por los resultados obtenidos en las pruebas biológicas, por lo que fue separada por medio de cromatografía en columna abierta bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Posterior a repetidas separaciones, cuatro subfracciones resultaron de interés químico y fueron seleccionadas para ser evaluadas en los modelos biológicos; F2.1, F2.2, F2.3 y F2.4

7.4 Análisis fitoquímico de los extractos y fracciones

Los extractos y las fracciones resultantes de la separación fueron analizados por cromatografía de capa fina. Para ello se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertas de sílica gel 60 F240 (fase normal) o de sílica gel 60 RP-18 F254S (fase reversa) (Merck). La fase móvil para los cromatofolios fase normal consistió en una mezcla de disolventes según la polaridad y las características de la muestra a tratar, entre hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol o etanol, en ese orden de polaridad de menor a mayor. Para los cromatofolios de fase reversa se utilizó como fase móvil una mezcla de diferentes proporciones según la muestra a tratar, de agua y acetonitrilo. Los cromatofolios se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 y 364 nm, tanto antes, como después de ser reveladas. Los reveladores químicos utilizados fueron aplicados directamente con un hisopo a los cromatofolios y posteriormente se secaron en una parrilla a 90°C durante unos segundos. Los reveladores químicos que se utilizaron fueron 4-hidroxibenzaldehído, sulfato cérico, ninhidrina, reactivo de Ehrlich, revelador de flavonoides y solución Dragendorff. Adicionalmente, los

extractos y fracciones fueron sometidos a un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El equipo cuenta con un módulo de separación (Waters, Massachusetts, USA), un detector con arreglo de fotodiodo (Waters, Massachusetts, USA) y para el análisis cuenta con el software Empower Pro. La separación se llevó a cabo con una columna Prevail C-18 (Grace, 150 x 4.6 mm; 5 µm; Columbia, Illinois, USA) como fase estacionaria. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido (0.5 %, solvente A) y acetonitrilo (solvente B) en distintas proporciones; A: B=100: 0 (0-2 min); 90:10 (3-5 min); 85:15 (6-10 min); 70:30 (13-15); 50:50 (15 min); 0:100 (16 a 18 min); 100:0 (19 a 24 min).

7.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Se identificó la composición química de las fracciones F1.1, F1.2 y F1.3 por análisis en cromatografía de gases, acoplada a un detector de masas (CG-EM) (Agilent Technology 6890, California, USA) equipado con un cuadrupolo de impacto de electrón a 70 eV. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna HP-5M de capilar HP 5MS de 25 m de longitud, 0.2 mm i.d., 0.3 µm de espesor de película. La temperatura del horno fue programada a 40°C por 2 min, posteriormente con incrementos de 10°C por min hasta llegar a 260°C durante 20 min. El detector de masas se mantuvo a 200°C y la adquisición de masa se obtuvo en un rango de 20 y 550 Da. La temperatura del inyector y detector fue de 250 y 280°C, respectivamente. Se inyectó 1 µl de muestra a una concentración de 3 mg/ml y helio a un rango de flujo de 1 mL/min como gas acarreador o fase móvil. Cada pico espectrométrico fue comparado con espectros de masa estándares de la librería 1.7 del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología.

7.6 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Algunas subfracciones que mostraron poca complejidad en la composición de su mezcla fueron sometidas a un análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz). Los espectros fueron obtenidos utilizando un equipo Varian INOVA-400 (Varian Co., Palo Alto, CA, USA). Los disolventes utilizados fueron cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (CD₃OD). Se utilizó

tetrametilsilano como control interno y los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm).

7.7 Animales experimentales

Se utilizaron ratones sanos machos (*mus musculus*) de la cepa CD-1 con un peso aproximado de 30 g (± 5) de 8 semanas de nacidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los animales se alimentaron con alimento standard para roedor de la marca Harlan, hidratados con agua *ad libitum* baja en sales. Fueron mantenidos a una temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), a una humedad aproximada de 45-65% bajo condiciones de 12 h de luz blanca y 12 h de oscuridad. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las normas internacionales y nacionales estándar de cuidado y experimentación, incluida la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001, México) y la norma National Institute of Health (NIH). El Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó el experimento de acuerdo con el protocolo (Número de aprobación DCBS.374-2019).

7.7.1 Evaluación del efecto hipoglucemiante de las fracciones obtenidas

Para evaluar el efecto hipoglucémico de las fracciones obtenidas de *C. ficifolia* se realizó un estudio agudo en ratones sanos de la cepa *mus musculus* CD1 machos, de 8 semanas de nacimiento, con un peso promedio de 35 g. Se midió la glucemia en 3 grupos de ratones, a diferentes tiempos (n=5, en cada grupo). La glucemia se midió al inicio (t=0) en ratones con 12 h de ayuno. Posteriormente se administraron los tratamientos por vía intraperitoneal de la siguiente manera: al grupo control se le administró solución salina; a los grupos control positivo se les administró glibenclamida 10 mg/Kg (como control positivo del efecto hipoglucémico), el grupo restante recibió cada una de las fracciones obtenidas por separado. Se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena caudal a los 120, 240 y 360 min, y se realizó la medición de glucemia por medio de la técnica Mut Q-GDH (Accu-Check Performa, Roche, Mainheim, Alemania).

7.7.2 Evaluación del efecto antihiper glucemiante de las fracciones obtenidas

Se realizó un estudio agudo en ratones sanos de la cepa *mus musculus* CD1 machos, de aproximadamente 8 semanas de nacimiento, con un peso promedio de 35 g. La glucemia se midió al inicio (t=0) en ratones con 12 h de ayuno. Se administraron los tratamientos por vía intraperitoneal de la siguiente manera (n=5, en cada grupo): al grupo control se le administró solución salina; a los grupos control positivo se les administró metformina a razón de 150 mg/Kg (como control positivo del efecto antihiper glucemiante). Los grupos experimentales restantes recibieron cada una de las fracciones obtenidas a una dosis exploratoria de 300 mg/kg. Posteriormente se les administró una carga oral (vía intragástrica) de 20 mg/kg de glucosa. Se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena caudal a los 0, 30, 60, 90 y 120 min y se realizó la medición de glucemia por medio de la técnica Mut Q-GDH con el glucómetro (Accu-Check Performa, Roche, Mainheim, Alemania).

7.7.3 Efecto hipoglucemiante y antihiper glucemiante de los compuestos en ratones diabéticos.

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 con un peso aproximado de 35 g (± 8 g). Se les indujo diabetes experimental, administrándoles vía intraperitoneal una solución de streptozotocina (STZ) a una concentración de 137.5 mg/kg, preparada en buffer de citratos a pH 4.5, recién preparado como vehículo. Se formaron 5 grupos (n=7); El grupo Control (testigo) fue administrado con 4 ml/kg de solución salina, el grupo 2 recibió una solución de β -sitosterol a 20 mg/kg, el grupo 3 recibió una dosis de metformina de 150 mg/kg, el grupo 4 recibió una solución de ácido 4-hidroxibenzoico a una concentración de 5 mg/kg y el grupo 5 recibió la fracción de acetato de etilo (FAcEtO) a una concentración de 300 mg/kg. Se realizó la evaluación del efecto hipoglucemiante, así como la evaluación del efecto antihiper glucemiante por medio del estudio de tolerancia a la glucosa oral, como se describió anteriormente.

7.8 Establecimiento de líneas celulares

7.8.1 Cultivo de la línea celular C2C12

Se obtuvo la línea celular comercial C2C12 de ATCC (CRL-1772). Esta línea celular es obtenida de mioblastos de ratón *Mus musculus*. Se mantuvieron con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino al 10% (SFB, GIBCO, 31800-002, Penrose, Auckland, Nueva Zelanda), 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato sódico, 20 µg/L de gentamicina, a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂ y 95% de humedad, sin dejar que llegaran a confluencia. Para llevar a cabo los tratamientos, se sembraron en placas de 6 pozos y en este caso si se llevaron a confluencia.

7.8.2 Cultivo de células RINm5F

Se adquirió la línea celular RINm5F de la American Type Culture Collection (ATCC, CRL-11605, Virginia, USA), la cual proviene de los Islotes de Langerhans del tejido pancreático, de *Rattus norvegicus* y es productora de insulina. Fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, 31800-002, Penrose, Auckland, Nueva Zelanda) con glucosa 11.1 mM, suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (ATCC, Virginia, USA), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 2 mg/ml de gentamicina. Las células se cultivaron a 37°C en botellas de plástico desechables (NUNC Labware & Supplies, USA), con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 2 días, una vez que llegaron a confluencia, para su resiembra se utilizó tripsina al 0.025% en PBS y fueron sembradas en placas de 12 pozos para llevarlas a confluencia y administrar los tratamientos.

7.8.3 Cultivo de células HepG2

La línea celular HepG2 proviene de células humanas de carcinoma hepatocelular, adquirida comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC, HB-8065). Fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM, adicionado con SFB al 10%. Las células se cultivaron a 37°C en botellas de plástico desechables (NUNC Labware & Supplies, USA), con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio fue cambiado cada 2 días, una vez que llegaron a confluencia, para su resiembra se utilizó tripsina al 0.025% en PBS y fueron sembradas en cajas Petri

de 60 mm para cultivo celular. Se llevaron a confluencia y se administraron los tratamientos.

7.9 Ensayos de funcionalidad celular por MTT

Para establecer una concentración segura para los tratamientos, se utilizó el reactivo (-dimetiltiazol-2-il 4,5) -2,5-dihenyltetrazolio o MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en los distintos tipos celulares. Se realizó un ensayo por triplicado de acuerdo con el método de Mosmann (Mosmann, 1983). Se sembraron 5,000 células/pozo en microplacas de 96 pocillos. Cuando las células llegaron al 80% de confluencia, se reemplazó el medio por medio de tratamiento que contenía concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg de las fracciones primarias, secundarias y terciarias, así como de los compuestos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C, y posteriormente se enjuagaron con PBS previamente atemperado. Se prepararon 100 ml de MTT a una concentración de 0.1 mg/ml en una solución de buffer salino de fosfatos (PBS), a la cual se agregó 200 µl por pozo y se dejó incubar durante 3 horas, manteniendo la placa cubierta de la luz. Posterior a las 3 horas de incubación, se enjuagaron con PBS y se agregaron 200 µl de una solución de isopropanol con HCl 40 mM a cada pozo para solubilizar el formazán producido, manteniéndose en agitación durante 20 min. Posteriormente se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de placas (Thermo Scientific, Multiskan FC) a 570 nm. Los datos se expresaron como el porcentaje de células viables después de haber sido tratadas con las distintas concentraciones, en comparación con las células del control que no fueron tratadas.

7.10 Análisis de expresión relativa

Posterior a los tratamientos, se extrajo RNA total de las células con el reactivo TRIzol LS Reagent (Ambion, life technologies, California, USA), se cuantificó la concentración con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y subsecuentemente se sometió a retrotranscripción para la síntesis de DNA complementario (cDNA) por medio del kit ImProm II Reverse Transcription System Kit (Promega Madison, WI, US) a partir de 2 µg de RNA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se

utilizaron random primers a 0.5 µg/µl. Se incubó un volumen total de reacción de 20 µl en el termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) con el siguiente programa de ciclos: desnaturalización a 95°C durante 10 seg, alineamiento a 60°C por 7 seg, elongación a 72°C durante 10 seg, para cada ciclo, con 45 ciclos en total.

Para el análisis de expresión génica, se utilizaron primers específicos de genes de la especie *Mus musculus* y se utilizó el gen constitutivo 36B4 como referencia, la secuencia de estos se muestra a continuación. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% y bromuro de etidio, para la confirmación de los productos.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para expresión génica

Gen	Secuencia	# Acceso GenBank
36B4	F-5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3', R.5'- AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3'	NM 007475.2
GLUT-4	F-5'-GATTCTGCTGCCCTTCTGTC-3', R- 5'-ATTGGACGCTCTCTCTCCAA-3'	NM 009204.2
PPARγ	F-5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3', R- 5'GGCCTTGACCTTTGTTGATGT-3'	NM 011146.1
Adiponectina	F-5'GGCTCTGCTGCCCTTCTGTC-3', R- 5'AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG- 3'	NM009605.4

7.11 Cuantificación de secreción de insulina

Se cuantificó la insulina secretada por las células RINm5F, las cuales fueron cultivadas hasta llegar a una confluencia aproximada del 80% en placas de 24 pozos, e incubadas por 2 h a 37°C con una solución buffer de HEPES - bicarbonato Krebs-Ringer (Miranda-Perez et al., 2016). Las células fueron tratadas con medio libre de suero (grupo control), fracciones, subfracciones y compuestos (grupo experimental) y Glibenclamida (50 µM). El medio de las células fue recolectado y

utilizado para la cuantificación de insulina por medio de un ensayo de enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA) con un kit adquirido comercialmente (ALPCO, 80-INSRT-E01, Salem, New Hampshire, USA.) y fue realizado según las instrucciones del proveedor.

7.12 Cuantificación de glucógeno

Se sembraron 1×10^6 células inicialmente en cada caja Petri de cultivo celular y se llevaron a confluencia. Se administraron los distintos tratamientos (ácido 4-hidroxibenzoico, β -sitosterol, ácido p-cumárico, salicina, ácido 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido gálico) y se incubaron las células durante 24 horas. Posteriormente se lavaron las células en PBS frío y se re-suspendieron en 200 μ l de H₂O MiliQ en una bandeja con hielo. Se homogenizaron rápidamente, pipeteando repetidas veces. Se ebulló el homogenizado celular durante 10 min para la inactivación de enzimas presentes. Se centrifugaron las muestras durante 10 min a 4°C, a 18000 x g en una ultracentrífuga para remover el material insoluble. Se recolectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se realizó una cuantificación de proteína a cada muestra por el método de Bradford. Se utilizó el kit comercial para cuantificación de glucógeno ab65620 de Abcam, siguiendo las instrucciones del fabricante (curva patrón, preparación de muestras, hidrólisis enzimática, desarrollo de color, lectura de densidad óptica).

7.13 Estudios *In silico* de docking molecular

El estudio *in silico* se llevó a cabo en el programa AutoDock versión 4.2.6. Los códigos de proteínas se obtuvieron de la base de datos de Protein Data Bank: 3X1H (resolución 2.3 Å) para PPAR γ . Los cálculos del docking molecular fueron conducidos con AutoDock versión 4.2.6., en donde se automatizó el docking molecular de los ligandos dentro de un diedro flexible dentro del sitio de unión del ligando a la proteína, en donde el programa realiza varias corridas en cada experimento de unión. Cada corrida predice modelos de acoplamiento molecular ligando-receptor. Todas las moléculas de agua fueron retiradas de la estructura cristalográfica y todos los átomos de hidrógeno fueron adicionados. Tanto para las proteínas como para los ligandos fueron asignadas cargas Gasteiger, mientras que

los hidrógenos no polares fueron alineados. Durante el docking, todos los sitios de torsión (permitidos de manera natural) de los ligandos fueron permitidos a rotación. El programa auxiliar Autogrid se utilizó para generar los mapas de grid. Cada grid fue centrado en las coordenadas cristalográficas del sitio de unión a ligando. Las dimensiones del grid fueron 60 x 60 x 60 puntos, con 0.375 Å puntos de separación. El algoritmo genético Lamarckiano fue aplicado como criterio de búsqueda de mejores conformaciones de acoplamiento, utilizando los parámetros estándares del programa. El número de corridas fue 100. Después del docking molecular, todas las posibles conformaciones de acoplamiento fueron clasificadas en grupos con un RMSD (Desviación cuadrática media) menor de 2.0 y rankeadas por la menor energía, representada por un valor de ΔG en Kcal/mol. Todas las soluciones fueron agrupadas y organizadas de acuerdo con los registros representativos de más baja energía. Los programas Discovery Studio, versión 3.5 (Accelrys, Inc) y PyMOL software versión 2.7 fueron utilizados para la visualización 2D y 3D, respectivamente. Todos los protocolos fueron validados a través de un re-docking de las moléculas cocrystalizadas dentro del sitio activo. El RMSD entre las moléculas cocrystalizadas y los experimentos realizados entre las moléculas cocrystalizadas y los experimentos realizados fue <2.0 Å. La validación fue llevada a cabo en las interacciones esenciales formadas entre los residuos de aminoácidos del sitio activo de la proteína y el ligando, indicando que los parámetros del docking molecular pueden reproducir eficientemente las interacciones entre las estructuras cristalográficas de las moléculas y ambos receptores.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba post-hoc de Tukey-Kramer según corresponda. Se utilizó un nivel de significancia del 95%.

9. RESULTADOS

A partir de la extracción de *C. ficifolia* con los distintos disolventes se obtuvieron los siguientes rendimientos en peso seco: 12.3% para extracto acuoso, 4% para extracto acetónico y .2% para la fracción de acetato de etilo.

Se evaluó el efecto hipoglucemiante de las tres preparaciones, administrando los tratamientos tanto por vía intragástrica como por vía intraperitoneal. En el caso de la administración por vía intragástrica, el extracto acuoso disminuyó significativamente la glucemia en el modelo agudo, en donde pudimos confirmar el efecto hipoglucemiante previamente reportado (Román-Ramos et al., 1991), llegando a glucemias similares a las obtenidas con el fármaco hipoglucemiante de referencia glibenclamida, el cual estimula las células β -pancreáticas para liberar la insulina preformada e inhibe glucogenólisis y gluconeogénesis hepática. La fracción de acetato de etilo también tuvo un efecto hipoglucemiante, sin embargo, de menor magnitud que el extracto acuoso. Por último, el extracto acetónico no produjo ningún descenso significativo sobre la glucemia (Figura 1). En la administración vía intraperitoneal, observamos un efecto contrario: el extracto acetónico y la fracción de acetato de etilo a los 120 minutos incrementan la glucemia; sin embargo, a los 240 minutos desciende por debajo de los niveles observados en el control. Glibenclamida y el extracto acuoso mantuvieron el efecto hipoglucemiante mientras que el extracto acuoso continuó descendiendo la glucemia

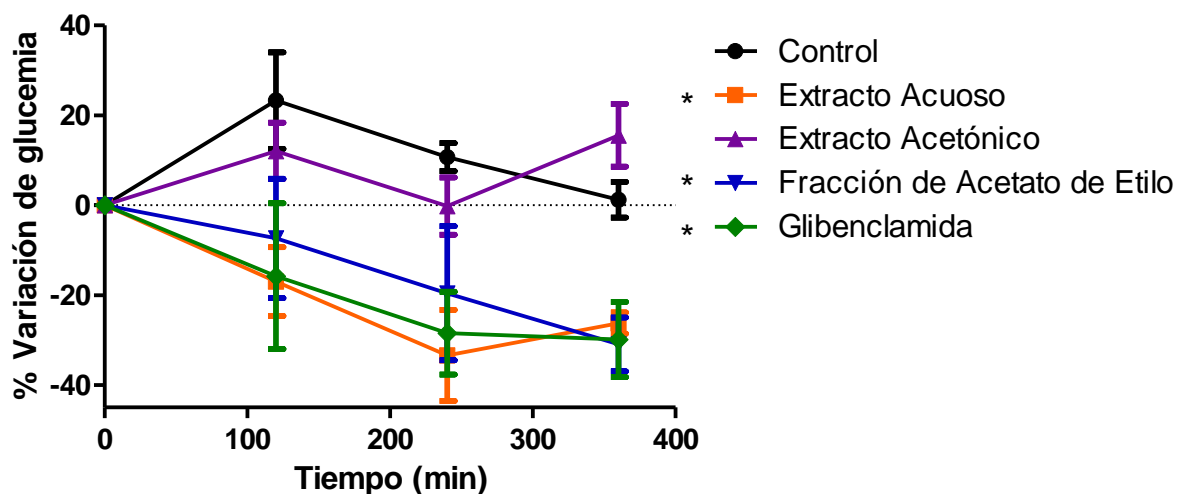


Figura 1. Estudio agudo en ratones CD-1 tratados con extracto acuoso, extracto acetónico, fracción de acetato de etilo a 300 mg/kg y glibenclamida a 10 mg/kg, administrada por vía intragástrica. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

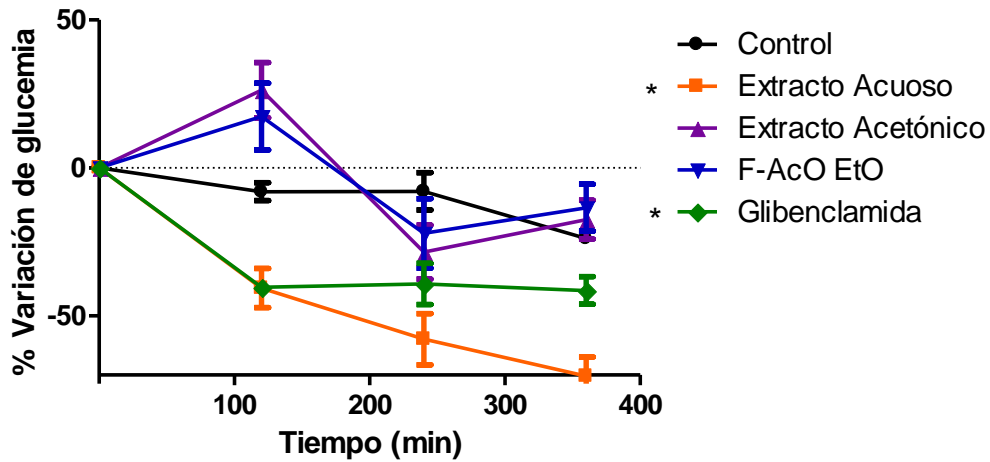


Figura 2. Estudio agudo en ratones CD-1 tratados con extracto acuoso, extracto acetónico, fracción de acetato de etilo a 300 mg/kg y glibenclamida a 10 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

En la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), el extracto acetónico, el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo disminuyeron los niveles de glucosa en comparación con el control. El extracto acetónico y acuoso disminuyeron significativamente la glucemia a los 30 y 60 minutos, inhibiendo el pico hiperglucémico, junto con la fracción de acetato de etilo, siendo 60 y 90 min los niveles más bajos de glucosa con esta fracción. La fracción de acetato de etilo tuvo la menor área bajo la curva de todos los tratamientos, incluso menor que metformina, fármaco antihyperglucemiante de referencia (Fig. 3).

ABC

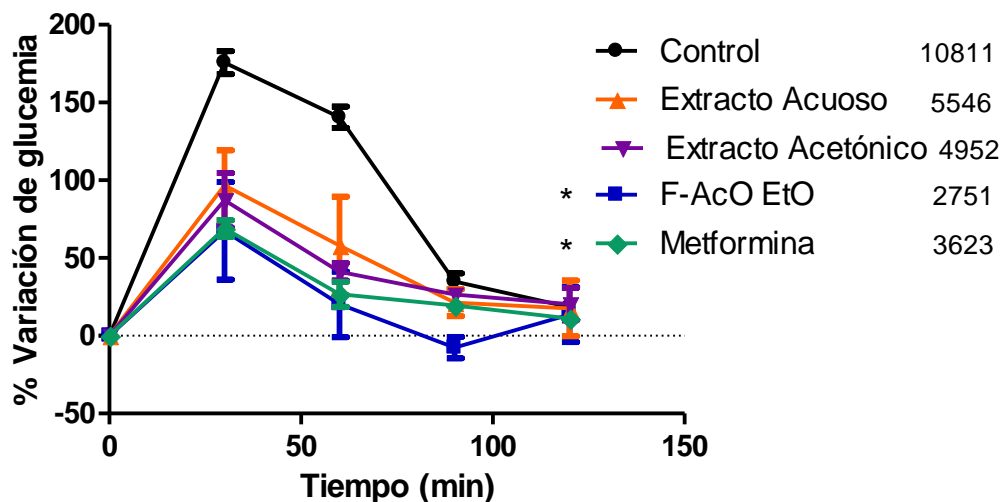


Figura 3. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones CD1, tratados con extracto acuoso, extracto acetónico, fracción de acetato de etilo a 300 mg / kg y metformina a 150 mg/kg. *Significativamente diferente al control, n=4, $p < 0.05$

Considerando que la fracción de acetato de etilo generó un efecto hipoglucemiante en el modelo agudo y un robusto efecto antihiperoglucemiante en la prueba de tolerancia a la glucosa oral, se llevó a cabo una separación por medio de cromatografía en columna abierta. De esta separación se obtuvieron 56 fracciones en total, las cuales fueron analizadas por cromatografía de capa fina y reunidas según sus similitudes químicas. Se eligieron 5 fracciones, por tener mayor rendimiento y cualidades químicas de interés. Estas fracciones se denominaron C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 y fueron evaluadas *In vivo* en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). Las fracciones C1F1, C1F2, C1F5 disminuyeron significativamente la glucemia, a los 30, 60 y 120 min, comparadas con el control. Las fracciones con menor área bajo la curva y mayor efectividad fueron C1F2 tuvo un mayor efecto, seguida de C1F1 y C1F5, en ese orden (Fig. 4).

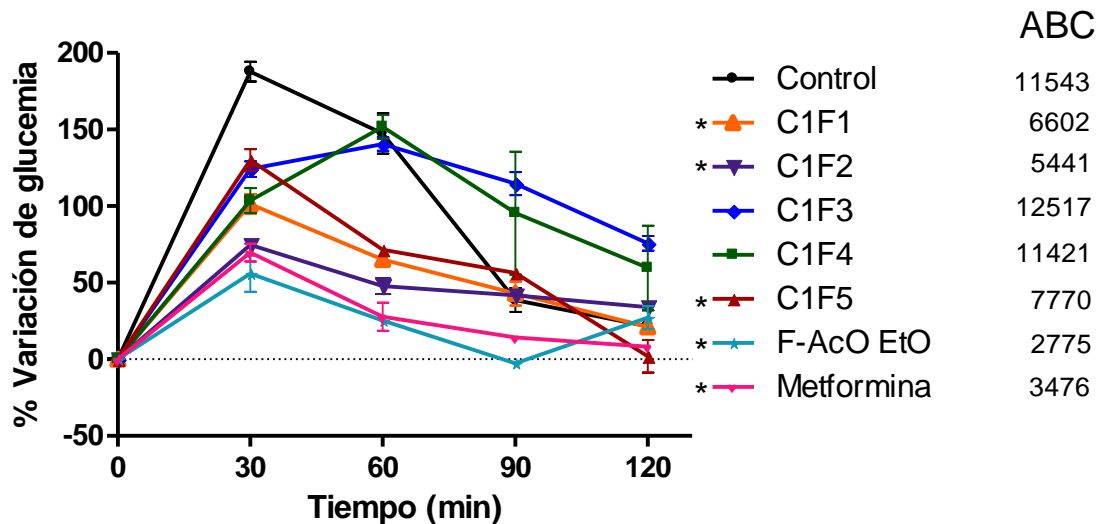


Figura 4. Prueba de tolerancia a la glucosa (PTGO) en ratones CD1, tratados con las fracciones derivadas de la separación de la fracción de acetato de etilo a 300 mg/kg y metformina a 150 mg/kg. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

Por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), pudimos observar en los cromatogramas obtenidos a 254, cómo el extracto acuoso, el cual ha demostrado su efectividad previamente en distintos modelos, tiene una composición compleja, aunque a esa longitud de onda únicamente pudimos observar algunos de los compuestos que la cromatografía nos permite separar con las capacidades fisicoquímicas de la columna utilizada. Considerando que la fracción de acetato de etilo fue obtenida por la separación líquido/líquido del mismo extracto acuoso con un solvente de menor polaridad, el acetato de etilo, se observó que los compuestos muy polares tienden a quedarse en la fase acuosa, y los compuestos de menor polaridad permanecen en la fase orgánica, que fue la fracción recuperada y en la que pudimos encontrar efecto antihiperoglucemiante. Esto podemos apreciarlo en los cromatogramas obtenidos por CLAR; algunos de los compuestos que se separaron y se pueden observar en el extracto acuoso, son de tiempos de retención cortos, lo que nos indica que son muy polares y probablemente sean azúcares presentes en el fruto. En el cromatograma de la fracción de acetato de etilo, podemos ver cómo la separación con este disolvente nos permitió una mejor separación de compuestos de polaridad intermedia, entre los 5 y 12 min de tiempo de retención y que incluso

algunos otros compuestos que no aparecen en el cromatograma del extracto acuoso, en los tiempos de retención de 10 a 12 min, se separan, y los compuestos de polaridad intermedia incrementan su proporción. Esta es justamente una de las razones de realizar separaciones de distintas polaridades en extractos provenientes de frutos, que son complejos por la gran presencia de carbohidratos y que hacen la separación de compuestos sea más complicada. Aunque la fracción de acetato de etilo tiene menor cantidad de carbohidratos y mayor cantidad de terpenos y fenoles.

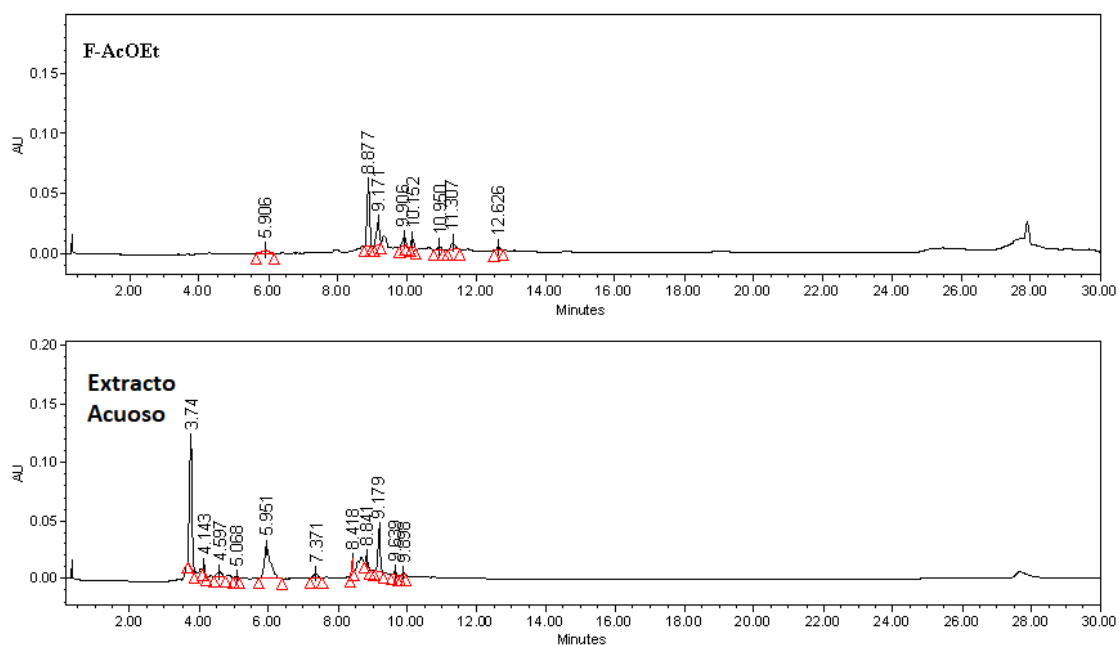


Figura 5. Cromatogramas del extracto acuoso de *C. ficifolia* y de la fracción de acetato de etilo observadas a 260 nm.

Para la separación de la fracción de acetato de etilo, se realizó cromatografía abierta en columna en fase normal, y se obtuvieron 56 fracciones, obtenidas con los siguientes sistemas de gradientes de elución.

Tabla 2. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta de la fracción de acetato de etilo.

Fracciones	% CH ₂ Cl ₂	% Metanol
1-6	100	0
7-12	95	5
13-19	90	10
20-32	85	15
33-40	80	20
41-45	75	25
46-49	70	30
50-53	50	50
54-56	0	100



Figura 6. Cromatofolios de las fracciones obtenidas de la separación de la fracción de acetato de etilo. En los círculos negros se señalan las reuniones de las fracciones elegidas para evaluaciones biológicas.

Las fracciones que tuvieron características químicas similares se reunieron para incrementar su rendimiento (Figura 6). Se eligieron 5 para evaluaciones biológicas, considerando que cada una de las reuniones contaba con los grupos principales de compuestos de la fracción de acetato de etilo.

A continuación, se muestran los cromatogramas de las fracciones C1F2 a C1F5 obtenidos por cromatografía de alta resolución (Figura 7). En el caso de la fracción C1F1, por sus características de muy baja polaridad y naturaleza lipídica, no pudo ser analizada por CLAR.

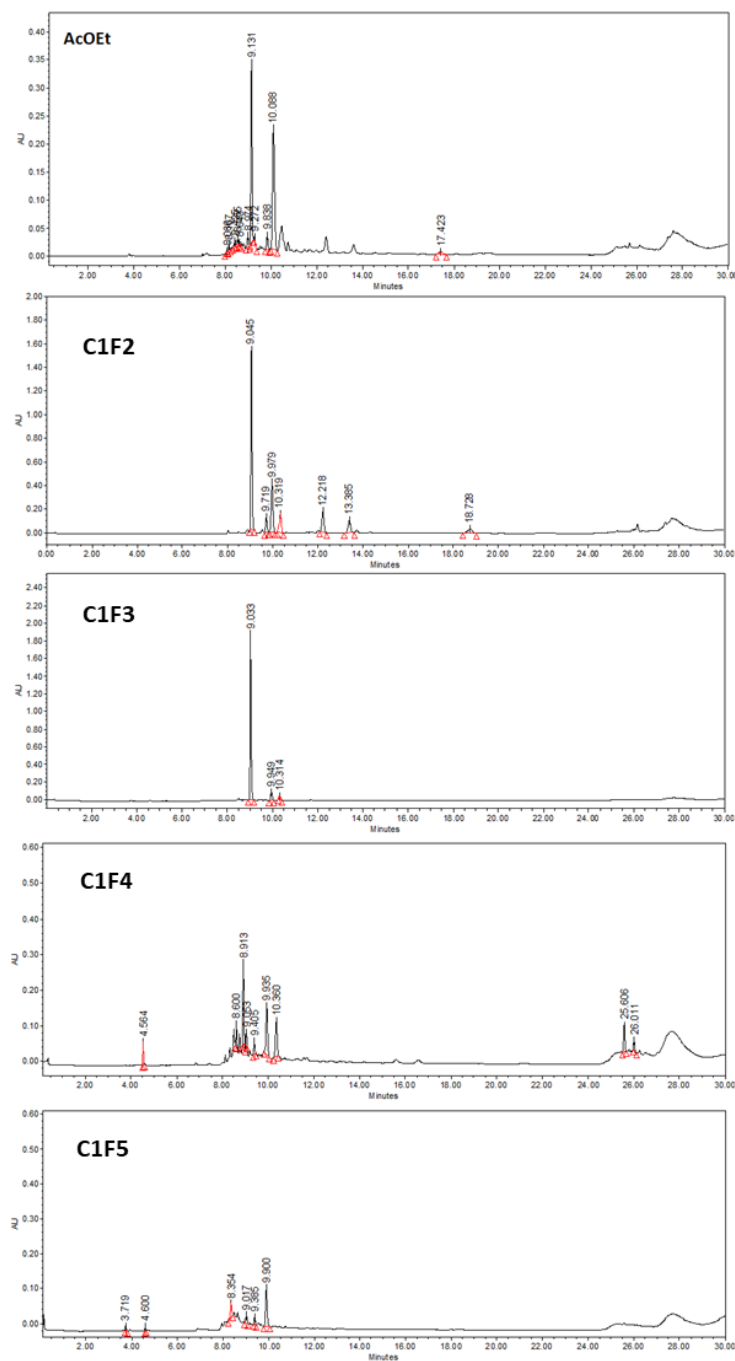


Figura 7. Cromatogramas de la fracción de acetato de etilo y sus fracciones derivadas C1F2, C1F3, C1F4, C1F5, observadas a 250 nm.

Se realizaron pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares RINm5F y C2C12 con las 5 fracciones provenientes de la fracción de acetato de etilo, a concentraciones de 1, 10 y 100 μg para establecer una concentración de tratamiento segura que no comprometiera la funcionalidad celular en las subsecuentes pruebas *In vitro*.

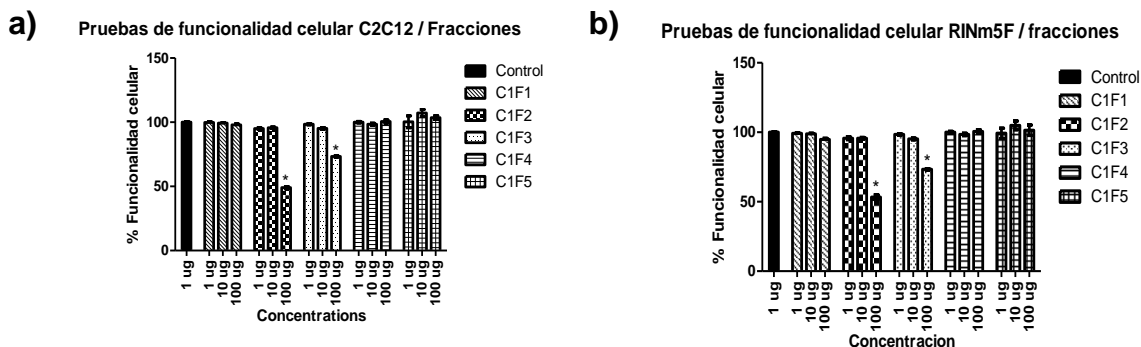


Figura 8. Pruebas de funcionalidad celular por MTT con concentraciones de 1, 10 y 100 μg de las fracciones C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 en la línea celular a) C2C12 y b) RINm5F incubadas durante 24 hrs. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

Las fracciones C1F2 y C1F3 presentaron descensos significativos en su funcionalidad con la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se estableció una concentración segura de cada de una de las fracciones de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 8). Se evaluó el efecto de las 5 fracciones sobre la secreción de insulina en células RINm5F (Fig. 9). Las fracciones incrementaron significativamente la secreción de insulina por orden de polaridad (de menor polaridad a mayor), con excepción de la fracción C1F5 que no mostró un cambio significativo. C1F1 fue la fracción que incrementó en mayor orden la secreción de insulina, seguida por C1F2, C1F3 y C1F4, de manera similar que glibenclamida.

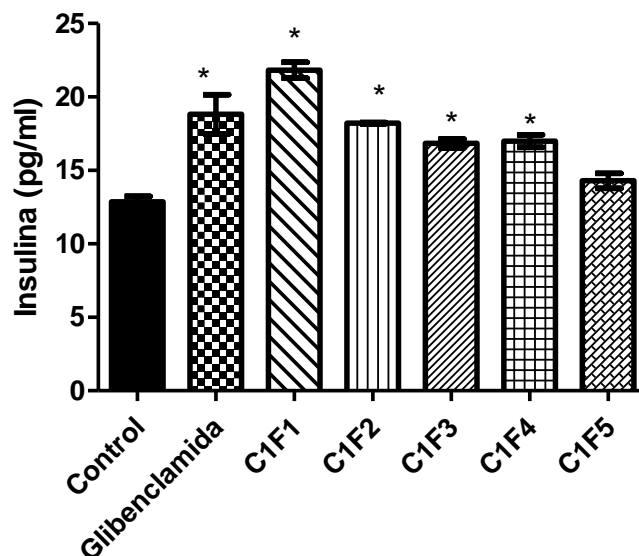


Figura 9. Secreción de insulina en células RINm5F con los tratamientos de fracciones C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C1F5 a 10 μ g/ml, incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

Con respecto a la expresión de ARNm de GLUT-4, la fracción C1F1 incrementó significativamente la expresión de GLUT-4, comparado con el control, incluso en mayor orden que el fármaco de referencia, Pioglitazona, seguido por las fracciones C1F5 y C1F2, en ese orden (Fig. 10).

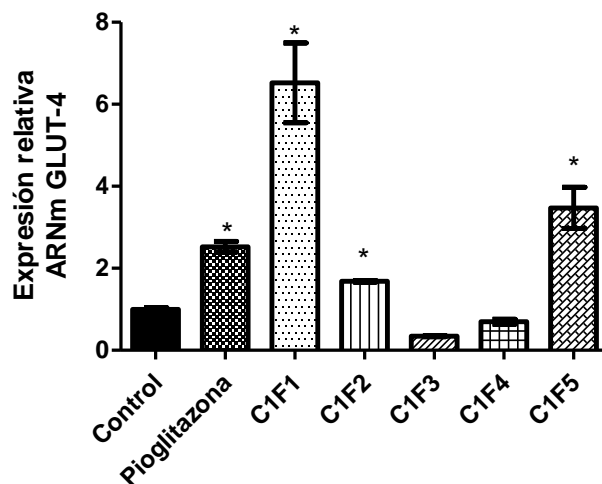


Figura 10. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, con los tratamientos de fracciones C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C1F5 a una concentración de 10 μ g/ml y pioglitazona a 5 μ M, incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

Por su efectividad tanto en el modelo *In vivo*, como en los modelos *In vitro*, las fracciones C1F1 y C1F2 fueron separadas por fraccionamiento químico en cromatografía de columna abierta, con sílica gel fase normal. De las fracciones obtenidas de C1F1, se eligieron las subfracciones F1.1, F1.2, F1.3 y fueron evaluadas en ambos modelos *In vitro*. Pevio a esto, se realizaron pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares RINm5F y C2C12 con estas subfracciones, a concentraciones de 1, 10 y 100 µg para establecer una concentración de tratamiento segura (Fig. 11).

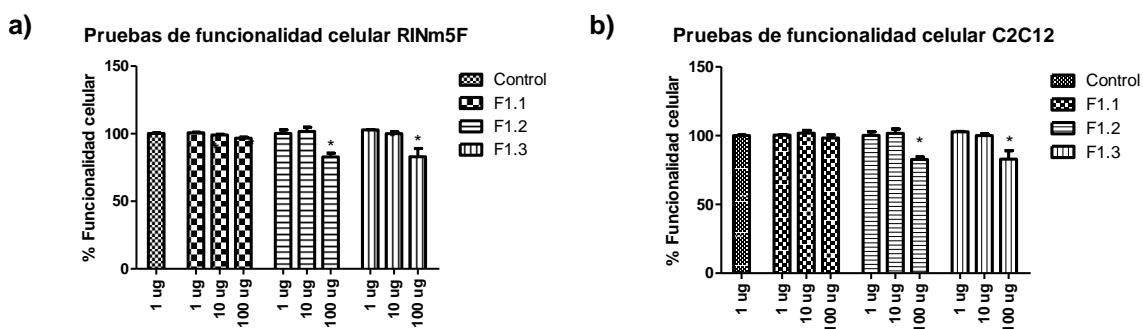


Figura 11. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares RINm5F y C2C12, tratadas con las subfracciones derivadas de C1F1; F1.1, F1.2, F1.3 a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml por 24 h. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

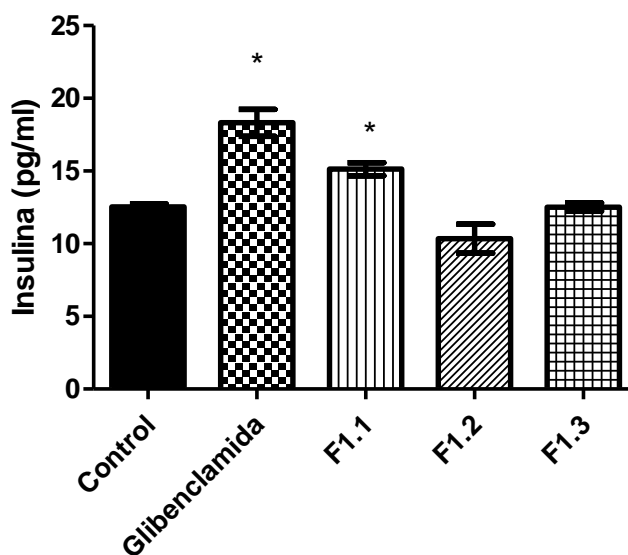


Figura 12. Secreción de insulina en células RINm5F con los tratamientos de las subfracciones F1.1, F1.2, F1.3, F1.4 a 10 µg/ml, incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

La subfracción F1.1 incrementó significativamente la secreción de insulina con respecto al control (Fig. 12). Con respecto a la expresión del transportador de glucosa GLUT-4, la subfracción F1.1 incrementó 7 veces su expresión y la fracción F1.2, 4 veces, siendo el incremento de ambas fracciones mayor al provocado por el fármaco de referencia, pioglitazona (Fig. 13).

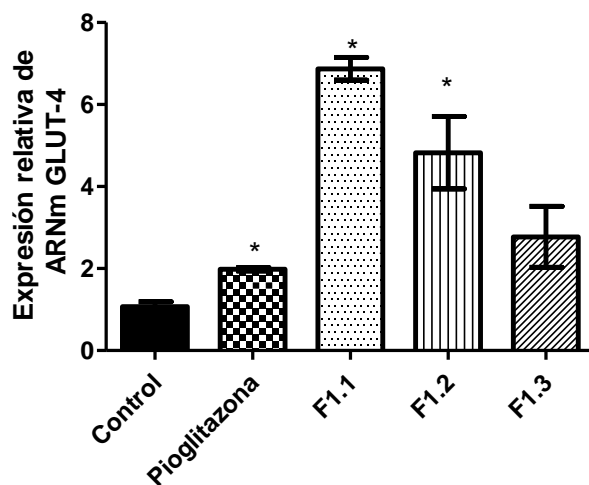


Figura 13. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, con los tratamientos de fracciones F1.1, F1.2, F1.3, F1.4, a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y pioglitazona a 5 μM . *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

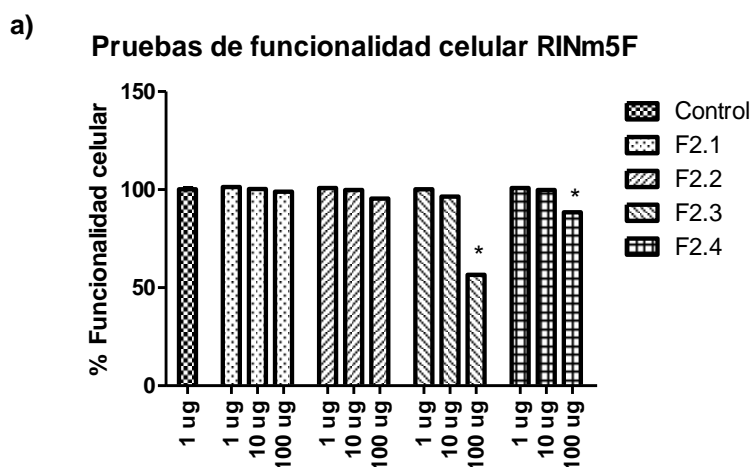
Las subfracciones derivadas de C1F1; F1.1, F1.2, F1.3 fueron analizadas por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lo cual fue posible gracias a su naturaleza poco polar. La composición química de dichas fracciones se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos químicos contenidos en las subfracciones F1.1, F1.2, F1.3, derivadas de C1F1, identificados por análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS).

Fraccion	Compuestos	% Abundancia
F1.1	(M)4-Ciano-4-hidroxi-3-metil-2-fenilpiperidina	8%
	(M)1,3-Dimetil-3-hidroxi-5-metoxioindole	13%
	(M)3-[(3,5-Dimetoxibenzoil)hidrazono]-N-(2-metoxietil)butiramida	10%
	(M)2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, 2-butil-4-hidroxi	11%
	(M) ácido benzoico, undecil éster	5%
	Stigmasta-5,22-dien-ol	3
	β-sitosterol	37%
	Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol	5%
(M)Stigmast-7-en-3-ol	8%	
F1.2	Ácido hexadecanoico, 1-(hidroximetil)-1,2-etanedil éster	4%
	Ácido hexadecanoico, etil éster	8%
	(M) ácido 1-pirrolidinbutanoico, 2-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-α-nitro-,2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metoxifenil éster	15%
	(M)Stigmasta-5,22-dien-3-ol	45%
	(M)Stigmast-7-3n-3-ol	28%
F1.3	(M)3-[(3,5-dimetoxibenzoil)hidrazono]-N-(2-metoxietil)butiramida	22%
	(M)2- ácido propenoico, 3-(1H-pirrol-3-il), etil éster	10%
	(M) ácido hexadecanoico, metil éster	10%
	(R)9,12,15- ácido Octadecatrienoico, metil éster	7%
	(R) ácido acetico, octadecil éster	18%
	(R) ácido Hexanedioico, bis(2-etilhexil) éster	26%
	(R) Olea-13(18) eno	7%

Dentro de los compuestos tenemos la presencia de ácidos carboxílicos, ácidos grasos y fitoesteroles. La fracción C1F1 mostró actividad sobre secreción de insulina e incremento en la expresión de GLUT-4. La fracción está compuesta por una mezcla de fitoesteroles y ácidos carboxílicos, en donde el β -sitosterol es el fitoesterol más abundante en la fracción.

La fracción C1F2 también fue separada por cromatografía en columna abierta, fase normal, de la cual se obtuvieron 42 subfracciones, las cuales fueron analizadas en cromatografía de placa fina y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se reunieron por su similitud química y se eligieron 4 fracciones por su rendimiento e interés químico. Estas subfracciones fueron denominadas F2.1, F2.2, F2.3, F2.4 y fueron evaluadas en ambos modelos *In vitro*. Previamente se realizaron pruebas de funcionalidad celular por MTT con las subfracciones a 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h (Fig. 14). Se estableció una concentración segura a 10 $\mu\text{g/ml}$ para las evaluaciones posteriores de ambas líneas celulares.



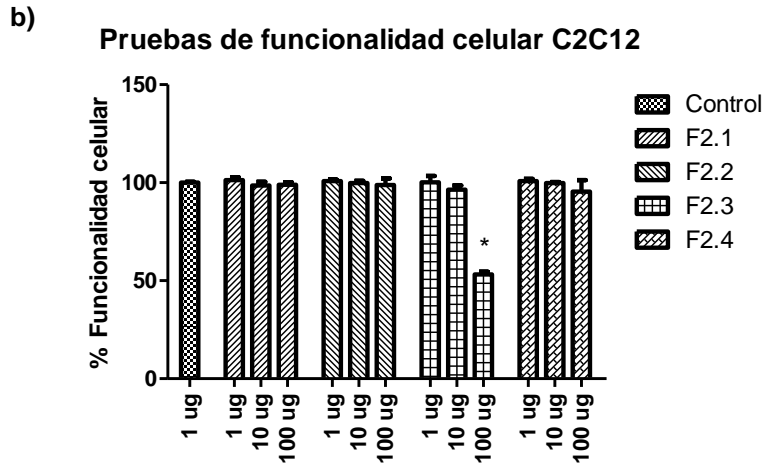


Figura 14. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares a) RINm5Fy b) C2C12, tratadas con las subfracciones derivadas de C1F2; F2.1, F2.2, F2.3, F2.4 *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

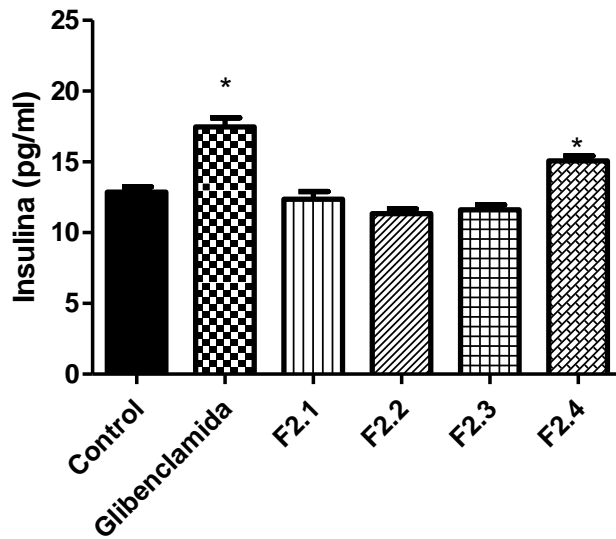


Figura 15. Secreción de insulina en células RINm5F con los tratamientos de las subfracciones F2.1, F2.2, F2.3, F2.4 a 10 µg/ml y glibenclamida a 50 µM *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

Únicamente la subfracción F2.4 incrementó significativamente la secreción de insulina (Fig. 15). Asimismo, F2.1 incrementó al doble la expresión de ARNm de GLUT4 y F2.4 incrementó la expresión cuatro veces. Ambos tratamientos produjeron niveles por arriba de los logrados con el fármaco de referencia pioglitazona (Fig. 16).

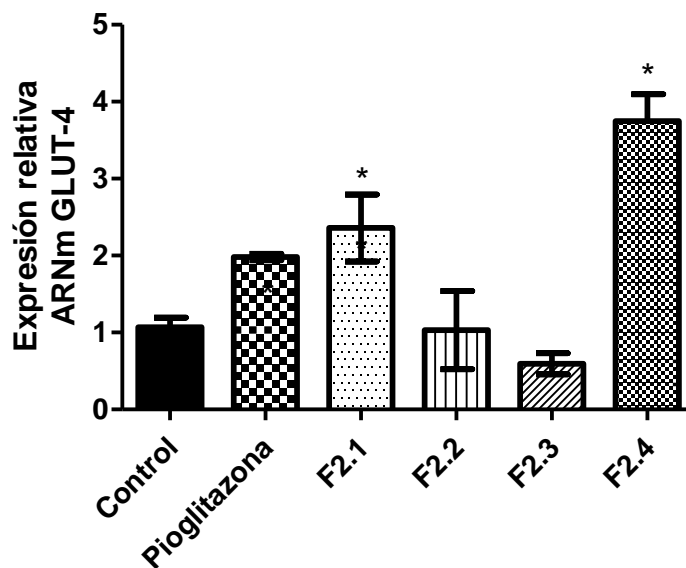


Figura 16. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, tratadas con subfracciones derivadas de C1F2; F2.1, F2.2, F2.3 y F2.4 a 10 µg/ml y pioglitazona 5 µM. *Significativamente diferente al control, n = 4, p<0.05.

Debido a la efectividad mostrada en los modelos *In vivo* e *In vitro*, se realizó un análisis fitoquímico a la fracción F2.4. Se realizó resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (^1H) y carbono (^{13}C) (Figs. 17 y 18), así como experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (Figs. 19-21), para determinar la estructura química del compuesto.

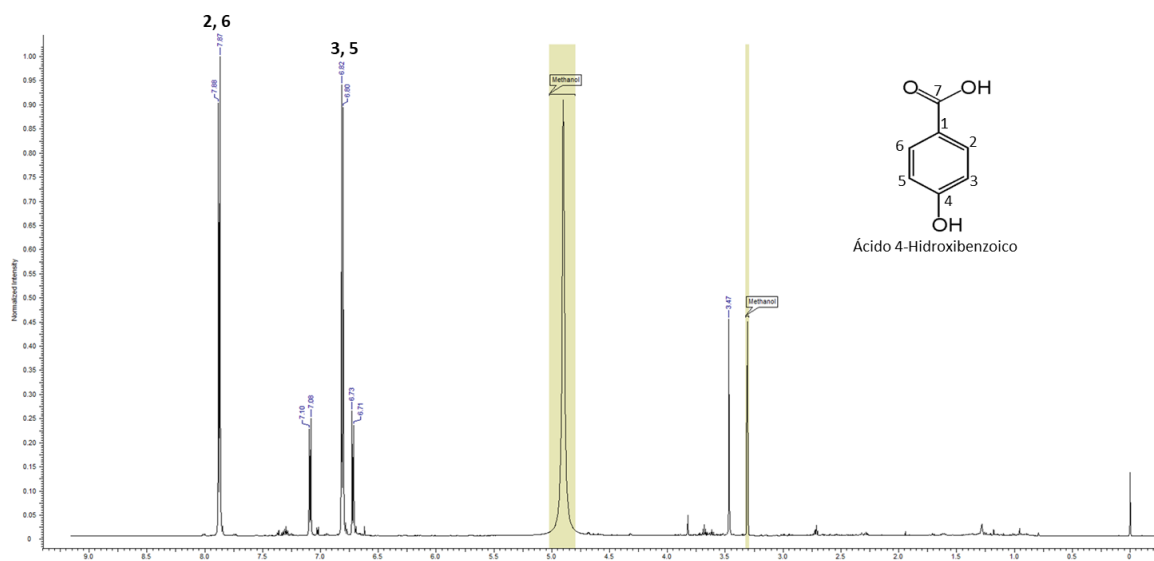


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H del compuesto ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA) en CD_3OD (600 MHz).

En el espectro de RMN de protón, podemos observar dos dobletes en la región aromática en δ 6.8 (d, $J = 8\text{Hz}$) y 7.8 (d, $J = 8\text{Hz}$) para un sistema AB, lo que sugiere que el anillo aromático está sustituido en las posiciones 1 y 4 (Figura 17).

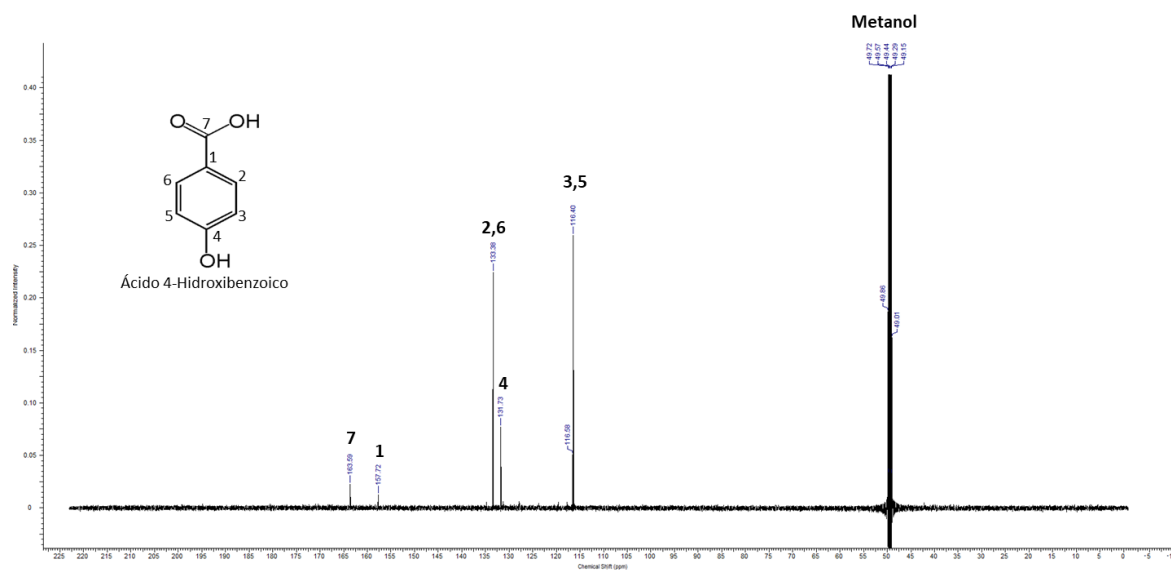


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C del ácido 4-hidroxibenzoico, en CD_3OD (600 MHz).

El espectro de RMN de carbono, presenta 5 picos; una señal en δ 163.5 ppm que corresponde al grupo carbonilo de un ácido, una señal en δ 157.5 ppm típica de carbono aromático sustituido con un grupo hidroxilo (carbono ipso C-1), y las señales en δ 133.23 y 116.25 ppm más intensas que los demás carbonos; cada una representa dos carbonos: C-2, C-6 y C-3, C-5, respectivamente (Figura 18).

Se realizó la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura (Cho, Moon, Seong, & Park, 1998) (The Human metabolome database), lo cual confirmó que se trata de el compuesto que es conocido como ácido p-hidroxibenzoico o también conocido en la nomenclatura de IUPAC como ácido 4-hidroxibenzoico.

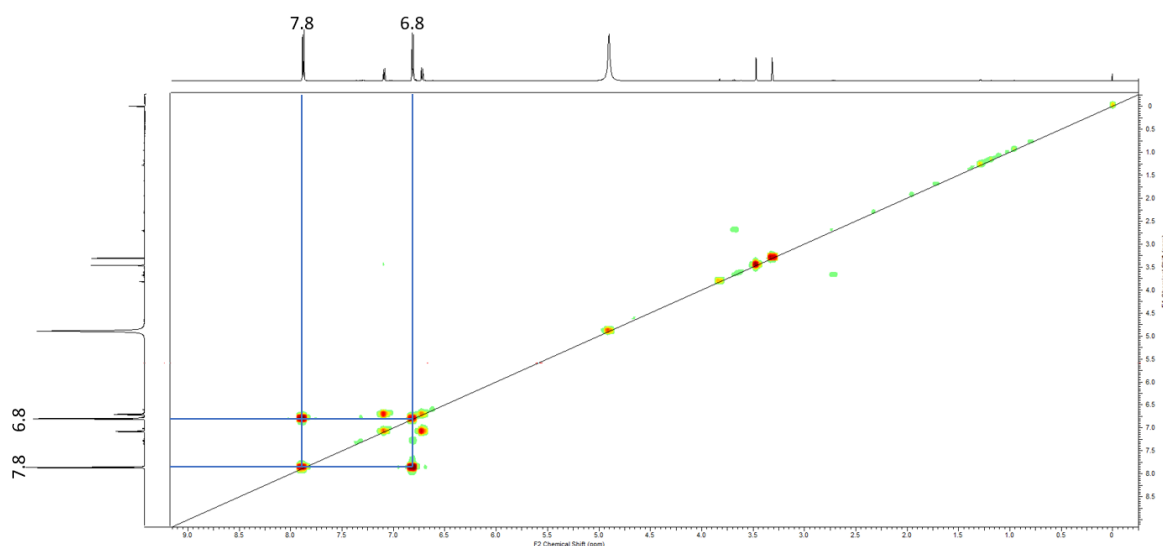


Figura 19. Espectro de RMN homonuclear (COSY) del ácido 4-hidroxibenzoico, en CD_3OD (600 MHz).

Se llevaron a cabo análisis bidimensionales de RMN. En el caso del espectro de correlación o COSY, se pueden ver los acoplamientos entre los átomos de hidrógeno vecinos. En cada uno de los ejes se observan los espectros de ^1H y en el centro, los acoplamientos o interacciones que tienen los hidrógenos vecinos (Figura 19).

En el caso del análisis del análisis de “espectro de correlación cuántica heteronuclear” o HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), observamos las correlaciones entre dos tipos distintos de núcleos (heteronuclear), en este caso de ^1H (del lado izquierdo) y ^{13}C (en la parte superior), los cuales están separados por un enlace. El espectro coordina los desplazamientos químicos de dos núcleos enlazados en donde solo un pico se obtendrá por par de átomos enlazados (Figura 20).

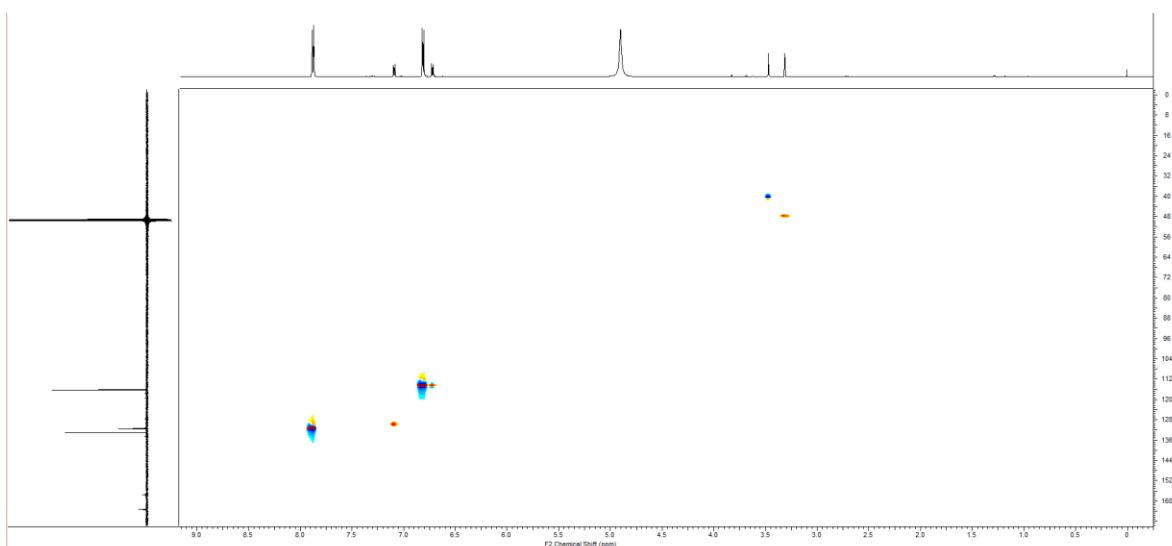


Figura 20. Espectro de correlación cuántica única heteronuclear (HSQC) de la fracción F2.4 en CD_3OD (600 MHz).

Se llevó a cabo el análisis de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples o HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), del cual obtuvimos un diagrama bidimensional: sobre el eje horizontal se observan los espectros de ^1H , mientras que en el eje vertical se pueden ver los espectros de ^{13}C y en medio señales que indican correlación a dos y tres ligaduras (Figura 21).

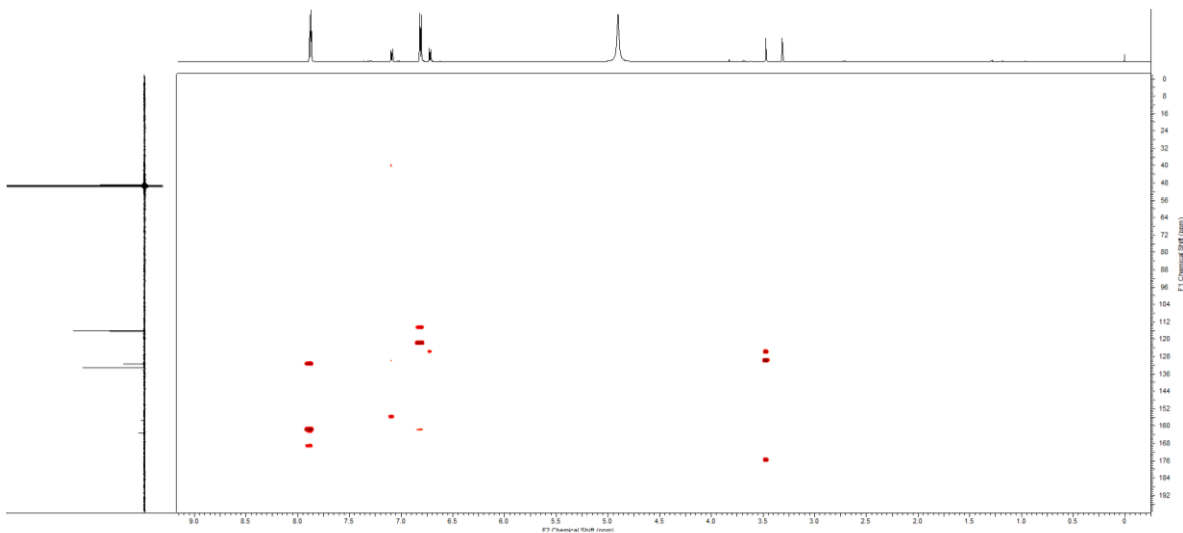


Figura 21. Espectro de conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC) de la fracción F2.4 en CD₃OD (600 MHz).

Con los estudios bidimensionales, pudimos confirmar que la fracción está conformada principalmente por ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA). A pesar de que el 4-HBA es la especie más abundante, aún se encuentra en una mezcla con ácido 4-hidroxifenil acético (4-HFAA) en una proporción de 7: 3. Los datos de los desplazamientos químicos del 4-HBA pueden observarse en la Tabla 4, comparados con los valores reportados del mismo compuesto (Cho *et al.*, 1998).

Tabla 4. Desplazamientos químicos del compuesto ácido 4-hidroxibenzoico obtenido de la fracción F2.4 y datos de la literatura.

Número de carbono	Ácido 4-hidroxibenzoico			
	Fracción F2.4		Cho et al.	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	157.7	--	159.9	--
2	133.23	7.88	131.1	7.73
3	116.25	6.82	114.4	6.71
4	131.59	--	127.5	--
5	116.25	6.82	114.4	6.71
6	133.26	7.88	131.1	7.73
7	163.25	--	169.4	--

Se adquirió el estándar de 4-HBA (Sigma-Aldrich, ≥98% pureza) y se analizó por CLAR. Se comparó el estándar de 4-HBA con la fracción F2.4 para confirmar que se trata del mismo compuesto. El estándar comercial se observó en un tiempo de retención de 9.079 min, con un espectro de absorción de 216.9, 248.6 nm, mientras que el compuesto presente en la fracción F2.4 se observó a un tiempo de retención de 9.071, con un espectro de absorción a los 212 y 253 nm (Figura 22). Con esto se puede concluir que se trata del mismo compuesto.

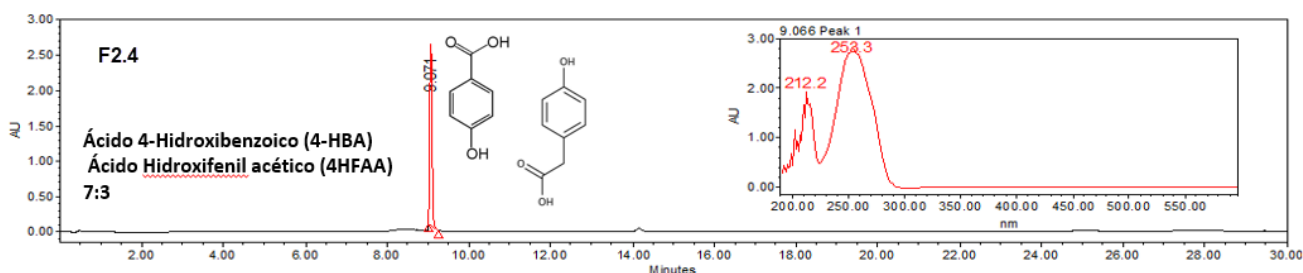


Figura 22. Cromatograma de la fracción F2.4 que corresponde a una mezcla en proporción 7:3 de ácido 4-hidroxibenzoico y ácido hidroxifenilacético observado a 254 nm y su espectro de absorción.

En el cromatograma podemos observar que 4-HBA es uno de los compuestos que presenta mayor abundancia en la fracción de acetato de etilo (Figura 23).

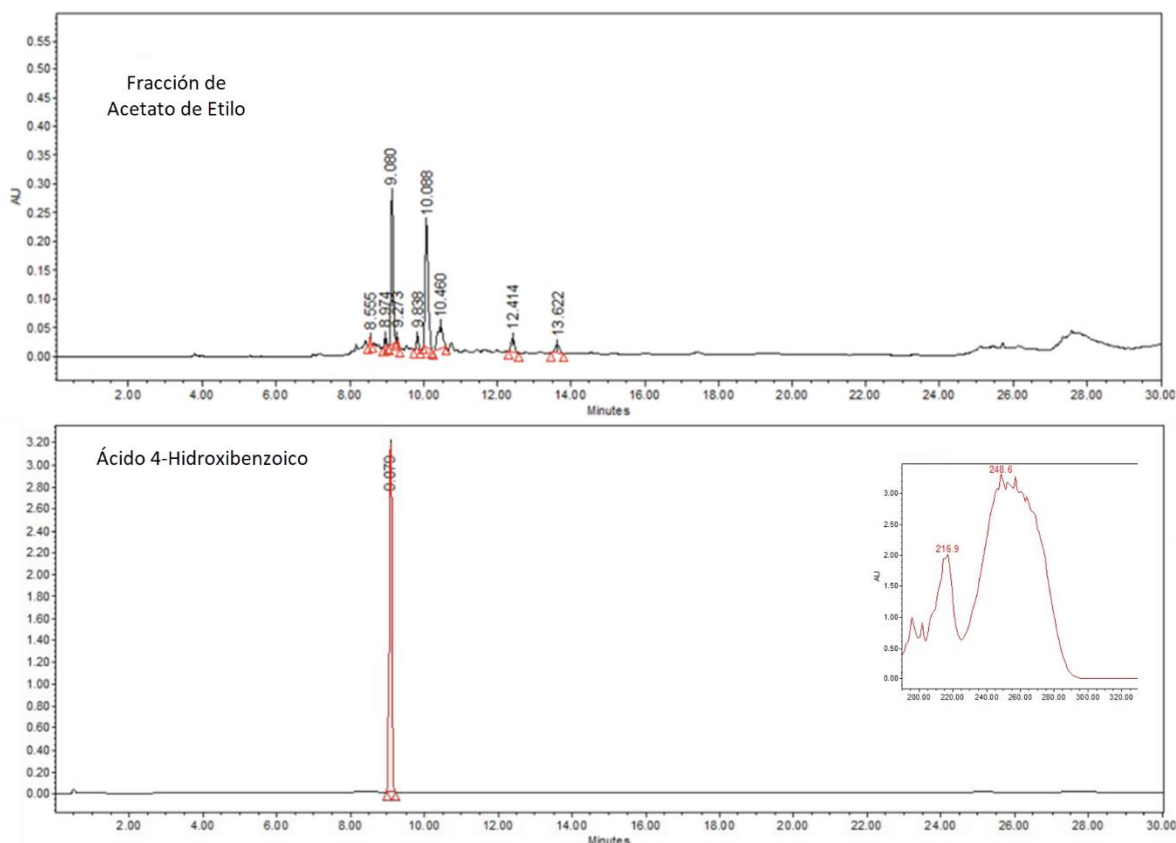


Figura 23. Cromatogramas de CLAR de la fracción 2.4 que corresponde al ácido 4-hidroxibenzoico con trazas de ácido 4-hidroxifenilacético, Fracción de acetato de etilo y estándar comercial de ácido 4-hidroxibenzoico, observados a una longitud de onda de 250 nm.

Para averiguar la cantidad de 4-HBA presente en la fracción de acetato de etilo, se prepararon una serie de disoluciones de concentraciones crecientes del estándar comercial de 4-HBA para elaborar una curva patrón y cuantificar el compuesto por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Tabla 5. Curva estándar del compuesto ácido 4-hidroxibenzoico a partir de su concentración y área bajo la curva en cromatografía líquida de alta resolución.

Concentración (µg)	T. Retención (min)	AUC 1	AUC 2	AUC 3	Promedio
12.5	9.06	760942	750280	750280	753834
25	9.07	1581480	1576652	1581480	1579870.67
50	9.051	3175684	3148822	3175684	3166730
100	9.082	6108142	6108142	6108142	6108142
200	9.079	11442699	11442699	11442699	11442699

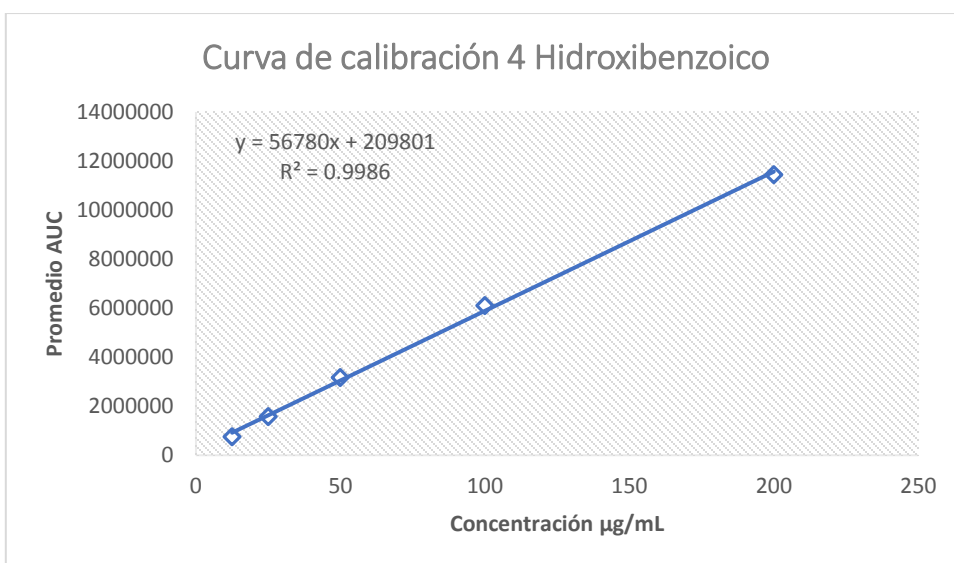


Figura 24. Curva de calibración con el estándar comercial ácido 4-hidroxibenzoico a concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/g.

Tomando en consideración el área bajo la curva del pico de 4-HBA, se obtuvo la ecuación $Y=mx+b$ $Y=56780x+209801$. Con esta ecuación pudimos calcular la concentración de 4-HBA que contiene nuestra fracción de acetato de etilo, la cual resultó en 9.6 mg/g de fracción de acetato de etilo.

Debido a que en los modelos celulares *In vitro* observamos un efecto dual; tanto en la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas, como en la expresión

del transportador de glucosa GLUT-4 en células C2C12, con las fracciones y subfracciones en las que están presentes los compuestos 4-HBA (compuesto mayoritario de fracción de acetato de etilo, presente en fracción F2.4 y β -sitosterol (compuesto mayoritario de la fracción F1.1), se adquirieron sus estándares comerciales. Ambos compuestos fueron evaluados en los modelos *In vitro*, realizando previamente las respectivas pruebas de funcionalidad celular para establecer una concentración segura (Fig. 25).

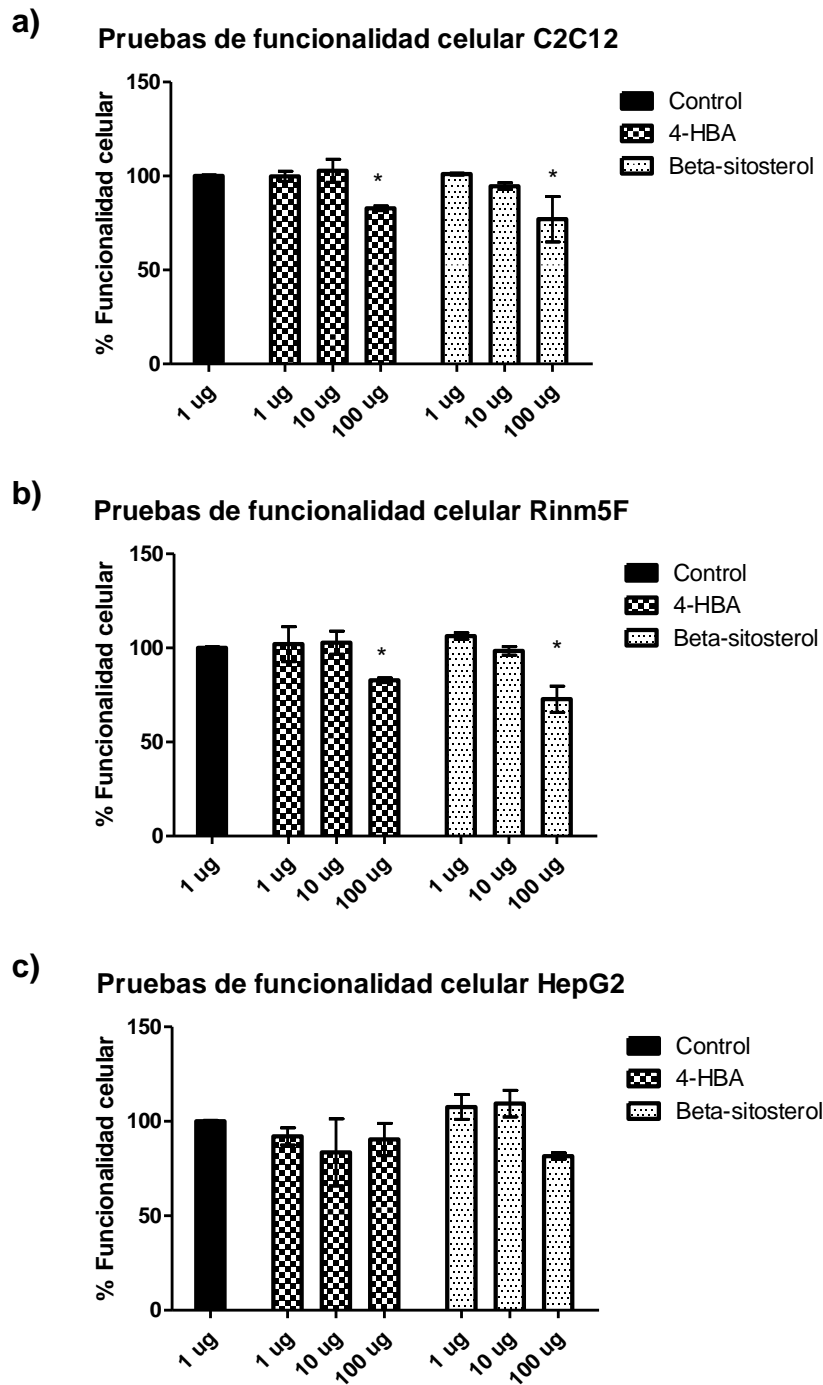


Figura 25. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares C2C12, Rinm5F, y HepG2 tratadas con los compuestos ácido 4-hidrobenzoico (4-HBA) a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml que corresponden a 7.2, 72.4 y 724 µM y β-sitosterol 1, 10 y 100 µg/ml que corresponden a 2.4, 24 y 240 µM por 24 h. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

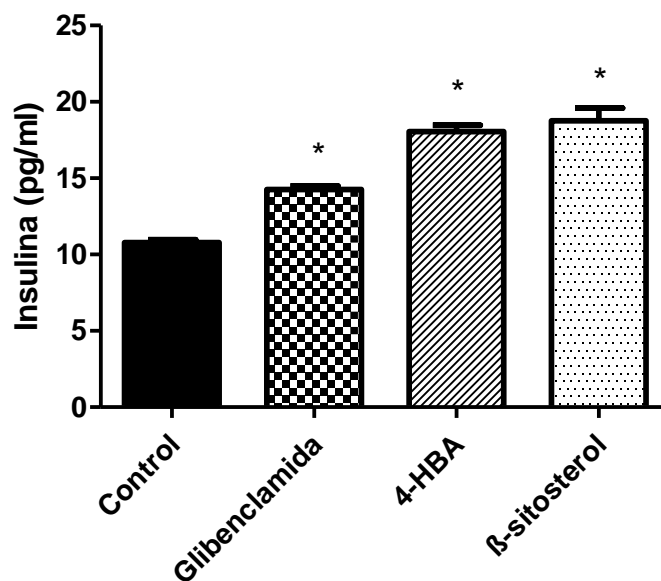


Figura 26. Secreción de insulina en células RINm5F con los tratamientos de los compuestos 4-HBA 72.4 μ M, β -sitosterol 24 μ M y glibenclamida a 50 μ M, incubadas por 30 min. *Significativamente diferente al control, n=4, $p < 0.05$.

4-HBA aumentó significativamente la secreción de insulina, incluso en mayor orden que la fracción F2.4, en donde se separó e identificó. β -sitosterol incrementó también la secreción de insulina, incluso de manera ligeramente mayor que 4-HBA y, de igual manera, un incremento mayor que las fracciones C1F1 y F1.1, que contenían dicho compuesto (Fig. 26)

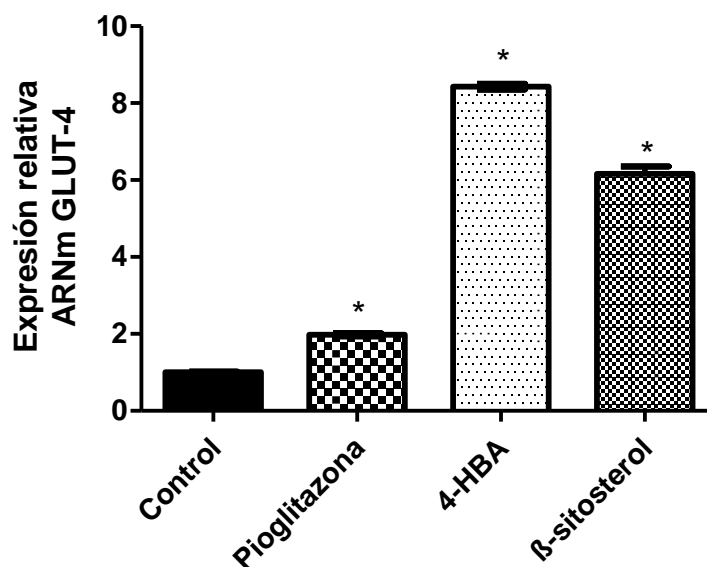


Figura 27. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, tratadas con los compuestos 4-HBA 72.4 μ M, β -sitosterol 24 μ M y pioglitazona 5 μ , incubadas por 30 min. *Significativamente diferente al control, n = 4, p<0.05.

Ambos compuestos incrementaron significativamente la expresión de GLUT-4; 4-HBA incrementó 7 veces su expresión, siendo mayor que la lograda con las fracciones con dicho compuesto, mientras que β -sitosterol incrementó 5 veces la expresión de GLUT-4, de manera similar a las fracciones que contenían el compuesto (Fig. 27).

Se evaluó el efecto de ambos compuestos sobre la expresión de PPAR γ y de adiponectina en células C2C12, dos moléculas clave relacionadas con la sensibilidad a la insulina. β -sitosterol tuvo un efecto similar a pioglitazona, el fármaco de referencia, el cual es agonista de PPAR γ , incrementando la expresión de PPAR γ en tres veces y 4-HBA duplicó su expresión (Fig. 28). En el caso de adiponectina (Fig. 29), el incremento guarda correlación con los incrementos de expresión de PPAR γ ; β -sitosterol incrementó su expresión aproximadamente 4 veces, mientras que 4-HBA lo hizo 3 veces.

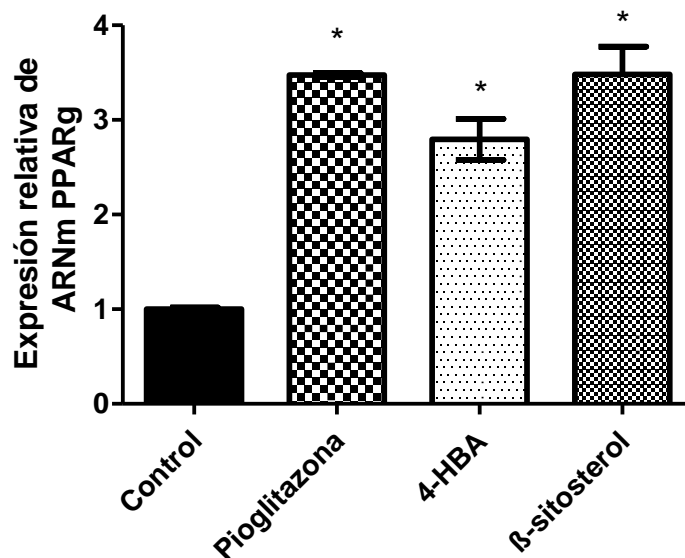


Figura 28. Expresión relativa de PPAR γ en células C2C12 tratadas con los compuestos 4-HBA 72.4 μ M, β -sitosterol 24 μ M y pioglitazona 5 μ M, incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n = 4, p<0.05.

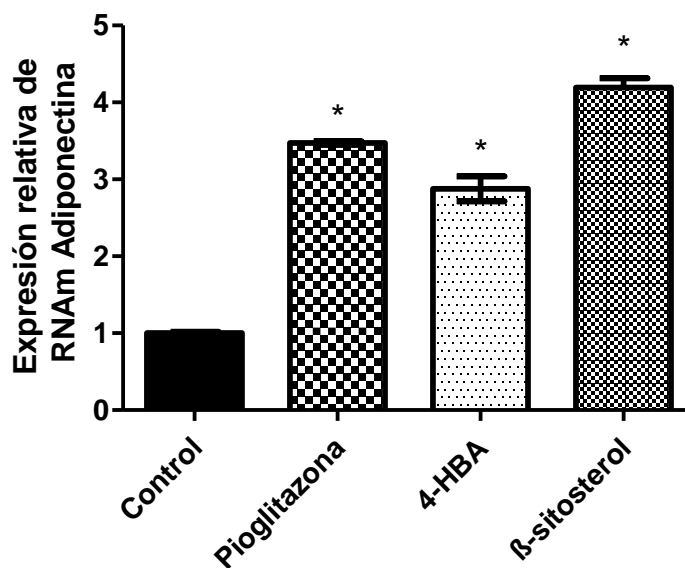


Figura 29. Expresión relativa de adiponectina en células C2C12 tratadas con los compuestos 4-HBA 72.4 μ M, β -sitosterol 24 μ M y pioglitazona 5 μ M, incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n = 4, p<0.05.

Se evaluó el efecto de los compuestos 4-HBA y β -sitosterol sobre la acumulación de glucógeno en células HepG2, en donde 4-HBA casi duplicó su acumulación y β -sitosterol la triplicó (Fig. 30).

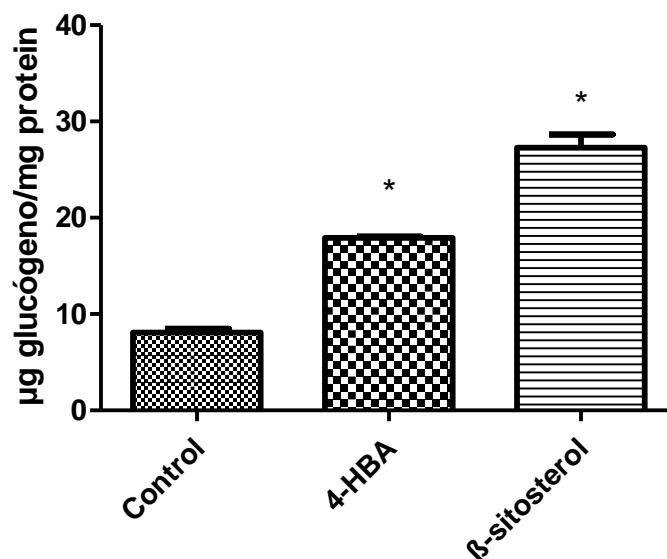


Figura 30. Deposición de glucógeno en células hepáticas HepG2 tratadas con los compuestos 4-HBA 72.4 μ M, β -sitosterol 24 μ M, ambos equivalentes a 10 μ g/ml, incubadas durante 24 h. *Significativamente diferente al control, n = 4, p<0.05.

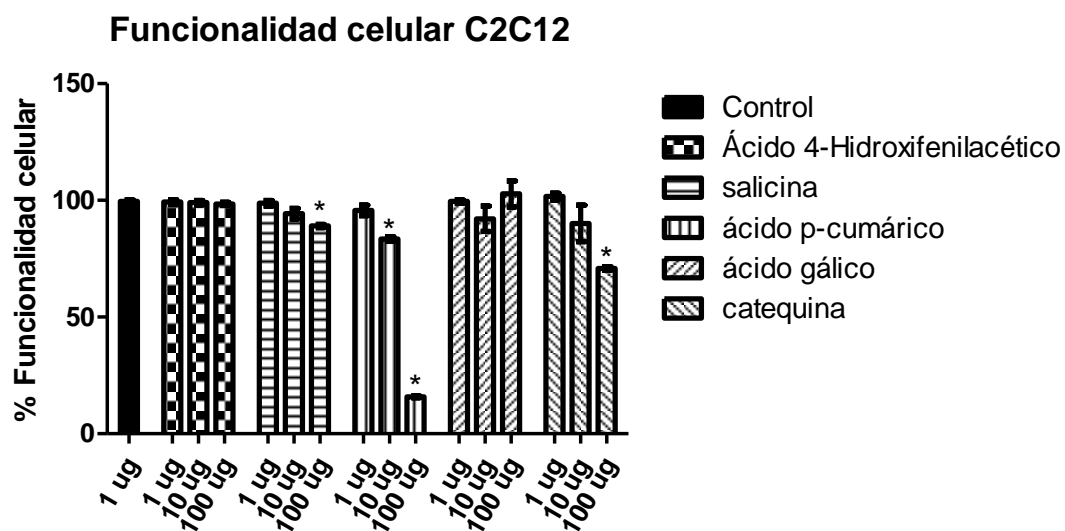
Adicionalmente, basándonos en antecedentes fitoquímicos de la especie (Fortis-Barrera et al., 2013; García et al., 2017), se compararon estándares de compuestos conocidos (Sigma-Aldrich, \pm 98% de pureza) con las fracciones y subfracciones de acetato de etilo por medio de CLAR, permitiéndonos identificar la presencia de los siguientes compuestos, tomando en cuenta sus respectivos tiempos de retención (RT):

Tabla 6. Compuestos encontrados en la fracción de acetato de etilo de *C. ficifolia* y sus tiempos de retención en CLAR.

Compuesto	Tiempo de retención
Ácido 4-hidroxifenil acético (4-HFAA)	6.77
Ácido Gálico	7.52
Salicina	5.39
Catequina	8.66
Ácido p-cumárico	10.20
Ácido cinámico	17.36
Ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA)	9.07

Se realizaron pruebas de funcionalidad para establecer concentraciones seguras para evaluar la actividad biológica de los compuestos en los modelos *In vitro*.

a)



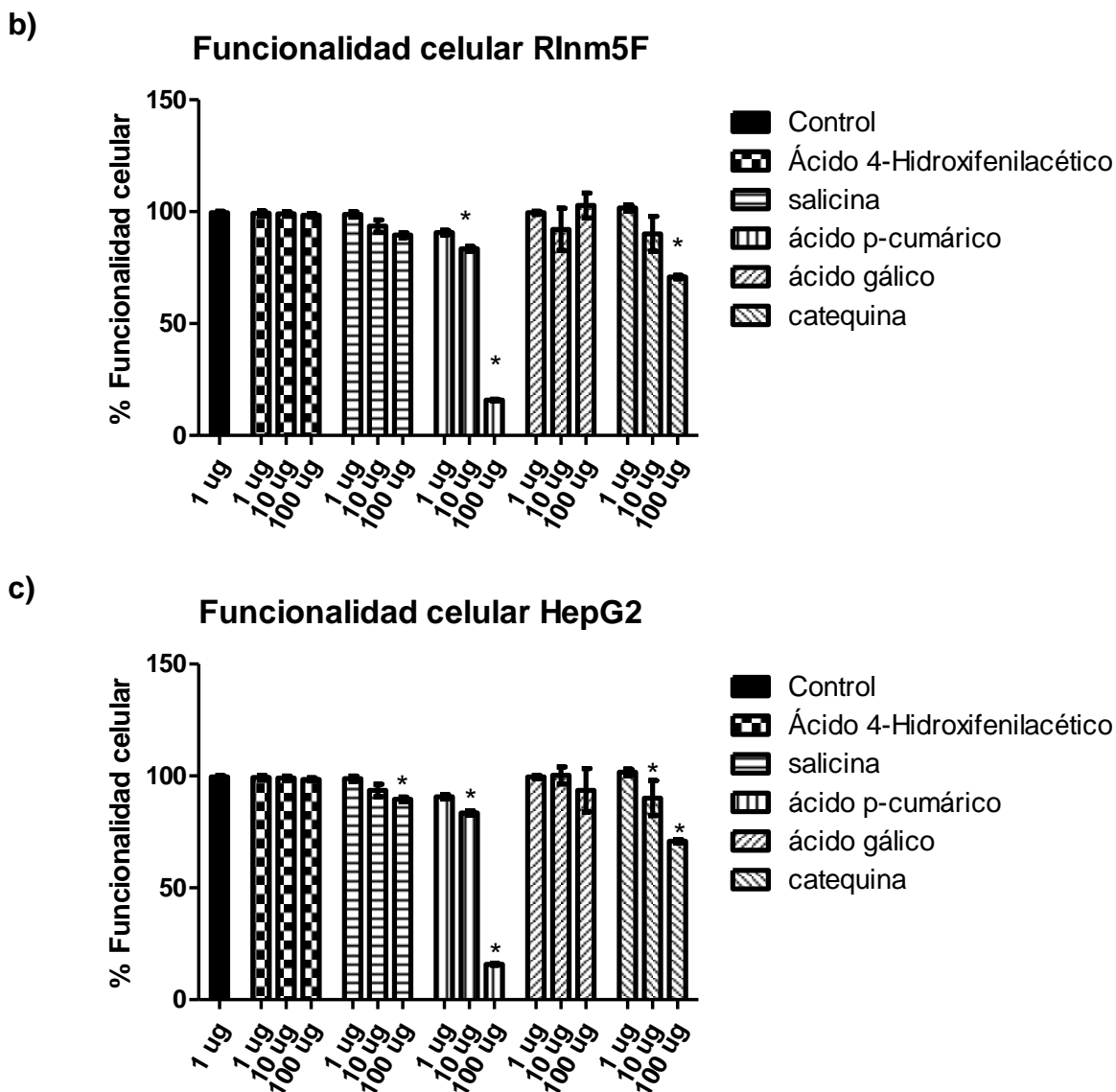


Figura 31. Pruebas de funcionalidad celular por MTT en las líneas celulares C2C12, RInm5F, y HepG2 tratadas a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ con los compuestos: ácido hidroxifenilacético (6.6, 66 y 660 μM), salicina (3.5, 35, 350 μM), ácido cumárico (6.5, 65 y 650 μM), ácido gálico (6, 60 y 600 μM) y catequina (3.44, 34.4 y 344 μM) por 24 h. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

Los compuestos tuvieron un comportamiento muy similar entre las diferentes líneas celulares; los que disminuyeron la funcionalidad celular de manera significativa fueron salicina a 100 $\mu\text{g/ml}$ (35 μM), ácido p-cumárico a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (65 y 650 μM) y catequina a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (34.4 y 344 μM).

Para la evaluación biológica se utilizaron las concentraciones de 66 μM para ácido 4-hidroxifenilacético (4-HFAA), 25 μM para salicina y 10 μM para ácido p-cumárico, ácido gálico y catequina.

Secreción de Insulina - Compuestos

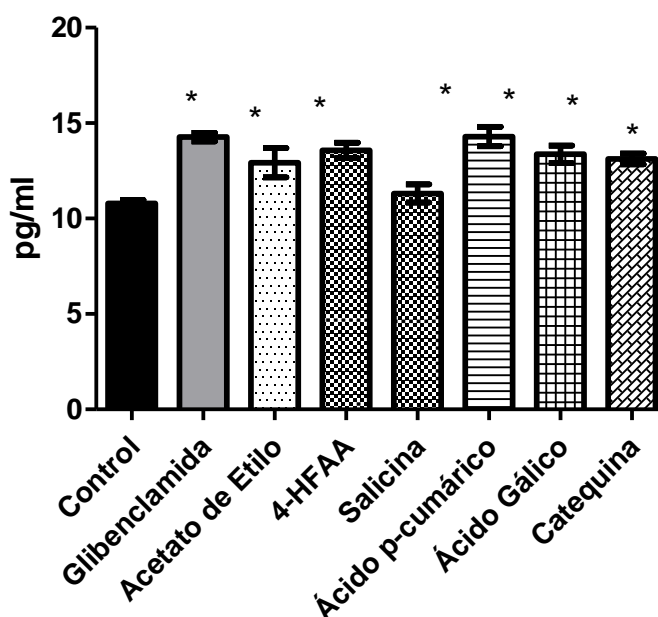


Figura 32. Secreción de insulina en células RINm5F con los tratamientos: ácido hidroxifenilacético 66 μM , salicina 25 μM , ácido cumárico 10 μM , ácido gálico 10 μM , 10 μM catequina y glibenclamida a 50 μM , incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, $n=4$, $p<0.05$.

Los compuestos 4-HFAA, ácido p-cumárico, ácido gálico y catequina, incrementaron la secreción de insulina en magnitudes similares, lo cual podría deberse a su estructura química similar (Figura 32).

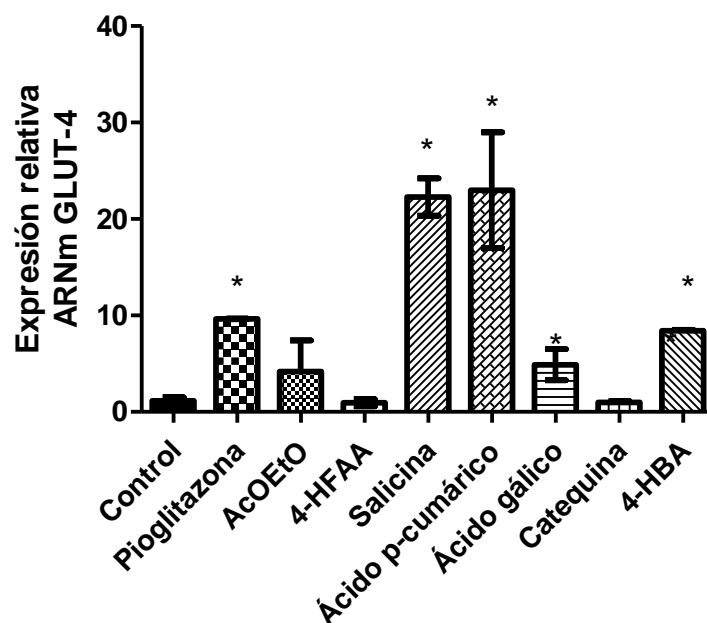


Figura 33. Expresión relativa de GLUT-4 en células C2C12, tratadas con los compuestos: ácido hidroxifenilacético 66 μ M, salicina 25 μ M, ácido cumárico 10 μ M, ácido gálico 10 μ M, 10 μ M catequina y glibenclamida a 50 μ M incubadas durante 30 min. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

Salicina, ácido p-cumárico y ácido gálico incrementaron significativamente la expresión de GLUT-4 (Figura 33). Además, todos los compuestos fenólicos incrementaron significativamente el glucógeno en células HepG2 (Figura 34). En comparación con los compuestos mayoritarios, los compuestos fenólicos incrementaron en un orden menor el glucógeno con respecto al observado con β -sitosterol o 4-HBA.

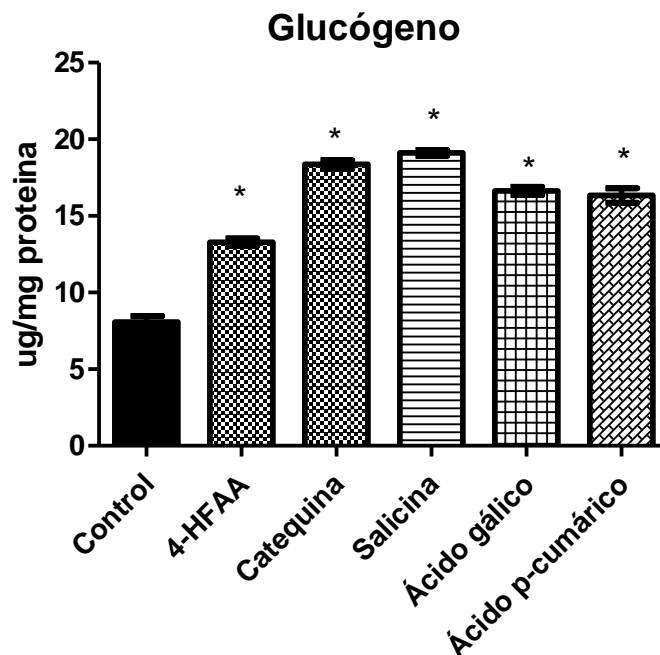


Figura 34. Deposición de glucógeno en células hepáticas HepG2 tratadas con los compuestos: ácido hidroxifenilacético 66 μ M, salicina 25 μ M, ácido cumárico 10 μ M, ácido gálico 10 μ M, 10 μ M catequina y glibenclamida a 50 μ M, incubadas durante 24 h. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

El acoplamiento molecular se realiza para explorar formas de unión entre ligandos potenciales y un blanco macromolecular cuya estructura es conocida experimentalmente. Esta técnica nos permite encontrar la unión más probable entre el ligando y un receptor. El objetivo fue encontrar la orientación o posición de los compuestos identificados, como posibles ligandos en el sitio activo de un blanco macromolecular. En este caso, dado que se observó aumento en la secreción de insulina y en la expresión de GLUT-4, y ya que dichos efectos se observaron con la fracción F1.1, cuyos compuestos se identificaron, así como con el compuesto 4-HBA, es posible que dos receptores implicados en la liberación de insulina y la producción de transportadores GLUT-4 podrían estar implicados en estos efectos, tales como GPR40 (PDB: 5TZR) y PPAR γ (PDB: 2F4B). Por lo tanto, los esteroides que se identificaron en la sub-fracción F1.1, así como 4-HBA, se acoplaron con las estructuras cristalográficas de los receptores GPR40 y PPAR γ para evaluar los posibles modos de unión.

El acoplamiento molecular reveló que los esteroides stigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol, stigmasta-5,22-dien-3-ol, campesterol, stigmast-7-en-3-ol y β -sitosterol, interactuaron con un sitio lipofílico de PPAR γ , cerca de SER342 (Fig. 35), en comparación con el agonista de referencia; EHA (ácido acético 5-{3-[(6-benzoil-1-propil-2-naftil)oxi] propoxi}-1h-indol-1-il) interactuó con los residuos de aminoácidos HIS449 y TYR473. Todos los esteroides obtuvieron un ΔG entre -9,1 y -9,7 Kcal/mol. El compuesto 4-HBA se une a PPAR γ a través de enlaces de hidrógeno en GLN286, un sitio más externo, con un ΔG de -5,1 Kcal/mol (Fig. 35).

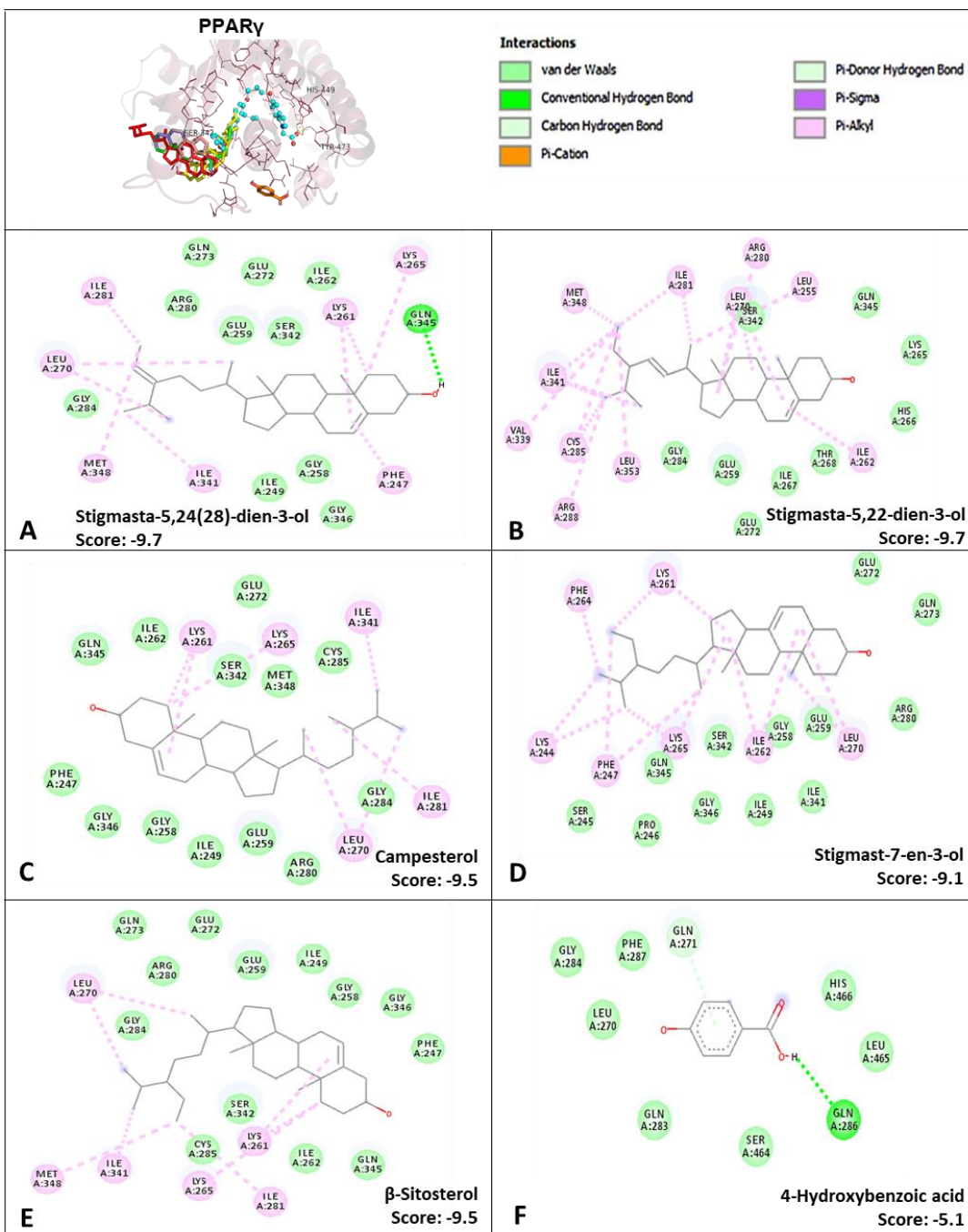


Figura 35. Molecular docking de A) stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, B) stigmasta-5,22-dien-3-ol, C) campesterol, D) stigmast-7-en-3-ol, E) β -sitosterol, F) ácido 4-hidroxibenzoico unidos al receptor PPAR γ . Residuos de aminoácidos a 4.0 Å del ligando se muestran como esferas. Los scores están dados como Kcal/mol.

Comparando las interacciones entre el receptor GPR40 y su agonista y modulador alostérico positivo cocrystalizado MK6 que se muestra en color cian, (Figura 36), que interactúa con los residuos de aminoácidos ARG254, TYR236 y ARG181, los esteroides contenidos en F1.1 permanecen en el lado exterior del potencial sitio de unión, con un ΔG de -7,9 a -8,5 Kcal/mol, mientras que el β -sitosterol prefiere un segundo sitio entre los bucles del receptor cerca de ARG254 y TYR 236, con un $\Delta G = -6,9$ Kcal / mol.

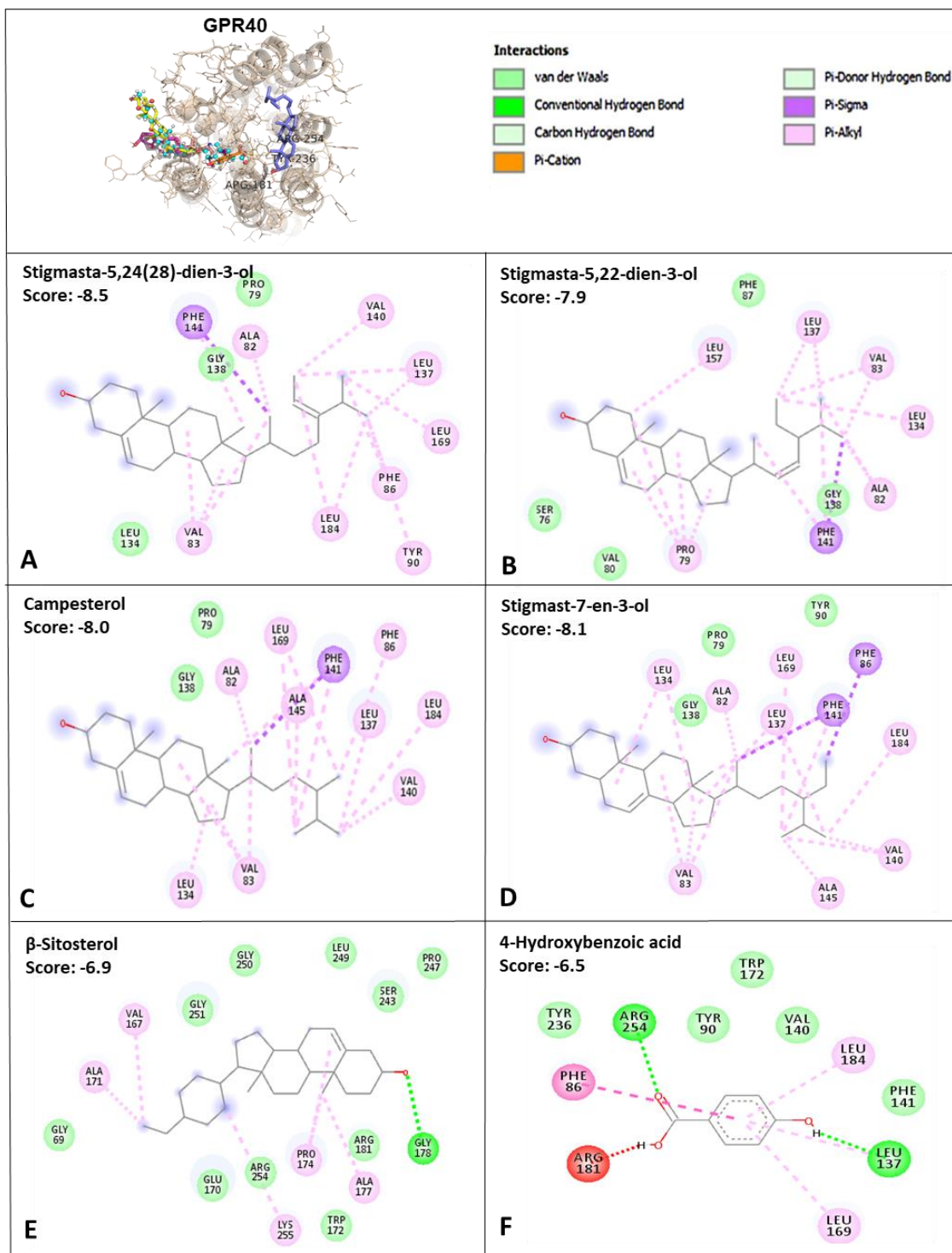


Figura 36. Molecular docking de A) stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, B) stigmasta-5,22-dien-3-ol, C) campesterol, D) stigmast-7-en-3-ol, E) β -sitosterol, F) ácido 4-hidroxibenzoico unidos al receptor GPR40. Residuos de aminoácidos a 4.0 Å del ligando se muestran como esferas. Los scores están dados como Kcal/mol.

Para confirmar que todos los efectos *in vitro* observados se pueden manifestar también en el organismo enfermo, se realizó la prueba glucémica aguda y la prueba de tolerancia a la glucosa oral con los compuestos comerciales en ratones diabéticos.

β -sitosterol tuvo el mayor efecto, disminuyendo significativamente la glucemia a los 120, 240 y 320 minutos, seguido por 4-HBA, mientras que la fracción de acetato de etilo y glibenclamida tuvieron un efecto similar (Figura 37).

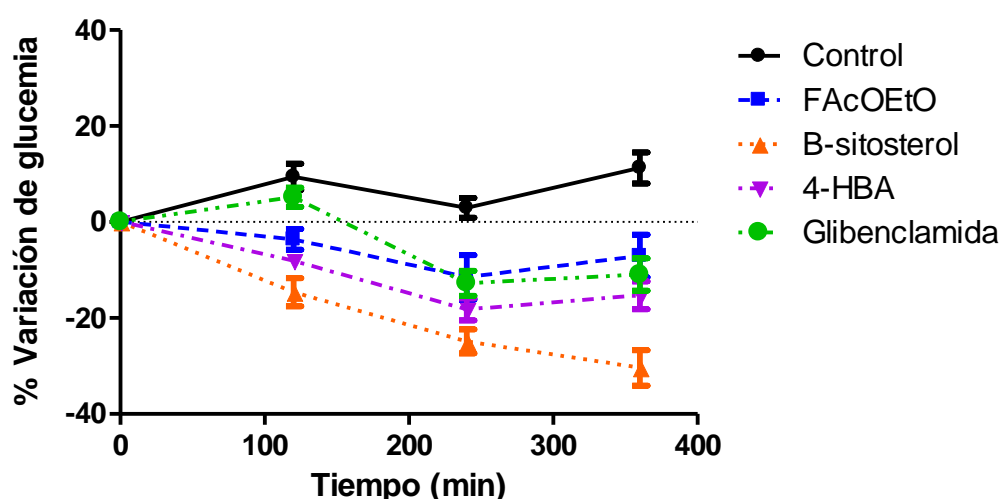


Figura 37. Estudio agudo en ratones diabéticos, tratados con solución salina (Control), fracción de acetato de etilo a una concentración de 300 mg/ml, β -sitosterol 20 mg/kg, 4-HBA 3 mg/kg y glibenclamida a 10 mg/kg, administrados por vía intragástrica. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05.

En la prueba de tolerancia a la glucosa, el pico hiperglucémico fue inhibido en todos los grupos, excepto en el grupo control a los 30 y 90 minutos y, en orden de efectividad, se puede ubicar a la fracción de acetato de etilo, 4-HBA y β -sitosterol. Después de 90 minutos de la administración de glucosa, la glucemia en el grupo de 4-HBA y de β -sitosterol continuó disminuyendo (Figura 38). 4-HBA tuvo el efecto antihyperglucemiante más notorio, mientras que el β -sitosterol mostró el mayor efecto hipoglucemiante. Ambos compuestos redujeron la glucemia en ambas pruebas, confirmando que los distintos efectos observados en los modelos *in vitro*

resultan de una acción sinérgica en el organismo que culmina en reducciones altamente significativas de la glucemia, como se observó en las primeras pruebas glucémicas realizadas in vivo con los primeros extractos de *C. ficifolia*.

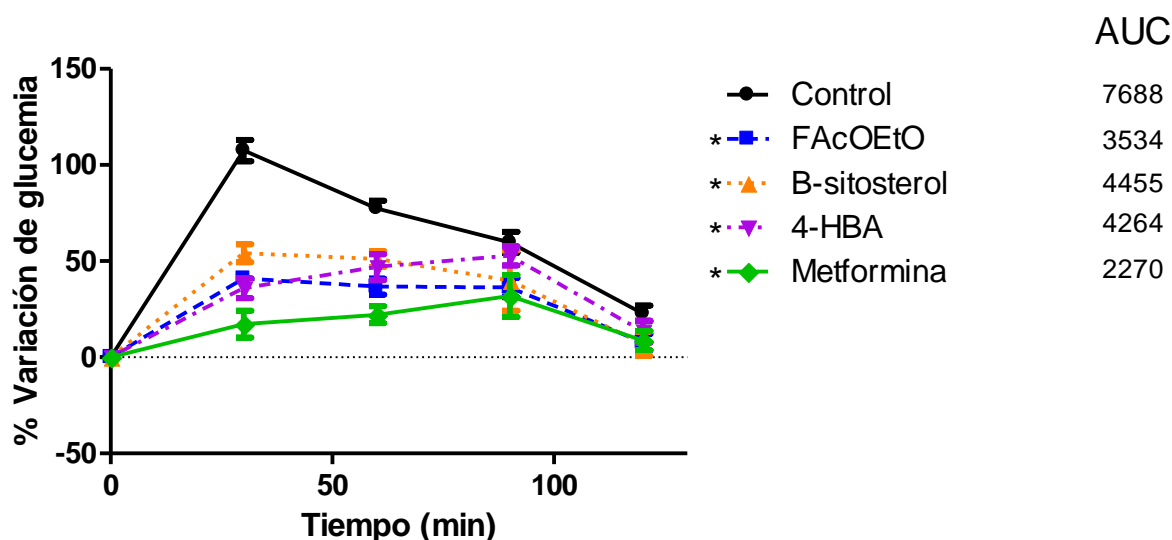


Figura 38. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) en ratones diabéticos CD-1 tratados con solución salina (Control), fracción de acetato de etilo a una concentración de 300 mg/ml, β -sitosterol 20 mg/kg, 4-HBA 3 mg/kg y glibenclamida a 10 mg/kg, administrados por vía intragástrica. *Significativamente diferente al control, n=4, p<0.05

10. DISCUSIÓN

El potencial terapéutico de *C. ficifolia* como planta medicinal utilizada para la prevención, tratamiento o adyuvante en el tratamiento de la diabetes es evidente. Esta especie ha sido evaluada anteriormente en diferentes modelos de estudio in vivo, como conejos, ratones, ratas y humanos), tanto sanos como diabéticos. En ellos se ha demostrado actividad biológica diversa: hipoglucemiante, antioxidante, antiinflamatoria e insulinomimética (Acosta-Patiño, Jiménez-Balderas, Juárez-Oropeza, & Díaz-Zagoya, 2001; Diaz-Flores et al., 2012; Jessica et al., 2017; Miranda-Perez et al., 2016; Roman-Ramos et al., 2012).

En el presente estudio confirmamos el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico de *C. ficifolia*. Esta especie ha sido utilizada tradicionalmente como extracto acuoso,

sin embargo, al ser un fruto compuesto principalmente por carbohidratos, producto del metabolismo primario, dificulta la separación de sus compuestos, haciendo difícil llevar a cabo los estudios fitoquímicos para la identificación de compuestos responsables de las actividades biológicas que corresponden al metabolismo secundario. Las preparaciones de menor polaridad, como el extracto acetónico, así como la fracción de acetato de etilo (obtenida de una separación líquido/líquido del extracto acuoso), disminuyeron la presencia de compuestos polares, como los azúcares que corresponden al metabolismo primario. La fracción de acetato de etilo es una mezcla de compuestos menos compleja en comparación con el extracto acuoso, pero se deriva de ella, conteniendo compuestos presentes en el extracto acuoso en mayor proporción, que podrían conferir algunos de los efectos benéficos que se han encontrado hasta ahora.

Las pruebas *in vivo* demostraron que la fracción de acetato de etilo conserva la actividad hipoglucémica observada en el extracto acuoso y tiene un efecto antihiperoglucémico aún mayor. Este efecto farmacológico sugiere la presencia de compuestos activos en dicha preparación.

Considerando que la actividad biológica se conserva en la fracción de acetato de etilo, la presencia de menor cantidad de compuestos muy polares como carbohidratos o azúcares representa una ventaja para lograr la separación e identificación de compuestos.

La parte vegetal utilizada para los extractos es el fruto, el cual contiene gran cantidad de compuestos fenólicos que se presentan en forma conjugada, con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo. En algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por esta razón, es muy común encontrar a los compuestos fenólicos como glicósidos, lo cual les aporta solubilidad en agua y en disolventes orgánicos. Así, estos compuestos son abundantes en las tres preparaciones: extracto acuoso, extracto acetónico y en la fracción de acetato de etilo de *C. ficifolia*. Los azúcares asociados a los compuestos fenólicos pueden ser monosacáridos, disacáridos u

oligosacáridos. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

A pesar de que *C. ficifolia* tiene diversos efectos benéficos, uno de los más estudiados es el efecto hipoglucémico. El mecanismo implicado en este caso, así como el relacionado con el efecto antihiper glucemiante que observamos en la fracción de acetato de etilo, podría estar asociado con dos fenómenos clave, ambos implicados con el metabolismo de glucosa: la secreción de insulina y la sensibilidad a la misma, los cuales están relacionados también con el receptor PPAR γ y uno de sus genes diana; GLUT-4. Este es el transportador de glucosa más abundante en tejidos como músculo esquelético y tejido adiposo, y se encarga de dar paso a la glucosa hacia el interior de las células.

Tomando en cuenta la importancia de encontrar los compuestos responsables de esta actividad, realizamos un fraccionamiento biodirigido, es decir, separaciones del extracto guiadas por la secreción de insulina y la expresión de GLUT-4. En estudios anteriores con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, se observaron incrementos en la secreción de insulina y en la expresión de GLUT-4. Así, estos modelos son convenientes para rastrear las moléculas bioactivas en el extracto.

Con el apoyo de CLAR y cromatografía en capa fina, en el fraccionamiento primario de la fracción de acetato de etilo se observó que las fracciones resultantes contienen numerosas entidades químicas, algunas presentes simultáneamente en más de una fracción, C1F2 y C1F3, con una composición química similar, así como C1F4 y C1F5, que comparten un par de compuestos en diferentes proporciones. Se podría esperar que esta composición diferencial podría impactar en los resultados de las pruebas biológicas.

Se logró identificar dos de los compuestos mayoritarios: el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA) en la fracción de acetato de etilo, presente en la fracción F2.4, derivado de C1F2, y el β -sitosterol proveniente de la sub-fracción F1.1 derivada de C1F1. Se comparó la actividad biológica entre los compuestos comercialmente adquiridos (con mayor grado de pureza) y los compuestos separados de las fracciones de *C. ficifolia*. En el caso de 4-HBA, el compuesto comercial aumentó la secreción de

insulina y especialmente la expresión de GLUT-4 de manera más eficaz que las fracciones.

La expresión de PPAR γ se evaluó en células C2C12. La activación de PPAR γ aumenta la sensibilidad en tejidos insulino-dependientes, como el músculo esquelético, aumentando las adipocinas sensibilizadoras a la insulina, especialmente adiponectina, un intermediario de los efectos sistémicos derivados de la activación de PPAR γ . El 4-HBA aumentó 3 veces la expresión de PPAR γ , acercándose a la pioglitazona, un agonista de PPAR γ utilizado como fármaco de referencia. El 4-HBA también aumentó la expresión de adiponectina.

Se ha reportado en la literatura que otras fracciones ricas en 4-HBA ejercen efecto hipoglucémico en modelos murinos de diabetes experimental y sanos (Peungvicha et al., 1998), lo cual se confirmó en el modelo de ratones diabéticos. Además del efecto hipoglucémico, también se observó un contundente efecto antihiperoglucémico. Además del 4-HBA, otros ácidos fenólicos afectan el control de la glucosa y la función de la insulina, principalmente a través de sus efectos moduladores en la promoción de la translocación de GLUT-4 a través de las vías de la proteína cinasa activada por AMP/PI3K/Akt (AMPK).

Los efectos biológicos de algunos ácidos fenólicos presentes en *C. ficifolia*, como el p-cumárico y el gálico, se han descrito en trabajos anteriores. Estos compuestos podrían estar generando efecto antihiperoglucémico por estimulación de la actividad de AMPK y el transporte de glucosa independiente de la insulina en el músculo esquelético (Yoon et al., 2013), mientras que otros compuestos fenólicos, como la salicina, pueden mejorar la sensibilidad a la insulina al suprimir la señalización de IKK/NF- κ B (Hawley et al., 2012).

C. ficifolia ejerce diversos efectos antidiabéticos, incluido el antihiperoglucémico por medio de numerosas moléculas que se pueden agrupar por sus características químicas. Algunos de los compuestos que constituyen esta especie son activos sobre diferentes modelos biológicos y aunque identificamos compuestos activos mayoritarios, los resultados sugieren que los efectos beneficiosos sobre el estado general de los pacientes con enfermedades complejas como la diabetes, se deben

a una acción sinérgica de las diversas entidades químicas con efecto antioxidante, antiinflamatorio, secretagogo, entre otros.

En el presente estudio se identificaron fitoesteroles y ácidos grasos en la fracción C1F1 y subfracciones derivadas, siendo el β -sitosterol el más abundante en su subfracción más activa F1.1 con doble efecto sobre la insulina y el GLUT-4. C1F1 es representativo de los compuestos menos polares presentes en *C. ficifolia*, como fitoesteroles y ácidos grasos. Dicha fracción ejerció un doble efecto: secretagogo, aumentando la secreción de insulina y potenciador de la expresión de GLUT-4.

Se continuó la separación de C1F1 para identificar otras moléculas con potencial efecto antidiabético. Las fracciones secundarias obtenidas de esta separación (F1.1, F1.2, F1.3) se analizaron mediante CG/EM. Dentro de estas fracciones secundarias se distribuyen compuestos de baja polaridad. F1.1 está compuesto mayoritariamente por fitoesteroles y una baja proporción de ácidos grasos, mientras que F1.2 tiene, por el contrario, baja proporción de fitoesteroles y mayoritariamente ácidos grasos; a su vez, F1.3 se compone por ácidos grasos. Los efectos más notorios, tanto secretagogos como en la expresión de GLUT-4, se encuentran en la fracción que tiene predominio de fitoesteroles (F1.1), acotando los posibles compuestos responsables del efecto antihiper glucémico.

El compuesto más abundante en esta fracción fue el β -sitosterol, el cual forma parte de la familia de los fitoesteroles, metabolitos secundarios de las plantas. Los fitosteroles son claves en la formación de microdominios o agregados lipídicos que compartimentalizan procesos celulares en la membrana plasmática. Desempeñan también un papel primordial en la regulación de fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática. Son precursores hormonales, involucrados en el proceso de embriogénesis de la planta y tienen un papel fundamental en el crecimiento y morfogénesis. Al igual que los compuestos fenólicos, también participan en la defensa ante estrés biótico o abiótico, fungiendo como señalizadores moleculares. Se han identificado 250 estructuras diferentes de fitoesteroles (Roche et al., 2008)

Hay informes del β -sitosterol que describen su efecto antihiper glucémico, aumento de la secreción de insulina e incluso la regeneración de las células pancreáticas β

dañadas (Ramu et al., 2016; Soni et al., 2018). En otros estudios (Kurano et al., 2018) también se ha evaluado su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio, donde se ha sugerido que el β -sitosterol podría suprimir la inflamación crónica relacionada con la obesidad que, a menudo, se relaciona con enfermedades metabólicas, una propiedad que se ha descrito para *C. ficifolia*, el cual podría ser uno de los muchos mecanismos que contribuyen a mejorar el estado general de la diabetes. El β -sitosterol está presente en muchas especies vegetales. Estos antecedentes sobre el β -sitosterol respaldan el aumento de la secreción de insulina que observamos con el tratamiento con C1F1 en las células RINm5F y el aumento de la expresión de GLUT-4, que podría lograrse mediante la activación de PPAR γ , un miembro de la subfamilia PPAR de receptores nucleares/factores de transcripción.

PPAR γ está presente en muchos tejidos, como tejido adiposo y músculo, e interviene en la regulación metabólica a través de la expresión de varios genes. Uno de ellos es el GLUT-4, que regula la captación de glucosa en la célula. Se sabe que su activación mejora el estado inflamatorio, reduce la expresión de citocinas, sensibiliza tejidos como el tejido adiposo y el músculo esquelético a la respuesta de la insulina, lo que también resulta en niveles glucémicos más bajos, entre otros efectos benéficos (Amin et al., 2010) ya que, no solo regula genes relacionados con el metabolismo, sino también genes de inmunidad e inflamación. PPAR γ puede ser activado por compuestos dietéticos y sus metabolitos; sus ligandos endógenos comprenden moléculas lipídicas como ácidos grasos, prostanoïdes y eicosanoïdes (Itoh et al., 2008). También se ha encontrado que muchos metabolitos vegetales, como los glucósidos triterpénicos de tipo cucurbitano, los ácidos grasos, los galotanimos, la epicatequina, los flavonoides y los fitoesteroles como el sitosterol, activan el PPAR γ (Moustafa & Thabet, 2017; Wang et al., 2014).

Hallazgos importantes indican que los compuestos que son agonistas de PPAR γ pueden tener cierta actividad agonista sobre GPR40, un receptor presente en las células β -pancreáticas, que se une a ácidos grasos libres de cadena media/larga y que puede promover la secreción de insulina. Para estudiar la posible dinámica de la unión de moléculas, realizamos un acoplamiento molecular con los fitoesteroles

que están presentes en la fracción F1.1 y también con el compuesto 4-HBA identificado en las fracciones activas C1F2 y F2.4, las cuales ejercieron, tanto el efecto de secreción de insulina como el de incremento en la expresión de GLUT4.

PPAR γ y los fitoesteroles como stigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol-5, stigmasta-5,22-dien-3-ol, campesterol, stigmast-7-en-3-ol interactuaron en un sitio lipofílico cercano a SER342 a través de enlaces de hidrógeno; esta interacción de aminoácidos está presente en la mayoría de los agonistas parciales. Los agonistas parciales tienen la ventaja de producir menos efectos secundarios en comparación con los pan-agonistas, conservando el efecto moderado.

4-HBA tiene afinidad hacia un sitio externo cerca del aminoácido GLN286; un residuo de aminoácido clave en la estabilización de la hélice 12 del receptor; las sustituciones en este aminoácido reducen drásticamente la actividad basal y previenen la activación del receptor, lo que hace que este residuo sea importante para la activación. La energía de unión del 4-HBA a PPAR γ es de -5,1 Kcal/mol, una puntuación baja que sugeriría agonismo parcial y unión reversible. Tanto el estigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol como el estigmasta-5,22-dien-3-ol mantienen la puntuación más alta con -9,7 Kcal/mol, seguidos por el campesterol y el β -sitosterol con -9,5 Kcal/mol, estigmast-7-en-3-ol con -9,1 Kcal/mol. Para el receptor GPR-40, la mayoría de los fitoesteroles interactúan con un sitio externo cerca de PHE141, el β -sitosterol interactúa en un segundo sitio entre los bucles del receptor.

El 4-HBA interactúa en un sitio interno, cerca de ARG245 y LEU137 a través de enlaces de hidrógeno, adyacentes a los sitios de interacción primordiales. La mayoría de los fitoesteroles obtuvieron una puntuación similar, siendo stigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol-5 la puntuación más alta con -8,5 Kcal/mol, β -sitosterol y nuevamente 4-HBA la puntuación más baja con -6,9 y -6,5 Kcal/mol, respectivamente. El modo en el que 4-HBA se une, comparado con el modo en que los pan-agonistas se unen, podría implicar una ventaja, en donde se conserva la actividad biológica o la actividad agonista del receptor, pero de manera parcial, con menos efectos secundarios indeseables y esto, a su vez, podría considerarse importante en el diseño de nuevos fármacos con mecanismos novedosos.

Con respecto a los compuestos fenólicos presentes en *C. ficifolia*, la identificación de estos es de suma importancia y posiblemente tengan un papel primordial en algunos de los efectos que se han reportado previamente, particularmente el efecto antioxidante.

Se ha establecido que los compuestos fenólicos tienen un efecto antioxidante por sus grupos hidroxilo y que pueden oxidarse antes que otras especies susceptibles de ser oxidadas, así como también son capaces de recuperar su estado reducido por interacciones de otros grupos funcionales de sus estructuras químicas con distintos metabolitos presentes en el medio. Este efecto puede mejorar el funcionamiento celular, así como proveer de protección, aunque por sus características fisicoquímicas también podrían participar en distintas reacciones del metabolismo celular y procesos de óxido-reducción.

Algunos compuestos fenólicos, como la quercetina, han reportado producir un incremento en la secreción de insulina por un mecanismo dependiente de calcio (Bardy et al., 2013). Se ha reportado que el extracto de *C. ficifolia* actúa como secretagogo y que el mecanismo por el cual promueve la secreción de insulina, está relacionado con el incremento en la concentración de calcio intracelular proveniente del retículo endoplásmico (Miranda-Perez et al., 2016). Teniendo en cuenta que los compuestos ácido p-cumárico, ácido gálico, catequina, y ácido 4-hidroxifenilacético fueron compuestos fenólicos identificados en *C. ficifolia*, y produjeron un incremento en la secreción de insulina en una manera muy similar entre ellos, por su naturaleza química y su estructura, el mecanismo involucrado podría ser el incremento en las concentraciones de calcio de retículo endoplásmico reportado por Miranda-Perez.

En el caso de la quercetina, potencia la secreción de insulina incluso en la ausencia de otros estímulos, como glucosa o despolarización de membrana. La secreción de insulina inducida por quercetina involucra un aumento en las concentraciones de calcio, mediadas por un efecto directo en los canales tipo L. El mecanismo está basado en un cambio en la activación de los canales de calcio dependiente de voltaje, favoreciendo su apertura en el potencial de membrana de reposo. Tomando en cuenta que la quercetina es un flavonoide, existen varios reportes en la literatura

que demuestran que los flavonoides producen un efecto secretagogo; compuestos fenólicos sencillos como los que se identificaron en el presente estudio en *C. ficifolia*.

Otros mecanismos por los cuales se ha justificado la acción antidiabética de algunos fenoles, ha sido a través de la activación de la proteína-cinasa activada por AMP (AMPK) en tejido adiposo, tejido muscular e hígado. La AMPK estimula descomposición de ácidos grasos en hígado y músculos y regula la secreción de insulina en el páncreas. Su activación va de la mano con un incremento GLUT4 en tejido adiposo y músculo esquelético; además inhibe la gluconeogénesis hepática. Del mismo modo, desactiva o inhibe la síntesis de ácidos grasos por medio de la inhibición de acetil-CoA carboxilasa, y activa por medio de Acil-CoA oxidasa y carnitina palmitoiltransferasa-1A en hígado (Miranda, 2017). Por medio de estos fenómenos, a los compuestos fenólicos se les ha atribuido propiedades benéficas en el contexto del padecimiento de la diabetes; como hipolipemiente y antioxidante, entre otras, adicional al hecho de que el efecto antioxidante puede contribuir a que muchos otros procesos biológicos se regularicen, al eliminar el desbalance redox. Por lo tanto, la evaluación del efecto de los compuestos fenólicos aquí identificados sobre AMPK resultaría de gran importancia.

Los fenoles también son llamados fenilpropanoides y son metabolitos secundarios de las plantas. Los metabolitos secundarios provienen de reacciones posteriores que experimentan las sustancias sintetizadas en el metabolismo primario. Además, estos metabolitos no presentan una función definida en los procesos básicos, como fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Difieren de los metabolitos primarios en que presentan una distribución no uniforme en el reino vegetal, ya que no todos ellos se encuentran en todos los grupos de plantas, además se sintetizan en pequeñas cantidades.

Los fenilpropanoides o compuestos fenólicos derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Son un grupo muy diverso que comprende, desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos aquí presentados, hasta polímeros complejos como taninos condensados o lignina. Dentro de los compuestos fenólicos también

se encuentran los flavonoides, como la quercetina. La síntesis de los fenilpropanoides deriva del ácido shikímico en la “ruta de los fenilpropanoides o del ácido shikímico”, a través de la cual las especies vegetales biosintetizan más de 8000 compuestos fenólicos y polifenólicos, cuya característica más relevante es su comportamiento antioxidante. Además de su acción antioxidante, o como consecuencia de ella, poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos. Los polifenoles poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos, además de que en algunos estudios han demostrado que pueden inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), lo cual justificaría sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Quiñones et al., 2012).

Hay polifenoles cuyo papel en la fisiología de la planta es ejercer una función de señalización celular en condiciones de estrés abiótico. Actúan como estabilizadores de membranas celulares, interactuando con fosfolípidos asimétricos y formando complejos con componentes específicos de membrana para mantener el grado de fluidez. Se ha observado en especies vegetales que las concentraciones de compuestos fenólicos aumentan en condiciones de estrés, por lo cual se considera que tienen un papel en la tolerancia al estrés. El efecto antioxidante cobra importancia en la misma fisiología de la especie vegetal, reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cloroplastos, manteniendo un estado adecuado para la estructura y función de las membranas tilacoidales (Buchanan, Gruissem et al., 2015). Existen muchos factores que incrementan el estrés y que incrementan los niveles de ROS, como estrés hídrico, salinidad, exceso de luz, bajas temperaturas. Los compuestos fenólicos que observamos dentro de la especie de *C. ficifolia*, se han relacionado con respuesta ante heridas en la planta o a déficit de nutrientes como el hierro (Agarwal & Jha, 2010).

Por último, el incremento en la secreción de insulina, de la mano con el aumento en la expresión de GLUT-4 y los efectos sensibilizantes producidos por el incremento en adiponectina, trabajan de manera sinérgica y se ven reflejados a nivel de organismo en reducir la glucemia y al mismo tiempo evitar niveles altos de glucosa

en sangre, fenómenos que fueron observados en el modelo de ratones con diabetes inducida con STZ.

11. CONCLUSIÓN

La fracción de acetato de etilo, proveniente de una bipartición del extracto acuoso de *C. ficifolia*, produce efecto hipoglucémico en pruebas glucémicas en ayuno y efecto antihiperoglucémico en la prueba de tolerancia a la glucosa oral.

A través de un fraccionamiento biodirigido y en función de la efectividad del extracto de *C. ficifolia*, se rastreó su efecto antihiperoglucémico. Se logró identificar a los compuestos ácido 4-hidroxibenzoico y β -sitosterol como compuestos mayoritarios de la fracción de acetato de etilo, los cuales se proponen como los responsables de la actividad antidiabética, específicamente del efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico.

El ácido 4-hidroxibenzoico y el β -sitosterol tienen actividad dual; promoviendo la secreción de insulina en células RINm5F, así como la expresión de PPAR γ y consecuentemente la expresión de GLUT-4 y adiponectina en células C2C12. Estos compuestos también incrementaron la acumulación de glucógeno en células HepG2.

Estos compuestos pueden tener varios efectos: aumentan la secreción de insulina y su acción en músculo esquelético y adipocito; esto a través de la activación de PPAR γ y la producción de adiponectina.

Las acciones observadas a nivel celular del ácido 4-hidroxibenzoico y del β -sitosterol se manifiestan como efectos hipoglucémico y antihiperoglucémico en ratones diabéticos, y pueden explicar la acción hipoglucemiante de *C. ficifolia* reportada previamente.

12. PERSPECTIVAS

Con los compuestos identificados:

- 1.- Medir niveles de proteína PPAR γ en células musculares y/o adipocitos por Western Blot.
- 2.- Realizar estudios biológicos sobre el receptor GPR40.
- 3.- Evaluar la capacidad anti-inflamatoria y antioxidante en modelos in vivo.
- 4.- Realizar estudios de relación estructura-actividad (SAR) y de relación cuantitativa entre estructura y actividad (QSAR).

13. REFERENCIAS

- Acosta-Patiño, J. L., Jiménez-Balderas, E., Juárez-Oropeza, M. A., & Díaz-Zagoya, J. C. (2001). Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 99–101.
- Agarwal, Pradeep & Jha, Bhavanath. (2010). Transcription factors in plant and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum*. 54. 201-212.
- Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., & Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 211–222.
- American Diabetes Association, A. D. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 Suppl 1(Suppl 1), S62-9.
- Amin, R. H., Mathews, S. T., Camp, H. S., Ding, L., & Leff, T. (2010). Selective activation of PPAR γ in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(1), E28–E37.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82.
- Barbour, L. A., McCurdy, C. E., Hernandez, T. L., Kirwan, J. P., Catalano, P. M., &

- Friedman, J. E. (2007). Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*, 30 Suppl 2 (Supplement 2), S112-9.
- Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J. F., Ravier, M. A., Bertrand, G., Dalle, S., Cros, G., Magous, R., Oiry, C. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(5), 1102-1113.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & sons.
- Cho, J. Y., Moon, J. H., Seong, K. Y., & Park, K. H. (1998). Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(11), 2273–2276.
- Pérez, M. (2007). *El adipocito como órgano endocrino. implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas*. *Revista Med*, 15(2), 225-242.
- Dhiman, K., Gupta, A., Sharma, D. K., Gill, N. S., & Goyal, A. (2012). A Review on the Medicinally Important Plants of the Family Cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 4(1), 16–26.
- Diaz-Flores, M., Angeles-Mejia, S., Baiza-Gutman, L. A., Medina-Navarro, R., Hernandez-Saavedra, D., Ortega-Camarillo, C., Roman-Ramos R., Cruz, M., Alarcon-Aguilar, F. J. (2012). Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouche on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), 101–108.
- Dymkowska, D. (2016). Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes - the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Postepy Biochemii*. *Postepy Biochem*, 62(2):116-126..
- Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., & Folli, F. (2013). Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 19(32), 5695–5703.
- Fortis-Barrera, Á., Alarcón-Aguilar, F. J., Banderas-Dorantes, T., Díaz-Flores, M., Román-Ramos, R., Cruz, M., & García-Macedo, R. (2013). *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(10), 1563–1576.

- Gerich, J. E. (2000). Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2(6):345-50.
- Hawley, S. A., Fullerton, M. D., Ross, F. A., Schertzer, J. D., Chevtzoff, C., Walker, Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, Schertzer JD, Chevtzoff C, Walker KJ, Peggie MW, Zibrova D, Green KA, Mustard KJ, Kemp BE, Sakamoto K, Steinberg GR, Hardie DG.(2012). The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science*, 336(6083), 918–922.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867
- Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 656–662.
- Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, L., Yamamoto, K., Schwabe, J. W. R. (2008). Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(9), 924–931.
- García, J., Lorenzana M., Zamilpa, A., Almanza-Perez, J.C., Villagomez I., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J. (2017). Chemical characterization of a hypoglycemic extract from *Cucurbita ficifolia* Bouché that induces liver glycogen accumulation in diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(3), 218–230.
- Kang, Q., & Yang, C. (2020). Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biology*, 37, 101799.
- Khavandi, K., Amer, H., Ibrahim, B., & Brownrigg, J. (2013). Strategies for preventing type 2 diabetes: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 4(5), 242–261.
- Koeck, P., Bastiaens, H., Benhalima, K., Cloetens, H., Feyen, L., Sunaert, P., Van Pottelbergh I., Van Leeuwen, E., Verhaegen A., Nobels, F. (2015). Diabetes Mellitus type 2. *Domus Medica* . 1-110
- Kurano, M., Hasegawa, K., Kunimi, M., Hara, M., Yatomi, Y., Teramoto, T., & Tsukamoto, K. (2018). Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(2), 191–198.
- Miranda-Perez, M. E., Ortega-Camarillo, C., Del Carmen Escobar-Villanueva, M., Blancas-Flores, G., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2016). *Cucurbita ficifolia* Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 159–166.
- Moustafa, E. M., & Thabet, N. M. (2017). Beta-sitosterol upregulated paraoxonase-

- 1 via peroxisome proliferator-activated receptor- γ in irradiated rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(6), 661–666.
- Peungvicha, P., Tamsiririrkkul, R., Prasain, J. K., Tezuka, Y., Kadota, S., Thirawarapan, S. S., & Watanabe, H. (1998). 4-Hydroxybenzoic acid: A hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(1), 79–84.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89.
- Ramu, R., Shirahatti, P. S., Nayakavadi, S., Zameer, F., Lakkappa Dhananjaya, B., & Prasad, N. M. (2016). The effect of a plant extract enriched in stigmaterol and β -sitosterol on glycaemic status and glucose metabolism in alloxan-induced diabetic rats. *Food & Function*, 7, 3999.
- Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metabolism*, 17(1), 20.
- Rautio, J., Meanwell, N. A., Di, L., & Hageman, M. J. (2018). The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 17:8, 17(8), 559–587.
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(11), 3577–3585.
- Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., ... Simon-Plas, F. (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *The FASEB Journal*, 22(11), 3980–3991.
- Roman-Ramos, R., Almanza-Perez, J. C., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T. R., Zamilpa-Alvarez, A., Diaz-Flores, M., Jasso, I., Blancas-Flores, G., Gomez, J., Alarcon-Aguilar, F. J. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in streptozotocin-induced diabetes mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 40(1), 97–110.
- Román-Ramos, R., Flores-Sáenz, J. L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A., & Alarcón-Aguilar, F. (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigacion Medica*, 22(1), 87.
- Soni, L. K., Dobhal, M. P., Arya, D., Bhagour, K., Parasher, P., & Gupta, R. S. (2018). In vitro and in vivo antidiabetic activity of isolated fraction of *Prosopis cineraria* against streptozotocin-induced experimental diabetes: A mechanistic study. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 1015–1021.

- Verbovoy, A. F., Pashentseva, A. V., & Verbovaya, N. I. (2019). [Diabetic macroangiopathy]. *Terapevticheskii Arkhiv*, 91(10), 139–143.
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., Blazevic, T., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Heiss, E. H., Schuster, D., Kopp, B., Bauer, R., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 73–89.
- Yoon, S. A., Kang, S. II, Shin, H. S., Kang, S. W., Kim, J. H., Ko, H. C., & Kim, S. J. (2013). P-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(4), 553–557.

Open camera or QR reader and
scan code to access this article
and other resources online.



AU1 ▶ 4-Hydroxybenzoic Acid and β -Sitosterol from *Cucurbita ficifolia* Act as Insulin Secretagogues, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonists, and Liver Glycogen Storage Promoters: *In Vivo*, *In Vitro*, and *In Silico* Studies

AU2 ▶ Wendoline Rosiles-Alanis,¹ Alejandro Zamilpa,² Rebeca García-Macedo,³ Miguel A. Zavala-Sánchez,⁴ Sergio Hidalgo-Figueroa,⁵ Beatriz Mora-Ramiro,⁶ Rubén Román-Ramos,⁶ Samuel E. Estrada-Soto,⁷ and Julio C. Almanza-Perez⁶

AU3 ▶ ¹Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México.
²Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, México.
³UIM en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Ciudad de México, México.
⁴Depto. Sistemas Biológicos, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México.
⁵CONACyT, IPICYT/Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, San Luis Potosí, México.
⁶Depto. Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México.
⁷Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México.

ABSTRACT Insulin secretion and GLUT4 expression are two critical events in glucose regulation. The receptors G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) modulate these processes, and they represent potential therapeutic targets for new antidiabetic agent's design. *Cucurbita ficifolia* fruit is used in traditional medicine for diabetes control. Previous studies demonstrated several effects: a hypoglycemic effect mediated by an insulin secretagogue action, antihyperglycemic effect, and promoting liver glycogen storage. Anti-inflammatory and antioxidant effects were also reported. Moreover, some of its phytochemicals have been described, including D-chiro-inositol. However, to understand these effects integrally, other active principles should be investigated. The aim was to perform a chemical fractionation guided by bioassay to isolate and identify other compounds from *C. ficifolia* fruit that explain its hypoglycemic action as insulin secretagogue, its antihyperglycemic effect by PPAR γ activation, and on liver glycogen storage. Three different preparations of *C. ficifolia* were tested *in vivo*. Ethyl acetate fraction derived from aqueous extract showed antihyperglycemic effect in an oral glucose tolerance test and was further fractionated. The insulin secretagogue action was tested in RINm5F cells. For the PPAR γ activation, C2C12 myocytes were treated with the fractions, and GLUT-4 mRNA expression was measured. Chemical fractionation resulted in the isolation and identification of β -sitosterol and 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA), which increased insulin secretion, GLUT4, PPAR γ , and adiponectin mRNA expression, in addition to an increase in glycogen storage. 4-HBA exhibited an antihyperglycemic effect, while β -sitosterol showed hypoglycemic effect, confirming the wide antidiabetic related results we found in our *in vitro* models. An *in silico* study revealed that 4-HBA and β -sitosterol have potential as dual agonists on PPAR γ and GPR40 receptors. Both compounds should be considered in the development of new antidiabetic drug development.

KEY WORDS: • 4-hydroxybenzoic acid • β -sitosterol • Cucurbitaceae • *Cucurbita ficifolia* • diabetes mellitus • GLUT-4 • glycogen storage • insulin secretagogue • PPAR γ



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

Nº: 00140

Matrícula: 2143800991

Estudio químico biodirigido de *Cucurbita ficifolia* Bouché en modelos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos: análisis *In vivo*, *In vitro* e *In silico*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 25 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
- DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR
- DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY
- DRA. REBECA GARCIA MACEDO



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: ROSARIO WENDOLINE ROSILES ALANIS

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

APROBAR

RENÓ

MTRA. ROSARIO SERVANDO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR

VOCAL

DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY

SECRETARIA

DRA. REBECA GARCIA MACEDO