



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Doctorado en Biología Experimental**

**Triterpenos de *Hibiscus sabdariffa* L. con efecto  
multimodal PPAR $\delta/\gamma$  y AMPK $\alpha$ 1: estudios *in vivo*, *in vitro* e  
*in silico***

**TESIS**

Que para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

**P R E S E N T A**

**M. en B. E. Abraham Giacoman Martínez**

12 de diciembre del 2019

Codirectores

**Dr. Julio César Almanza Pérez**

**Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**

Asesor

**Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

## **Comité tutorial**

### **Codirector**

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Laboratorio de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

CDMX, México.

[jcap@xanum.uam.mx](mailto:jcap@xanum.uam.mx)

### **Codirector**

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Departamento de Fitoquímica Farmacológica, Centro de

Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del

Seguro Social, Xochitepec, Morelos, México

[azamilpa\\_2000@yahoo.com.mx](mailto:azamilpa_2000@yahoo.com.mx)

### **Asesor**

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Laboratorio de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

CDMX, México.

[aaaf@xanum.uam.mx](mailto:aaaf@xanum.uam.mx)

“El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el nivel consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Para la realización de los estudios de doctorado el alumno Abraham Giacoman Martínez contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de becario 302036/CVU: 566521.

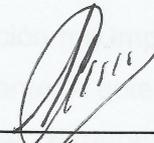
## **Miembros del jurado**

Los miembros del jurado fueron designados 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. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada **“Triterpenos de *Hibiscus sabdariffa* L. con efecto multimodal PPAR $\delta$ / $\gamma$  y AMPK $\alpha$ 1: estudios *in vivo*, *in vitro* e *in silico*”**, con fecha de presentación para obtener el grado de doctorado el día 12 de diciembre del 2019.

## Jurado

**Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Ciencias de la Salud D. C. B. S.  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
CDMX, México.  
[aaaf@xanum.uam.mx](mailto:aaaf@xanum.uam.mx)

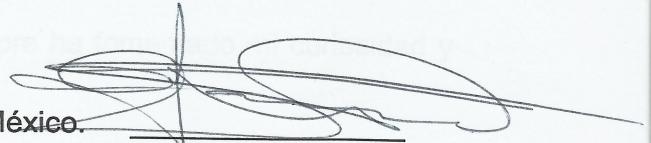


---

Presidente

**Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.**

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del  
Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos 62209, México.  
Correo electrónico: [gabriel\\_navarrete@uaem.mx](mailto:gabriel_navarrete@uaem.mx)



---

Secretario

**Dr. Samuel Enoch Estada Soto**

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del  
Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos 62209, México.  
Correo electrónico: [enoch@uaem.mx](mailto:enoch@uaem.mx)

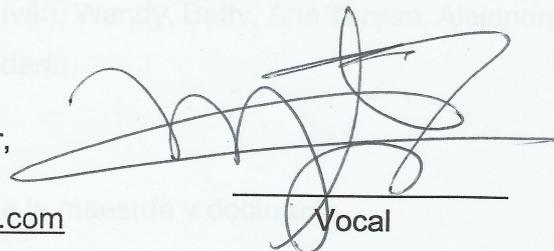


---

Vocal

**Dr. Manases González Cortazar.**

Centro de Investigación Biomédica del Sur,  
IMSS, Xochitepec Morelos, México.  
correo electrónico: [gmanases2000@gmail.com](mailto:gmanases2000@gmail.com)

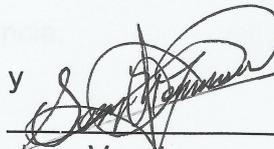


---

Vocal

**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa.**

CONACyT, IPICYT/Consortio de Investigación, Innovación y  
Desarrollo para las Zonas Áridas, San Luis Potosí, México.  
Correo electrónico: [sergio.hidalgo@ipicyt.edu.mx](mailto:sergio.hidalgo@ipicyt.edu.mx)



---

Vocal

## **Dedicatorias**

A mis padres Naela y Javier, quienes con amor, esmero y dedicación me impulsaron a salir adelante. Por motivarme a seguir en el camino del conocimiento. A quienes con su ejemplo y actitud me enseñaron a persistir y no doblegarme. Esperando que siempre se sientan orgullosos de mí y de que tengan presente que este pequeño logro también es de ustedes.

A mi abuela Helena, por su apoyo y por qué siempre ha fomentado mi curiosidad y pensamiento crítico.

A mis hermanos Ismael y Jacobo, por su amistad, su ejemplo y confianza.

A Carolina por su compañía, apoyo genuino e incondicional en todo momento.

A mi director de tesis y amigo Julio, por su amistad, confianza, ejemplo, apoyo y consejos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Iván, Wendy, Betty, Ana Teresa, Alejandra y Rodrigo por las risas, compañía y camaradería.

A l@s doctor@s:

Alejandro Zamilpa por su apoyo a lo largo de la maestría y doctorado.

Fengyang Huang por acogerme en su laboratorio en tiempos difíciles, por su confianza en mí y por brindarme el nexo de mi estancia en Nantes, Francia.

Francisco J. Alarcón por sus consejos.

Dedicada a todos ustedes porque de alguna u otra forma formaron parte este proceso.

## **Frases que me inspiraron en mi formación académica**

*“La ciencia en esencia es rebeldía, la ciencia es una revolución en sí misma, con la bandera del pensamiento crítico por delante”. “El científico rebelde”, **Freeman Dyson.***

*“Equipado con sus 5 sentidos, el hombre explora el universo que lo rodea y a sus aventuras les llama ciencia”. **Edwin Powell Hubble.***

*“En el fondo los científicos somos personas con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”. **Lee Smolin.***

*“Alguien que es curioso no es tonto. Las personas que no hacen preguntas permanecen ignorantes el resto de su vida” **Neil DeGrasse Tyson.***

*“La curiosidad es una cualidad única, es la naturaleza del ser humano, la curiosidad es sinónimo de ciencia, sin embargo, la mayoría de los individuos la pierde al permitirse someter a los dogmas establecidos por la sociedad”. **Abraham Giacoman.***

*“El crecimiento personal sólo se alcanza fuera de nuestra zona de confort”.*

*“Los errores no son malos, siempre y cuando se aprenda de ellos”.*

## Índice

Abreviaturas .....	13
Resumen .....	17
Abstract .....	20
1. Introducción .....	23
1.1 Tipos de diabetes mellitus.....	23
1.2 Datos epidemiológicos de la diabetes.....	24
1.3 Factores promotores de la DT2 y sus complicaciones.....	25
1.4 Fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2 .....	28
1.4.1 Sulfonilureas .....	28
1.4.2 Biguanidas .....	29
1.4.3 Inhibidores de alfa glucosidasas .....	29
1.4.4 Inhibidores DPP4 .....	29
1.4.5 Inhibidores SGLT2 .....	30
1.4.6 Agonistas de PPAR $\gamma$ .....	30
1.5. Formas de PPAR, expresión y su participación en el metabolismo .....	31
1.6. Mecanismo de activación de los PPAR.....	32
1.7. Agonistas sintéticos y naturales de PPAR .....	33
1.7. 1. Agonistas sintéticos de PPAR $\alpha$ .....	33
1.7.2. Agonistas sintéticos de PPAR $\delta$ .....	34
Tabla 1. Formas de PPAR, tejidos y órganos de expresión, y su participación metabólica. ....	35
1.7.3. Agonistas sintéticos de PPAR $\gamma$ .....	36
1.7.4. Agonistas sintéticos duales de PPAR .....	36
1.7.5. Agonistas y reguladores naturales de PPAR .....	37
1.7.6. Agonistas naturales duales de PPAR .....	37
1.7.7. Pan agonistas .....	38
1.8 Tejido adiposo y músculo esquelético como modelos de estudio .....	39
1.8.1 Tejido adiposo .....	39

1.7.2	Tejido muscular esquelético .....	40
	Tabla 2. Extractos de plantas con efectos sobre PPAR.....	42
	Tabla 3. Compuestos de plantas medicinales con efecto agonista de PPAR. ....	52
	Tabla 4. Extractos de plantas agonistas duales de PPAR. ....	59
	Tabla 5. Compuestos de origen vegetal agonistas de PPAR. ....	62
	Tabla 6. Extractos de plantas con efecto pan agonista. ....	66
	Tabla 7. Compuestos aislados de plantas con efecto pan agonista .....	67
2.2.	AMPK $\alpha$ 1 y su asociación con los PPAR .....	68
2.3.	Akt2 y su asociación con los PPAR .....	70
2.	Antecedentes.....	71
2.1	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	71
3.	Justificación .....	74
4.	Pregunta de investigación.....	79
5.	Hipótesis .....	79
6.	Objetivos .....	79
6.1	Objetivo general.....	79
6.2	Objetivos particulares.....	79
7.	Metodología.....	81
7.1	Fitoquímica.....	81
7.1.1	Colecta del material vegetal.....	81
7.1.2	Identificación de <i>H. sabdariffa</i> L.....	81
7.1.3	Preparación del material vegetal.....	81
7.1.4	Obtención del HS-DCM .....	82
7.1.5	Fraccionamiento del HS-DCM .....	82
7.1.6	Preparación de reveladores para CCF .....	83
7.1.7	Identificación de compuestos por CG/EM.....	84
7.2.	Estudios <i>in silico</i> .....	85
7.3	Estudios <i>in vitro</i> .....	87
7.3.1	Cultivo de las líneas 3T3-L1 y C2C12.....	87
7.3.2	Prueba de funcionalidad celular (MTT) .....	89

7.3.3 Tratamiento con las fracciones constitutivas de <i>H. sabdariffa</i> .....	90
7.3.4 Aislamiento y cuantificación del RNAm.....	91
7.3.5 Expresión del RNAm por RT-qPCR.....	92
Tabla 8. Primers para el análisis de expresión en células 3T3L1 y C2C12. ....	93
7.3.6 Western blot.....	94
7.3.6.1 Obtención de proteínas totales.....	94
7.3.6.2 Preparación de geles SDS PAGE.....	95
7.3.6.3 Electroforesis de proteínas .....	96
7.3.6.4 Transferencia del gel a membrana de PVDF (trans-blot turbo) .....	97
7.3.6.5 Bloqueo de membrana .....	97
7.3.6.6 Marcación de proteínas de interés con anticuerpos .....	97
7.4 Tinción de rojo oleoso para determinación de acumulación de lípidos .....	99
7.5 Inmunodetección de GLUT4 .....	99
7.6 Estudios in vivo .....	100
7.6.1 Prueba de tolerancia a la glucosa oral.....	100
8. Análisis estadístico.....	101
9. Resultados .....	102
9.1 Fitoquímica .....	102
9.2. Estudios <i>in silico</i> .....	105
9.3 Estudios <i>in vitro</i> .....	110
9.3.1 Pruebas de Funcionalidad celular (MTT) .....	110
9.3.2. Expresión de genes mediante RT-qPCR .....	114
9.3.3. Western blot.....	120
9.3.4. Evaluación de $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la acumulación de lípidos .....	124
9.3.5. Inmunodetección de GLUT4 .....	125
9.4 Estudios <i>in vivo</i> .....	127
9.4.1. Efecto de $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la glucemia .....	128
10. Discusión.....	129
11. Conclusiones.....	139
12. Perspectivas.....	140

13. Bibliografía ..... 141

## Abreviaturas

μl: Microlitro.

μM: Micromolar.

ACCLS: Acil-CoA de cadena larga sintetasa.

ACD: Acil Co-A deshidrogenasa.

ACO: Acil Co-A carboxilasa.

AcoEt: Acetato de etilo.

ACS: Acil Co-A sintetasa.

ADH: Hormona antidiurética.

ADIPO1: Receptor de adiponectina 1.

ADIPO2: Receptor de adiponectina 2.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AGE: Productos avanzados de glicosilación.

AGL: Ácidos grasos libres.

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido.

Akt: Proteína cinasa activada por el factor de crecimiento parecido a la insulina 1.

ALT: Alanina aminotransferasa.

AMPK: Proteína cinasa dependiente de AMP.

AST: Aspartato transaminasa.

C/EBPα: Proteína de unión y amplificación de la caja CCAAT alfa.

C/EBPβ: Proteína de unión y amplificación de la caja CCAAT beta.

C/EBPδ: Proteína de unión y amplificación de la caja CCAAT delta.

C3G: Cianidina 3- glucósido.

CACT: Ceto-acil-CoA tiolasa.

CBP/p300: Proteína coactivadora transcripcional p 300.

CC: Cromatografía en columna.  
CCF: Cromatografía en capa fina.  
cDNA: DNA complementario.  
CK2: Proteína caseína cinasa 2.  
CG/EM: Cromatografía de gases/Espectrometría de masas.  
CPT-I: Carnitin palmitoil transferasa 1.  
CPT-II: Carnitin palmitoil transferasa 2.  
CT: Control.  
DPP4: Dipeptidil peptidasa 4.  
DG: Diabetes gestacional.  
DHA: Ácido eicosapentanóico.  
DT1: Diabetes tipo 1.  
DT2: Diabetes tipo 2.  
DMEM: Dulbecco's médium modified.  
ECHD: Enoil-CoA hidratasa/deshidrogenasa.  
FABP: Proteína de unión a ácidos grasos.  
FAT/CD36: Proteína translocadora de ácidos grasos CD36.  
FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos.  
FEN: Fenofibrato.  
FOS: Fracción rica en oligosacáridos.  
G3D: Glucósido de 3-delfinidina.  
GLP-1: Péptido similar al glucagón 1.  
GLUT4: Transportador de glucosa 4.  
GSK3: Glucógeno sintasa cinasa 3.  
GSK3 $\beta$ : Glucógeno sintasa cinasa 3 beta.  
GyK: Proteína de captura de glicerol.

HMGC: 3Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

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

HS-DCM: Extracto diclorometánico de *H. sabdariffa*.

IL-6: Interleucina 6.

L-16504: Agonista sintético de PPAR $\delta$ .

LPL: Lipoproteinlipasa.

M: Molar.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno.

MCP-1: Proteína quimiotrayente de monocitos 1.

mg: Miligramos.

mM: Milimolar.

$\mu$ M: Micromolar.

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

NCOR: Correpresor nuclear.

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B.

nm: Nanómetros.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBP/TRAP220: Proteína de Unión a PPAR TRAP220.

PBS: Buffer salino de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDK4: Piruvato deshidrogenasa cinasa 4.

PEPCK: Proteína fosfoenol piruvato carboxiquinasa.

PGC-1: Coactivador 1 de PPAR.

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa.

PIO: Pioglitazona.

PKA: Proteína cinasa A.

PKC: Proteína cinasa C.

PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa.

PPAR $\gamma$ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma.

PPAR $\delta$ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas beta.

PPRE. Elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas.

RGS2: Regulador de la señalización de proteína G2.

RI: Resistencia la Insulina.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

RT-qPCR: Real time-quantitative Polimerase chain reaction.

RXR: Receptor retinoide X.

SB3D: Sambubiósido 3-delfinidina.

SM: Síndrome metabólico.

SMRT: Mediador del silenciamiento de receptor de la hormona tiroidea y retinoide.

SRC-1: Coactivador del receptor nuclear 1.

TBC1D1: Tre-2/Bub2/Cdc16 Domain 1.

TC: Colesterol total.

TFA: Ácido trifluoroacético.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

TZD: Tiazolidinediona.

UCP-1: Proteína desacoplante 1.

UCP-2: Proteína desacoplante 2.

UCP-3: Proteína desacoplante 3.

## Resumen

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) son receptores nucleares dependientes de ligando. Hasta la fecha se han descrito tres isoformas: alfa ( $\alpha$ ), delta/beta ( $\delta/\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), que regulan la expresión de genes involucrados en la incorporación y oxidación de lípidos (PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$ ), así como en el metabolismo y captación de glucosa (PPAR $\gamma$ ).

La diabetes tipo 2 (DT2) y otras enfermedades asociadas al síndrome metabólico (SM) se caracterizan por desbalance en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Por esta razón, los PPAR se consideran blancos terapéuticos para el tratamiento de DT2, obesidad, esteatosis hepática, enfermedad cardiovascular y SM.

El tejido adiposo y el músculo esquelético participan en la homeostasis energética, jugando un papel fundamental en el metabolismo de glucosa y lípidos. Se trata de tejidos insulinosensibles involucrados en la resistencia a la insulina, en la cual los PPAR desempeñan un papel importante.

*Hibiscus sabdariffa* L. es una planta cuyos cálices son utilizados tradicionalmente como diurético y agente antiobesidad. Estudios farmacológicos indican que *H. sabdariffa* tiene efecto antihipertensivo y diurético, así como efectos sobre el metabolismo, como agente antiobesidad y antidiabético. Por estos motivos, *H. sabdariffa* puede ser considerada como una fuente interesante de compuestos con acción sobre los PPAR. Estudios previos mostraron que el extracto diclorometánico de *H. sabdariffa* (HS-DCM) posee efecto antihiper glucemiante, con acción dual sobre PPAR $\delta/\gamma$  y sus genes río

abajo (FATP y GLUT4, respectivamente), en adipocitos 3T3-L1. Sin embargo, aún se desconocen, tanto las moléculas responsables de dicha acción, como los mecanismos de acción involucrados.

Los agonistas duales específicos de PPAR $\delta$ / $\gamma$  tienen la posibilidad de revertir el desbalance metabólico presente en la DT2 y otras enfermedades metabólicas, ya que, por un lado, se favorece la incorporación de glucosa y lípidos; mientras que, por otro lado, se aumenta la oxidación de lípidos a través de la  $\beta$ -oxidación, existiendo la posibilidad de evitar los efectos adversos que se han observado con el uso de los agonistas de PPAR $\gamma$  (glitazonas).

La vía AMPK $\alpha$ 1 es considerada una vía principalmente involucrada en el catabolismo de lípidos y la biogénesis mitocondrial. Además, se sabe que regula positivamente a PPAR $\delta$  que, en conjunto, participan en dichos procesos. Por otro lado, la vía Akt2 regula a PPAR $\gamma$  y procesos metabólicos como la adipogénesis, incorporación de glucosa y lípidos. Ambos procesos moleculares y metabólicos se encuentran asociados a procesos sensibilizadores de insulina. Por lo tanto, éstas son vías que deben ser analizadas para elucidar los mecanismos por medio de los cuales el HS-DCM ejerce su acción sobre PPAR $\delta$ / $\gamma$ .

Para el aislamiento de los compuestos presentes en el HS-DCM, éste fue sometido a cromatografía en columna abierta (CC), analizando las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina (CCF). De este proceso se seleccionaron 4 fracciones mayoritarias y se evaluó su efecto sobre la expresión del RNAm de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en adipocitos 3T3-L1 y mioblastos C2C12. La fracción F3 mostró efecto

dual PPAR $\delta$ / $\gamma$  en ambas líneas celulares. Esta fracción se sometió a un nuevo fraccionamiento en CC, resultando en 2 subfracciones: F3-1 y F3-2. Ambas subfracciones mostraron efecto dual PPAR $\delta$ / $\gamma$ , siendo F3-2 más potente, incluso en comparación con L-165041 y pioglitazona en ambas líneas celulares. Se procedió entonces a la identificación de los componentes mayoritarios en F3-1 y F3-2 mediante CG/EM. Los constituyentes principales en F3-1 fueron: ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico y lupeol. En F3-2 fueron  $\alpha$ -amirina y lupeol. Con estos compuestos se realizó un docking molecular para PPAR, en donde  $\alpha$ -amirina y lupeol mostraron una fuerza de unión mayor a L-165041 y  $\alpha$ -amirina mayor a pioglitazona. Posteriormente,  $\alpha$ -amirina y lupeol mostraron efecto sobre la expresión de RNAm y producción de proteínas de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4, además de activar la vía AMPK $\alpha$ 1, siendo  $\alpha$ -amirina la más activa, sin afectar la vía Akt2. El efecto de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre GLUT4 fue corroborado mediante inmunodetección en cultivo de mioblastos C2C12; nuevamente  $\alpha$ -amirina exhibió mayor efecto que pioglitazona. Por su parte, el lupeol mostró un efecto similar al de pioglitazona. Por último,  $\alpha$ -amirina y lupeol redujeron la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 y tuvieron efecto antihiper glucemiante en ratones CD1. LA  $\alpha$ -amirina y el lupeol se perfilan como moléculas interesantes con efectos antidiabéticos que involucran la activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  que, en conjunto con AMPK $\alpha$ 1, regulan el metabolismo de la glucosa y de lípidos, exhibiendo un buen potencial para el tratamiento de la DT2 y otras enfermedades asociadas al SM. Ambos compuestos se proponen para el desarrollo de nuevos fármacos multimodales, relevantes dentro de las nuevas tendencias de tratamiento para enfermedades metabólicas.

## Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent nuclear receptors. Three isoforms of PPAR, alpha ( $\alpha$ ), delta/beta ( $\delta/\beta$ ) and gamma ( $\gamma$ ), all involved in the metabolism of glucose and lipids, have been described to date. PPARs regulate the expression of genes involved in the incorporation and oxidation of lipids (PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$ ), as well as in the metabolism and glucose uptake (PPAR $\gamma$ ). Type 2 diabetes (T2D) and other diseases associated with the metabolic syndrome (MS) are characterized by the imbalance of lipid and carbohydrate metabolism. This is why PPAR are considered therapeutic targets in the treatment of diseases such as T2D, obesity, hepatic steatosis, cardiovascular disease, and MS. Adipose tissue and skeletal muscle are tissues that play an important role in energy homeostasis and have a fundamental role in the metabolism of glucose and lipids. They are insulin-sensitive tissues, being the most compromised tissues in insulin resistance, where PPARs play an important role.

*Hibiscus sabdariffa* L. is a plant whose chalice is traditionally used as a diuretic and anti-obesity agent. Pharmacological studies report that *H. sabdariffa* has anti-hypertensive and diuretic effect, and other properties with effects on metabolism, as anti-obesity and anti-diabetic agents. *H. sabdariffa* is considered an interesting source of compounds that can act through PPAR. Previous studies have reported that dichloromethane extract of *H. sabdariffa* (HS-DCM) has anti-hyperglycemic activity and dual effect on PPAR $\delta/\gamma$  and their regulated FATP and GLUT4 genes, respectively, in

3T3-L1 adipocytes. However, active molecules and the mechanisms by which HS-DCM exerts their effects are yet unknown.

The finding of that the PPAR $\delta$ / $\gamma$  dual agonists might reverse the metabolic imbalance present in T2D and other metabolic diseases. On the one hand, the incorporation of glucose and lipids is favored, and on the other, it increases the oxidation of the latter through  $\beta$ -oxidation, avoiding the adverse effects observed in the use of glitazones.

The AMPK $\alpha$ 1 pathway is mainly involved in lipid metabolism and mitochondrial biogenesis; in addition, it is known that it regulates PPAR $\delta$ , and that both participate in these processes. On the other hand, the Akt2 pathway regulates PPAR $\gamma$  and regulates metabolic processes such as adipogenesis, incorporation of glucose and lipids. Both molecular and metabolic processes are associated with insulin sensitizing processes and are important ways for to elucidate the mechanism by which HS-DCM exerts the dual effect on PPAR $\delta$ / $\gamma$  in association with AMPK $\alpha$ 1 and Akt2.

HS-DCM was subjected to open-column (OC) chromatography and monitored by thin layer chromatography (TLC), four major fractions of the extract were selected and evaluated on mRNA expression of PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP and GLUT4 in 3T3 adipocytes -L1 and myoblasts C2C12. Fraction F3 showed dual effect of PPAR $\delta$ / $\gamma$  in a similar manner in both cell lines. Subsequently F3 was subjected to new fractionation in OC, resulting in 2 sub-fractions; F3-1 and F3-2. Both sub-fractions showed dual effect PPAR $\delta$ / $\gamma$ , however, F3-2 had a more potent effect, including greater than L-165041 and pioglitazone in both cell lines. Next, the major components of F3-1 and F3-2 were elucidated through GCMS. The main constituents in F3-1 were linoleic acid,

palmitic acid, oleic acid and lupeol, on the other hand, in F3-2 were  $\alpha$ -amyrin and lupeol. These compounds were subjected to molecular coupling with PPAR *in silico*, where  $\alpha$ -amyrin and lupeol showed a greater binding-strength than L-165041, being  $\alpha$ -amyrin greater than pioglitazone. Subsequently,  $\alpha$ -amyrin and lupeol increased the mRNA expression and production of PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP and GLUT4, showing activation of the AMPK $\alpha$ 1 pathway, being the  $\alpha$ -amyrin most active. The  $\alpha$ -amyrin did not show effect on Akt2. The effect of  $\alpha$ -amyrin and lupeol on GLUT4 by immunohistochemistry in culture of C2C12 myoblasts showed that  $\alpha$ -amyrin has a greater effect than pioglitazone. On the other hand, lupeol showed a similar effect as pioglitazone. Finally,  $\alpha$ -amyrin and lupeol decreased the accumulation of lipids in 3T3-L1 adipocytes and had an anti-hyperglycaemic effect in normal CD1 mice. Therefore,  $\alpha$ -amyrin and lupeol can be proposed as two interesting molecules with antidiabetic effects through the dual activation of PPAR $\delta/\gamma$ , that together with AMPK $\alpha$ 1, may explain the effects on glucose and lipids observed with *H. sabdariffa*, with possibilities for the T2D control. These compounds can be proposed for the development of new multimodal drugs, relevant in the new trends of treatment of metabolic diseases.

# 1. Introducción

La diabetes mellitus es un reto de salud emergente en todo el mundo como resultado de la urbanización, la alta prevalencia de la obesidad, el sedentarismo y el estrés, asociado con algunos factores genéticos [1]. La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que aparece cuando el organismo no puede producir insulina, o la produce parcialmente, además de que no puede utilizarla eficazmente debido a una desensibilización de las células a dicha hormona [2]. La insulina es una hormona producida en el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos entre en las células del cuerpo, donde es metabolizada y convertida en la energía necesaria para las funciones vitales del organismo [1].

## 1.1 Tipos de diabetes mellitus

Desde el punto de vista clínico se han descrito tres tipos principales de diabetes: diabetes tipo 1 (DT1), diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y diabetes gestacional (DG) [1, 3]. La DT1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema inmune ataca a las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, por lo que, al no producirse insulina, la glucosa no puede ingresar a las células; no se sabe con claridad cuál es la causa de la reacción autoinmune, sin embargo, se ha sugerido que infecciones virales en el páncreas pueden desencadenar la respuesta autoinmune. Las personas con este tipo de diabetes necesitan insulina todos los días para controlar la glucemia [2].

La DT2 es el tipo de diabetes más común, asociado directamente a una dieta alta en lípidos y carbohidratos, sedentarismo y factores genéticos. Por lo general ocurre en

adultos, pero cada vez aparece más en niños y adolescentes. En la DT2 el cuerpo puede producir insulina, sin embargo, las células del organismo no pueden responder a sus efectos, debido a resistencia a la insulina (RI), dando lugar a la acumulación de glucosa en sangre [1].

La DG se define como la intolerancia a los carbohidratos en el embarazo, generando RI, principalmente ocasionada por obesidad y con historial familiar de DT2 [4-6].

La DT2 es una enfermedad asociada con varios desórdenes metabólicos y factores de riesgo cardiovascular, tales como la obesidad, RI, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, estado protrombótico y disfunción endotelial que, en conjunto, son referidas como SM [7, 8].

## **1.2 Datos epidemiológicos de la diabetes**

Los datos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) indican que en el 2019 existen alrededor de 463 millones de personas con diabetes en todo el mundo, y se calcula que este número se incrementará a más de 592 millones en menos de 25 años. Sin embargo, con 175 millones de casos no diagnosticados actualmente, una gran cantidad de personas con diabetes van a desarrollar progresivamente complicaciones, impactando en los sistemas de salud, los cuales no están preparados para atenderlos [9, 10]. Es la quinta causa de mortalidad en la mayoría de los países desarrollados, siendo la mayoría de estas personas de entre 40 y 59 años, y el 80% de ellas vive en países de ingresos medios y bajos.

Todos los tipos de diabetes tienen una incidencia en aumento. En relación con la diabetes tipo 2, ésta casi se duplicará en el año 2035. Se estima que otros 21 millones de casos de altos niveles de glucosa en el embarazo contribuirán a la carga mundial de la diabetes. Cerca del 17% de las madres en 2013 tuvieron algún tipo de alteración de la glucemia durante el embarazo [1, 10]. Tanto en términos humanos como financieros, la carga de la diabetes es enorme. Ha provocado 5.1 millones de muertes y ha representado unos 851 billones de dólares en gastos de salud (11% del gasto total en todo el mundo) en 2017 [10].

### **1.3 Factores promotores de la DT2 y sus complicaciones**

Un factor de los defectos en la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa incluye la falla de la hormona para suprimir la producción hepática y renal de glucosa, y mediar la captación y el metabolismo de la glucosa en tejidos insulinosensibles, como el músculo esquelético, hígado, tejido adiposo y músculo cardíaco, generándose RI [11]. La consecuencia directa de la RI es la hiperglucemia, característica fundamental de la DT2.

Otro de los factores importantes que contribuyen al desarrollo de RI es la hiperlipidemia, ocasionada principalmente por la obesidad debido a la alimentación alta en grasas y carbohidratos, el estilo de vida sedentario y factores genéticos. El exceso de tejido adiposo, aunado a hiperlipidemia y algunos subproductos consecuentes de las altas concentraciones de ácidos grasos, como el diacilglicerol y ceramidas, inhiben la señalización de la insulina [11], que conduce a la reducción en el transporte de glucosa mediada por el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4),

siendo el músculo esquelético y el tejido adiposo los más afectados, ya que son dependientes a la acción de dicha hormona [12].

El exceso de tejido adiposo es uno de los principales promotores de la RI, ya que el aumento de masa adiposa favorece la síntesis de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), involucrada en el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo. Dichas citocinas se encuentran involucradas en el desarrollo de un estado inflamatorio a lo largo del aumento de masa corporal, el cual está asociado a la RI [13, 14]. Otro estudio mostró que IKK $\beta$ , una cinasa involucrada en la vía proinflamatoria NF $\kappa$ B, puede fosforilar al sustrato del receptor de la insulina 1 (ISR-1), disminuyendo su actividad y con ello la expresión de GLUT4 [3].

El exceso de lípidos y carbohidratos genera un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), llamado estrés nutricional, el cual genera productos de lipoperoxidación, lo que produce un decremento de maquinaria antioxidante, generando un desbalance entre el sistema oxidativo/antioxidante. Dicho desbalance genera un ambiente adverso para la correcta señalización celular, en donde la vía que activa la insulina se ve afectada y sus efectos se ven disminuidos o anulados, promoviendo el desarrollo de DT2. El estrés oxidante no sólo tiene efectos en tejidos insulinosensibles, sino también en otros órganos y tejidos como el cerebro, hígado, riñones, músculo esquelético y páncreas [15]. El ambiente oxidante generado por las altas concentraciones de glucosa también se encuentra relacionado con

procesos neurodegenerativos y se ha sugerido como detonante en el desarrollo de Alzheimer [16].

A nivel pancreático, la hiperglucemia aumenta la secreción de insulina de manera compensatoria, sin embargo, suele ser temporal, ya que en un estado crónico finalmente decae debido al agotamiento pancreático que, aunado al ambiente oxidante, disminuye la actividad pancreática y, por consecuencia, la secreción de insulina [8, 11, 17].

Las complicaciones de la DT2 generados por un estado de hiperglucemia crónica promueve la formación de productos de glicosilación de proteínas tanto intracelular como extracelular, modificando la estructura y función de proteínas. A nivel intracelular, la glicación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina puede ocasionar el desacoplamiento de la señalización, inhibir sus efectos y generar RI. A nivel vascular, la hiperglucemia y productos de glicosilación avanzada promueve deterioro del endotelio de los vasos sanguíneos, incluyendo lesiones microvasculares y macrovasculares. Dentro de las microvasculares más comunes se encuentra la nefropatía, neuropatía y retinopatía entre otros, mientras que las macrovasculares conducen a enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardiaca, entre otras consecuencias como infarto al miocardio, accidentes cerebrovasculares, entre otros. Además, la glicación de proteínas generada por la hiperglucemia se ha asociado a la modificación de las actividades celulares normales de manera general, lo cual, se han asociado a enfermedades como el cáncer y el envejecimiento acelerado [18].

## **1.4 Fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2**

Debido a que la DT2 es uno de los problemas de salud con mayor incidencia tanto en México como a nivel mundial, existe una gran variedad de fármacos para su tratamiento, siendo su efecto principal disminuir la glucemia, así como también disminuir la hiperlipidemia. Esto se logra a través de varios mecanismos de acción, con la finalidad de aumentar la sensibilidad a la insulina o bien aumentando la secreción de insulina, entre otros mecanismos, los cuales se muestran a continuación.

### **1.4.1 Sulfonilureas**

Las sulfonilureas son fármacos que actúan a nivel pancreático mediante el bloqueo de los canales de potasio ( $K^+$ ), lo que provoca la despolarización de la membrana, evento que genera la apertura de canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ), promueve la liberación de insulina (secretagogo) y la consecuente disminución de la glucemia. Sin embargo, se puede inducir hipoglucemia, lo cual puede llevar a estado de coma e incluso la muerte. La hipoglucemia causa la liberación de hormonas, como glucagón, epinefrina, norepinefrina y cortisol; éstas incrementan la demanda de oxígeno del miocardio, pudiendo disminuir el suministro de sangre al corazón, promoviendo la vasoconstricción coronaria, además de promover el agotamiento del páncreas y su deterioro [19].

### **1.4.2 Biguanidas**

Estos fármacos influyen sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos. Un ejemplo es la metformina, que inhibe la producción de glucosa hepática y aumenta la activación de la vía AMPK $\alpha$ , resultando en efectos hipolipemiantes. Su uso está asociado con efectos adversos gastrointestinales y se encuentra contraindicado en pacientes con insuficiencia renal [20].

### **1.4.3 Inhibidores de alfa glucosidasas**

Estos fármacos tienen como blanco principal la inhibición de las enzimas glucoamilasa, sucrasa, maltolasa e isomaltosa del tracto digestivo, que se encargan de metabolizar carbohidratos complejos (polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos) en simples (monosacáridos), de tal manera que puedan absorberse a través del intestino; por lo que, al estar inhibidas, impiden la absorción de monosacáridos. Sin embargo, el incremento en la cantidad de carbohidratos en el tubo digestivo favorece el desarrollo bacteriano, desequilibrando la flora intestinal, lo cual ocasiona dolor abdominal, flatulencias y diarrea. Se ha observado también que incrementan las transaminasas hepáticas [20-22].

### **1.4.4 Inhibidores DPP4**

Algunos otros fármacos actúan inhibiendo a la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) (gliptinas); éstas anulan la acción de las DPP4, inhibiendo la degradación de hormonas incretinas, como el péptido similar al glucagón (GLP-1), que tiene la función de inhibir al glucagón, disminuyendo la glucogenólisis, y al péptido insulínico dependiente

de glucosa (GIP), que favorece la liberación de insulina. Algunos estudios han asociado el uso de estos medicamentos con varios padecimientos, como reacciones alérgicas de la piel, disfunción del sistema inmune, vómito, diarrea y náusea, aunque no se ha dilucidado la causa de estos padecimientos [23, 24].

#### **1.4.5 Inhibidores SGLT2**

Un ejemplo es la canagliflozina; se trata de fármacos inhibidores de los transportadores de Na<sup>+</sup>/glucosa que impiden la reabsorción de glucosa a nivel renal. Entre sus efectos adversos se tienen deshidratación, infecciones urinarias y pérdida de peso, entre otros [20].

#### **1.4.6 Agonistas de PPAR $\gamma$**

PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que participan en la regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Las glitazonas, como rosiglitazona y pioglitazona, son agonistas de PPAR $\gamma$ . Actúan como sensibilizadores de insulina, como el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. La activación de PPAR $\gamma$  regula la expresión de genes involucrados en la captura de glucosa y lípidos; además inhiben la lipólisis en tejido adiposo y la liberación de AGL, y la glucogenólisis por parte del hígado, sus efectos son antihiperglucemiantes e hipolipemiantes [20, 25, 26]. Su uso se ha asociado con aumento del peso corporal, riesgo cardiovascular, edema, osteoporosis y cáncer de vejiga [20, 27, 28]. Se creó que la ganancia de peso es debida a la acumulación de triglicéridos y glucosa en el tejido adiposo. Estudios en ratones knockout ob/ob han demostrado que pioglitazona y rosiglitazona incrementan el contenido hepático de

triglicéridos y favorecen el desarrollo de esteatosis [29]. La troglitazona fue retirada del mercado debido a que su consumo tenía efecto hepatotóxico y también se comprobó que el uso de algunas tiazolinedinedionas (TZD) puede asociarse con atrofia cardíaca [8].

### **1.5. Formas de PPAR, expresión y su participación en el metabolismo**

En la actualidad se han descrito 3 formas:  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . Éstas se expresan en varios tejidos y órganos, en los cuales participan en la regulación del metabolismo energético, principalmente de lípidos y glucosa. PPAR $\alpha$  se expresa principalmente en hígado, riñón y corazón y PPAR $\delta$  principalmente en tejido adiposo blanco y marrón, además del músculo esquelético. Ambas isoformas regulan la expresión de genes que participan en el metabolismo de lípidos, como la  $\beta$ -oxidación y el proceso de termogénesis, aunque se expresan en proporciones diferentes, dependiendo del tejido u órgano. PPAR $\delta$  es la isoforma menos estudiada, sin embargo se ha demostrado que participa un papel importante en el catabolismo de lípidos y se ha demostrado que participa en la regulación del colesterol [30]. PPAR $\gamma$  regula la expresión de genes que participan en procesos principalmente anabólicos, como la síntesis de lípidos y otros procesos como la adipogénesis. La activación de PPAR $\gamma$  también tiene funciones inhibitorias sobre la activación del factor nuclear kappa B (Nf- $\kappa$ B), evitando la síntesis de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) [31], a las cuales se les ha adjudicado inhibición de la acción de la insulina [8, 26, 32, 33].

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

En la tabla 1, se muestra una recopilación de los tejidos y órganos donde se expresan mayoritariamente, los genes que regulan, su participación metabólica y las vías que se encuentran involucradas en la modulación de PPAR.

### **1.6. Mecanismo de activación de los PPAR**

Para que se activen los PPAR se necesita una serie de eventos moleculares que culminan con la expresión de diversos genes. Todos los miembros de la familia de PPAR forman heterodímeros con el factor retinoide X 9-cis (RXR). En la ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR se encuentra unido al correpresor del receptor nuclear (NCOR) o el mediador del silenciamiento del receptor de la hormona tiroidea y retinoide (SMRT). Esta unión mantiene inactivo al PPAR. Cuando el heterodímero PPAR-RXR es activado por su ligando, hay un cambio conformacional del PPAR, lo que permite la liberación del correpresor y se recluta el complejo coactivador (potencia la unión al ADN y la transcripción) formado por el coactivador de receptor nuclear 1 (SCR-1), proteína coactivadora transcripcional p300 (CBP/p300), el coactivador-1 de PPAR (PGC-1) y la proteína de unión a PPAR (PBP/TRAP220). Una vez completa la maquinaria transcripcional se une el heterodímero PPAR-RXR al ADN en secuencias específicas llamadas elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE), las cuales tienen una secuencia repetitiva AGGTCA (Figura 1). Además, se

ha demostrado que la actividad de los PPAR puede ser regulada por eventos de fosforilación, que serán tratados más adelante (Figura 1) [8, 26, 34, 35].

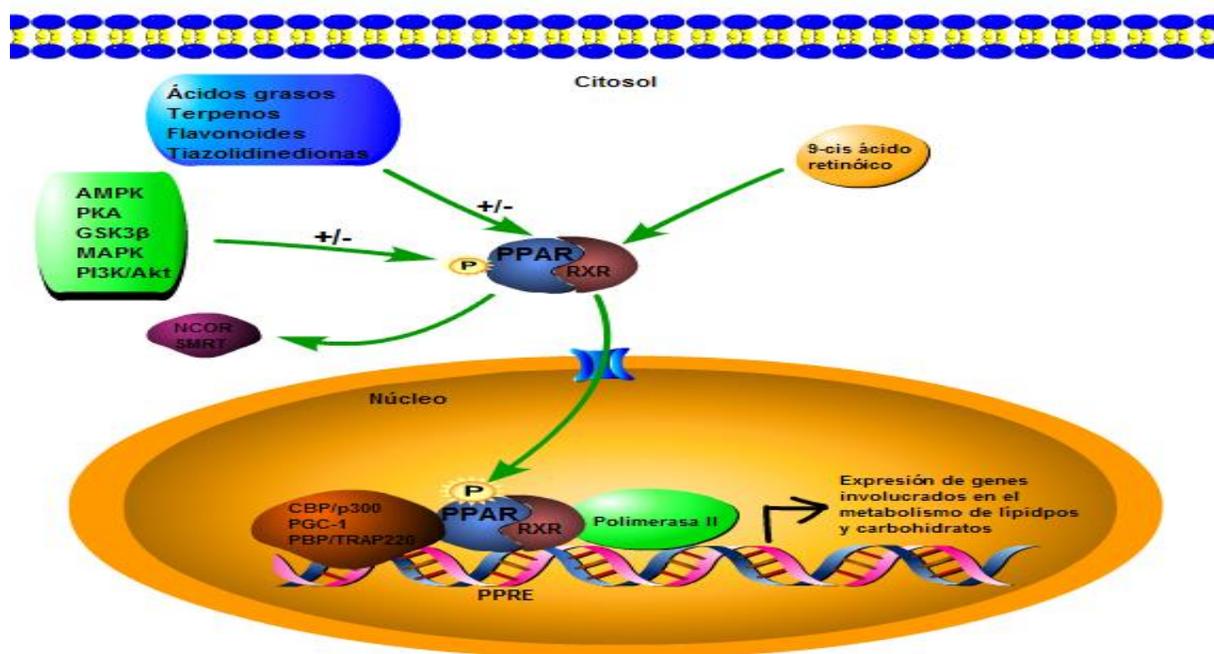


Figura 1. Esquematización de la activación de PPAR.

## 1.7. Agonistas sintéticos y naturales de PPAR

### 1.7. 1. Agonistas sintéticos de PPAR $\alpha$

Dentro de los agonistas de PPAR $\alpha$  se encuentran los fibratos (fenofibrato, clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrozilo), utilizados como fármacos hipolipidémicos, incrementando la oxidación de ácidos grasos, lo que favorece la sensibilidad a la insulina [8]. Sin embargo, el uso de estos fármacos ha sido asociado con efectos adversos, como lesiones del páncreas, problemas cardiacos, tumor en hígado y edema [36-39]. Aunque aún no se sabe con claridad el origen de estos efectos adversos, se

especula que es debido a que no son agonistas selectivos, pudiendo tener efectos adversos sobre otros tejidos y órganos.

### **1.7.2. Agonistas sintéticos de PPAR $\delta$**

Los agonistas sintéticos son la carbaprostaciclina y moléculas que derivan del ácido fenoxacético, como el GW501516 y GW0742. Otro agonista sintético es el L165041. Actúan regulando positivamente la expresión de genes involucrados en el catabolismo de lípidos, disminuyendo lípidos en sangre y favoreciendo la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, se ha asociado su uso con cardiopatías, principalmente arritmias, debido a que se ha descubierto que estos fármacos son agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales, al activarse, despolarizan la membrana celular, activando el mecanismo de contracción del músculo cardíaco. Otros fármacos dirigidos a la activación de este PPAR se encuentran en fase de estudio clínico I y II [30, 40-42].

**Tabla 1. Formas de PPAR, tejidos y órganos de expresión, y su participación metabólica.**

PPAR	Órgano o tejido donde se expresa mayoritariamente	Genes que regula	Función	Cinasas que lo regulan	Ref.
$\alpha$	Hígado Riñón Tejido adiposo subcutáneo y visceral	<i>FATP</i>	Transporte de lípidos	MAPK PI3K/Akt CK2 GSK3- $\beta$ PKA AMPK	[8, 26, 34, 43-46]
		<i>FAT/CD36</i>	Transporte de lípidos		
		<i>FABP</i>	Transporte de lípidos		
		<i>PDK4</i>	Metabolismo de glucosa		
		<i>ACS</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>CPT1</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>CPT2</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>ACO</i>	Oxidación de ácidos grasos en peroxisoma		
		<i>ACoADH</i>	$\beta$ -oxidación		
		<i>3-HACoAD</i>	$\beta$ -oxidación		
		<i>AcilCoAD</i>	$\beta$ -oxidación		
$\delta$	Músculo esquelético Tejido adiposo blanco y marrón Tracto digestivo corazón	<i>ACS</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria	AMPK $\alpha$ PKA	[30, 34, 40, 47-51]
		<i>FATP</i>	Transporte de lípidos		
		<i>FABP</i>	Transporte de lípidos		
		<i>LPL</i>	Hidrólisis de triglicéridos		
		<i>CPT1</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>CPT2</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>ACCLS</i>	Oxidación de ácidos grasos en mitocondria		
		<i>UCP2</i>	Termogénesis		
		<i>UCP3</i>	Termogénesis		
$\gamma$	Tejido adiposo blanco y marrón. Macrófagos Músculo esquelético Colon Endotelio	<i>PEPCK</i>	Metabolismo de glucosa	PI3K/Akt MAPK ERK2 JNK PKA PKC AMPK	[7, 34, 52]
		<i>GyK</i>	Incorporación de glicerol		
		<i>LPL</i>	Hidrólisis de triglicéridos		
		<i>GLUT1</i>	Incorporación de glucosa		
		<i>GLUT4</i>	Incorporación de glucosa		
		<i>FATP</i>	Incorporación de ácidos grasos		
		<i>Adiponectina</i>	Sensibilidad a la insulina		
		<i>FAT/CD36</i>	Incorporación de ácidos grasos		

### **1.7.3. Agonistas sintéticos de PPAR $\gamma$**

Descritos en el subtítulo 1.4.6.

### **1.7.4. Agonistas sintéticos duales de PPAR**

La característica particular de los agonistas duales es el activar al menos 2 formas de PPAR, un ejemplo es el ragaglitazar, un agonista dual de PPAR $\alpha/\gamma$ , ha demostrado tener efectos sobre estos PPAR. En otros estudios, el muraglitazar, un agonista dual similar al ragaglitazar, sin embargo, ha demostrado inducir ganancia de peso en ratones *db/db* e incluso produce edema [53]. El tesaglitazar, otro agonista dual de PPAR $\gamma/\alpha$ , indujo fibrosarcoma en tejido adiposo de ratones [54], aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual se desarrollan estos efectos adversos. El compuesto sintético híbrido tiazolidin-2,4-dion/bifenilcarbonitrilo, mediante estudio *in vivo* e *in silico*, aumentó la expresión de PPAR $\alpha/\gamma$  [55]. Otro agonista sintético es el GFT505, el cual demostró disminuir lípidos y glucosa en sangre y disminuir la RI a través de la activación dual de PPAR $\alpha/\gamma$  [56]. El compuesto C333H actuó como agonista dual de PPAR $\alpha/\gamma$ , con efecto mayor que el fenofibrato y la rosiglitazona, respectivamente, en células 3T3-L1 [57]. El saroglitazar es un agonista dual de PPAR $\alpha/\gamma$  que recientemente fue aprobado en la India para el tratamiento de la DT2, hiperlipidemia e hipertrigliceridemia, esto en pacientes que no pudieron ser controlados mediante estatinas, sin embargo aún no se encuentra aprobado a nivel mundial [58], por lo cual es importante continuar en la búsqueda de nuevos agonistas duales.

### **1.7.5. Agonistas y reguladores naturales de PPAR**

Dentro de los agonistas naturales se encuentran los ligandos endógenos, a la fecha se han descubierto que son principalmente de naturaleza lipídica, como el ácido araquidónico y algunos de sus derivados; los eicosanoides, tromboxanos y leucotrienos, ácido oleico y ácido linoleico, también se ha reportado que el endocannabinoide anandamida tiene actividad agonista [59, 60].

Desde la antigüedad las plantas medicinales se han utilizado para el tratamiento de enfermedades, siendo un gran número de ellas utilizadas para el tratamiento de enfermedades metabólicas [61]. Las plantas medicinales ofrecen una gran variedad de moléculas reguladoras de PPAR, ya sea estimulando o inhibiendo su actividad.

Hasta el momento se han propuesto extractos, fracciones y compuestos de plantas de gran variedad química con efecto regulador de PPAR, destacando los compuestos polifenólicos, como flavonoides y flavonas, terpenos y otros de naturaleza lipídica, principalmente ácidos grasos insaturados. En las Tablas 2-7 se muestra una colección de extractos de plantas y compuestos de origen vegetal con efecto regulador de PPAR.

### **1.7.6. Agonistas naturales duales de PPAR**

El amorfastilbol, un compuesto aislado de las semillas de la planta *Robinia pseudoacacia*, y algunos de sus derivados tienen la capacidad de activar PPAR $\alpha$ / $\gamma$  en cultivo de células 3T3-L1 [44, 62]. Otro estudio demostró que los isoprenoles geraniol, farnesol y geranilgeraniol son agonistas duales de PPAR $\alpha$ / $\gamma$  en cultivo celular 3T3-L1 y HepG2 [44]. Los extractos de las plantas *Daphne gnidium* y *Thymelaea hirsuta*, los

frutos de *Illicium anisatum*, *Juniperus virginiana* y *Terminalia chebula* poseen actividad agonista dual de PPAR $\alpha$ / $\gamma$  en células 3T3-L1 (Figura 4-7) [63].

Existen muchos fármacos sintéticos para el tratamiento de la DT2, sin embargo, la mayoría tiene efectos adversos, lo cual puede ser debido en parte a la posibilidad que no sean agonistas selectivos, afectando a otros tejidos y órganos. Otro punto importante es que la mayoría de los agonistas duales se encuentran en fase experimental [19, 43, 64]. Por otro lado, hoy en día no existen fármacos dirigidos a PPAR $\delta$ .

A la fecha, los agonistas de PPAR $\gamma$  como la pioglitazona, un fármaco que es recetado en las primeras etapas de la DT2 y que no es recomendado por periodos largos de uso porque inclinan el balance energético hacia la acumulación de lípidos, provoca aumento de peso y obesidad que, lo cual puede contribuir al agravamiento de la DT2.

### **1.7.7. Pan agonistas**

Los pan agonistas hacen referencia a tener la cualidad de activar a las 3 isoformas. Dentro de los sintéticos se encuentra el ZBH [65] y el MHY2013 [66], sin embargo aún se encuentran en fase experimental. Los de origen vegetal son descritos en la tabla 6 y 7.

Como hemos visto, los PPAR son un blanco interesante para el tratamiento de DT2 y otras enfermedades asociadas al SM. Por lo tanto, se considera importante continuar con la búsqueda de agonistas selectivos, duales y pan. En este contexto, las plantas

medicinales representan una fuente potencial de compuestos con actividad biológica, con la posibilidad de afectar a los PPAR.

## **1.8 Tejido adiposo y músculo esquelético como modelos de estudio**

### **1.8.1 Tejido adiposo**

El tejido adiposo es un tejido importante en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos. Es considerado un tejido endócrino debido a que produce diversas moléculas, entre ellas hormonas (adiponectina y leptina) que afectan la función y metabolismo de órganos y tejidos incluyendo músculo, hígado, vasculatura y cerebro [67]. Es un tejido sensible a la insulina y de él depende gran parte del anabolismo y el catabolismo de lípidos, así como parte de la captación de glucosa, principalmente regulada por PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ .

El tejido adiposo es el único órgano que secreta adiponectina, sintetizada a partir de la activación de PPAR $\gamma$ ; tiene efecto sensibilizador a la insulina en varios órganos, incluyendo el músculo esquelético y el hígado. La adiponectina promueve en el músculo esquelético la oxidación de ácidos grasos y activa la síntesis de PPAR $\gamma$ , favoreciendo la incorporación de glucosa a través de la translocación de GLUT4. En el hígado, mediante su receptor AdipoR2, aumenta la síntesis de glucógeno mediante AMPK $\alpha$ 1 y disminuye la gluconeogénesis. Otros estudios mencionan que el aumento de la activación de AMPK $\alpha$ 1 promueve la síntesis de PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ ,

además de que AMPK $\alpha$ 1 también favorece la  $\beta$ -oxidación, inhibiendo al acetil CoA carboxilasa (ACC) [68-70]. La mayoría de los extractos y/o moléculas con efecto agonista de estos PPAR, han sido evaluados en el tejido adiposo ya que es uno de los principales órganos que regulan el metabolismo de lípidos y glucosa, siendo los reguladores maestros PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , además de que es donde se expresan mayoritariamente, de ahí la importancia de evaluarlos en este tejido.

### **1.7.2 Tejido muscular esquelético**

El músculo esquelético también es un tejido dependiente de insulina; incorpora aproximadamente el 80% de la glucosa disponible en sangre, siendo el mayor depósito de glucógeno del organismo, además de que es de los tejidos con mayor utilización de energía [71]. Juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética, y es de los tejidos que más consume glucosa y lípidos. En condiciones de obesidad y diabetes, la RI en este tejido se encuentra aumentada. PPAR $\delta$  participa de manera crucial en el metabolismo y catabolismo de lípidos. Se expresa de 10 a 50 veces más respecto a PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y, en casos de obesidad y DT2, su expresión se encuentra disminuida sustancialmente [72]. Por otro lado, PPAR $\gamma$  se expresa en menor proporción que PPAR $\delta$  y se expresa en un 5 a 10% respecto a su expresión en tejido adiposo. Sin embargo, juega un papel fundamental en la incorporación de lípidos.

AMPK $\alpha$ 1 se expresa mayoritariamente en músculo y se encuentra involucrada en la homeostasis energética, tanto de glucosa como de lípidos, y se ha demostrado que su activación en este tejido tiene efectos sensibilizadores a la insulina [73]. Se trata, de un tejido importante en la homeostasis metabólica, y por lo tanto AMPK $\alpha$ 1 puede estar relacionada de manera sinérgica y/o regulatoria con PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ . Por otro lado, el fármaco metformina, el cual es utilizado como antihiper glucemiante y recetado para el tratamiento de la DT2, activa a AMPK, siendo uno de sus mecanismos de acción descubiertos hoy en día, por lo tanto, pueden ser considerados blancos terapéuticos asociados con la sensibilización de la insulina.

**Tabla 2. Extractos de plantas con efectos sobre PPAR.**

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
α	<i>Lilium sp.</i>	Raíz	EP	Células HEK 293 transfectadas con tk-PPREx3-luc	PPARα <sup>t</sup>	NR	NR	[74]
	<i>Lophatherum gracile Brongn</i>	Toda la planta	AcoEt/EP					
	<i>Arnica montana.</i>	flores	Etanol al 95%	Células HepG2 transfectadas con PRE-Luc pSG5-PPARα	PPARα <sup>t, +</sup>	NR	NR	[63]
	<i>Artemisia capillaris.</i>	Toda la planta						
	<i>Ceanothus velutinus.</i>	Partes aéreas						
	<i>Centella asiática.</i>	Partes aéreas						
	<i>Coixlacryma-jobi</i>	Toda la planta						

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
α	<i>Cymbopogon citratus</i>	Toda la planta	Etanol al 95%	Células HepG2 transfectadas con PRE-Luc pSG5-PPARα	PPARα <sup>t, +</sup>	NR	NR	[30]
	<i>Foeniculum vulgare</i>	Toda la planta						[30]
	<i>Illicium anisatum</i>	Frutos						[30]
	<i>Juniperus virginiana</i>	Frutos						[30]
	<i>Leonurus cardiaca</i>	Toda la planta						[30]
	<i>Pimpinella anisum</i>	Semillas						[30]
	<i>Platycladus orientalis</i>	Semillas						[30]

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
α	<i>Rudbekial anciniata</i>	Flores	Etanol al 95%	Células HepG2 transfectadas con PRE-Luc pSG5-PPARα	PPARα <sup>t+</sup>	NR	NR	[30]
	<i>Sida cordifolia</i>	Raíz						
	<i>Terminalia arjuna</i>	Corteza						
	<i>Terminalia bellerica</i>	Fruto						
	<i>Terminalia chebula</i>	Fruta						
	<i>Terminalia pallida</i>	Corteza						
	<i>Thymelaea hirsuta</i>	Toda la planta						

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
α	<i>Veratum lobelianum</i>	Rizoma		Células HepG2 transfectadas con PRE-Luc pSG5-PPARα				
	<b>Mezcla de extractos compuesto de 4 plantas</b> <b>Gyeongshingangj eehwan:</b> <i>Liriope platyphylla.</i> <i>Platycodon grandiflorum.</i> <i>Schisandra chinensis.</i> <i>Ephedra sínica.</i>	Todas las plantas	Agua	Tejido adiposo blanco de ratones obesos	PPARα*, ACoADCL*, ACoADC M*	Leptina*, Ap2*, PPARγ *	Disminuye: Hiperlipidemia Hiperinsulinemia Hiperglucemia. Masa visceral	[75]

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
Y	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	Toda la planta	Etanol	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> , + SREBP1c * + C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup> ,	Inhíbe adipogénesis	[76]
				Ratones obesos con dieta alta en grasa		NR	Disminuye niveles séricos de insulina y leptina. Disminuye tejido adiposo	
	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Sépalos y cálices	Agua	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> , + C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup> , Leptina* pERK1/2 <sup>+</sup> pPI3K <sup>+</sup>	Disminuye concentración de lípidos en adipocitos 3T3-L1 Inhíbe adipogénesis	[77]

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
γ	<i>Arbustus unedo</i>	Toda la planta	95 % etanol	HepG2 transfectadas con PRE-Luc pCMV-rPPARγ	PPARγ <sup>t</sup>	NR	NR	[78]
	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Hojas	95 % etanol	Adipocitos 3T3-L1	PPARγ <sup>t</sup>	NR	Promueve la adipogénesis	
	<i>Origanum vulgare</i>	Hojas	95 % etanol	Adipocitos 3T3-L1	PPARγ <sup>t</sup>	NR	Promueve la adipogénesis	
	<i>Codonopsis lanceolata Siebold. &amp; Zucc. Trautv</i>	Toda la planta	Agua	Ratas Srague-Dawley obesas alimentadas con dieta alta en calorías	NR	NR	Disminuye colesterol, triglicéridos en sangre	[79]
					NR	PPARγ*, C/EBPα*	Inhibe adipogénesis	
				Adipocitos 3T3-L1	NR	PPARγ*, C/EBPα*	NR	[35]
	<i>Clerodendron glandulosum Coleb.</i>	Hojas	Agua	Células de tejido adiposo visceral de ratón.	NR	PPARγ*, SREBP1c*, FAS*	NR	[80]

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
Y	<i>Irvingia gabonensis</i> ( <i>AubryLecomte ex O'Rorke</i> ) <i>Baill</i>	Semillas	NR	Preadipocitos 3T3-L1	PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> Adiponectina <sup>+</sup>	Disminuye : G3PDH <sup>+</sup> , leptina <sup>+</sup>	NR	[81]
	<i>Ecklonia stolonifera</i> <i>Okamura</i>	Toda la planta	DCM	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>*</sup> , C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup>	Inhibe la adipogénesis	[82]
			AcoEt					
	<i>Codonopsis lanceolata</i> <i>Siebold. &amp; Zucc.</i> <i>Trautv</i>	Toda la planta	Agua	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>*</sup> , C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup>	Inhibición de la acumulación de lípidos	[82]
Ratas macho Sprague Dawley con dieta alta en grasa				NR		Disminución de niveles séricos de triglicéridos y colesterol		
<i>Extracto de Cucurbita moschata</i> <i>Duchesne ex Poir.</i>	Rizomas	Alcohol dihidroconiferilo	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>**</sup> , C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup> , SREBP1-c <sup>*</sup> , FABP4 <sup>*</sup> , FAS <sup>*</sup> , SDC1 <sup>*</sup> , Pref-1 <sup>*</sup>	Disminución de la concentración de lípidos e inhibición de la diferenciación de adipocitos	[83]	

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
Y	<i>Irvingia gabonensis</i> (AubryLecomte ex O'Rorke) Baill.	Semillas	NR	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> , leptina <sup>+</sup> , adiponectina <sup>+</sup>	Inhibición de la adipogénesis	[81]
	<i>Petasites japonicus</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.	Brotes florales	Etanol	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> , C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup> , SREBP1-c <sup>*</sup> , APO-1 <sup>*</sup>	Disminución de la acumulación de triglicéridos e inhibición de la adipogénesis	[84]
	<i>Vigna nakashimae</i>	Semillas	Etanol	Preadipocitos 3T3-L1	CPT1 <sup>*</sup> , ACO <sup>*</sup> , p-AMPK <sup>+</sup>	PPAR $\gamma$ <sup>*</sup> , FAS <sup>*</sup> , AP2 <sup>*</sup>	Disminución de la acumulación de lípidos	[85]
				Ratones C57BL/6 macho	CPT1 <sup>*</sup> , ACO <sup>*</sup> , p-AMPK <sup>+</sup> , Adiponectina <sup>e</sup>	PPAR $\gamma$ <sup>*</sup> , FAS <sup>*</sup> , AP2 <sup>*</sup> , TNF- $\alpha$ <sup>e</sup> , IL-6 <sup>e</sup> .	Disminución de la masa corporal	
<i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsum	Hojas	Agua	Hígado de Ratones C57J/BL macho con dieta alta en grasa	NR	PPAR $\gamma$ <sup>*</sup> , C/EBP $\alpha$ <sup>*</sup> , SREBP1-c <sup>*</sup> , adiponectina <sup>+</sup>	Disminución del peso corporal y de la acumulación de grasa y	[86]	

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
γ						na <sup>+</sup> , leptina <sup>e</sup>	colesterol en el hígado	
	<i>Zanthoxylum piperitum (L.) DC</i>	Fruto	Etanol	Adipocitos y hepatocitos de ratones C57J/6 con dieta alta en grasa	NR	PPARγ <sup>++</sup> , C/EBPα <sup>++</sup> , SREBP1c <sup>++</sup> , FAS <sup>++</sup>	Pérdida de peso y disminución de acumulación de grasa	[87]
	<i>Aristolochia manshuriensis Kom</i>	NR	NR	Preadipocitos 3T3-L1	pERK1/2 <sup>+</sup>	PPARγ <sup>++</sup> , C/EBPα <sup>*</sup> , C/EBPβ <sup>*</sup> , Ap2 <sup>*</sup> , adiponectina <sup>++</sup> , LPL <sup>*</sup> , FAS <sup>*</sup> , pAkt <sup>+</sup> , pAMPK <sup>+</sup>	Inhibe la adipogénesis y concentración de triglicéridos en cultivo celular de preadipocitos	[88]
	<i>Nelumbo nucifera Gaertn</i>	Hojas y semillas	Etanol	Cultivo primario de adipocitos humanos	NR	PPARγ <sup>*</sup> , SERBP1c <sup>*</sup> , FAS <sup>*</sup> NR	Inhibición de la adipogénesis y acumulación de grasa en el hígado	[89, 90]

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
Y				Mioblastos C2C12	UCP3*	NR	NR	[45, 46]
				Ratones hembra ICR	UCP3*	NR	Disminución de triglicéridos en sangre e hígado	
				Ratas macho Wistar con dieta alta en grasa	NR	NR	Disminución de triglicéridos y colesterol en sangre Pérdida de peso	
				Ratones obesos C57BL/7J	NR	NR	Disminución de peso Disminución de niveles séricos de colesterol, triglicéridos y leptina	
	<i>Salacia reticulata</i> <i>Wight</i>	Toda la planta	Agua	Preadipocitos 3T3-L1	NR	NR	Inhibe la adipogénesis	[91]
				Ratones con diabetes experimental		NR	Disminuye la acumulación de lípidos en tejido	

PPAR	Nombre científico	Parte utilizada de la planta	Extracto	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
					+	-		
							adiposo e hígado	[47]
				Ratones macho obesos inducidos con dieta alta en grasa C57BL/6	NR	NR	Disminuye peso, triglicéridos y colesterol	

\*: RNAm, +: Proteína, t: transactivación, d: Docking molecular, e: Ensayo de ELISA, NR: No reportado.

**Tabla 3. Compuestos de plantas medicinales con efecto agonista de PPAR**

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
	Cianidina	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Células HepG2	PPAR $\alpha$ *	NR	Disminuye acumulación de lípidos en hepatocitos	[92]
		<i>Compuesto puro</i>	Ensayo de luciferasa en células	PPAR $\alpha$ <sup>t</sup>		Inhibe la acumulación de grasa	

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
$\alpha$			transfectadas en cultivo primario de hepatocitos				
	<b>Monacina y anklafavina</b>	Productos fermentados de <i>Monascus purpureus</i>	Cultivo celular de hepatocitos de feto de ratón FL83B	PPAR $\alpha$ *, CPT1*, ACS*, ACO*, SREBP-1c*, ACC*, pAMPK+.	Il-6*, TNF- $\alpha$ *, TGF- $\beta$ *	Inhibe: adipogénesis y esteatohepatitis en ratones con dieta alta en grasa	[93]
	<b>Trans-cariofileno</b>	NR	Células transfectadas HepG2 con PPREx3-luc TR-FRET	PPAR $\alpha$ <sup>t</sup>	NR	Aumento de la oxidación de ácidos grasos. Disminución extracelular de triglicéridos	[94]
$\gamma$	<b><math>\alpha</math>-tocoferol y <math>\gamma</math>-tocoferol</b>	Compuestos puros	Células de cáncer de colon de humano SW 480	PPAR $\gamma$ *,+	NR	NR	[95]
	<b>Ácido decosahexanóico oxidado</b>	NR	NR	PPAR $\gamma$ <sup>d</sup> Ratones diabéticos db/db y en	NR NR	NR NR	[96]

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
Y				ratas diabéticas Zucker			
	<b>Honokiol</b>	<i>Magnolia officinalis</i>	Células HEK 293 transfectadas con tk-PPREx3-luc TR-FRET	NR	PPAR $\gamma^{t, d}$	Disminución de glucosa del medio de cultivo de adipocitos 3T3-L1. Disminución de peso de ratones diabéticos	[97]
	<b>Isocilibina</b>	<i>Silybum marianum</i>	Células HEK 293 transfectadas	PPAR $\gamma^{t, d}$	NR	NR	[98]
	<b>10-Gingediol</b> <b>10-gingediona.</b> <b>4,5 dihidroxiflavona.</b> <b>4,7 dometoxiisoflavona.</b> <b>Genisteina de</b> <b><i>Zingiber officinale</i></b>	<i>Zingiber officinale</i>	<i>In silico.</i> Ensayo de factor transcripcional con extractos nucleares de macrófagos detectable por ELISA	PPAR $\gamma^{d, e}$	NR	NR	[99]

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
Y	T-Hesperidina. Ψ-baptigenina		Macrófagos y monocitos THP1	PPARγ <sup>+, d, e</sup>			
	Ácido glicirrizico	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Tejido adiposo visceral, músculo abdominal, músculo femoral de ratas macho Sprague Dawley	PPARγ* y LPL*	NR	Disminuye glucemia e insulinemia	[78]
	Scutelareina, hispidulina, apigenina, acerosina y la luteolina, además del diterpeno ácido 4-epi-7α-O-acetilscopárico	<i>Scoparia dulcis</i>	Células HEK 293 transfectadas con pCMX-Gal-mPPARγ-LBD	PPARγ <sup>t</sup>	NR	Antihiperglucemiante	[100]
	Foenumosido B	<i>Lysimachia foenum-graecum</i>	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPARγ*, PPARγ*, aP2*, CD36*, C/EBPα*	Inhibición de la adipogénesis y acumulación de lípidos	[101]

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
Y			Células HEK293T transfectadas con pFA-Gal4-PPAR $\gamma$		SRBP1c*, APO-1*	NR	
			Hígado de ratones <i>ob/ob</i>		NR		
	<b>Emodina</b>	NR	Adipocitos 3T3-L1	PPAR $\gamma$ +, Adiponectina+, AMPK+	NR	Promueve la adipogénesis	
	<b>Pueranina y astragalosido IV</b>	NR	Cultivo de Preadipocitos de ratón macho Sprague-Dawley	PPAR $\gamma$ *	NR	Promueve adipogénesis.	[103]
	<b>ácido 6-octadecínico</b>	<i>Marrubium vulgare L.</i>	Adipocitos 3T3-L1 Células HepG2 transfectadas	PPAR $\gamma$ *	NR	Aumento de la acumulación de lípidos	[104]
<b>Alcohol dihidroconiferilo</b>	<i>Cucurbita moschata</i>	Adipocitos 3T3-L1	NR		Inhibición de la adipogénesis	[83]	

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
Y		Duchesne ex Poir			PPAR $\gamma$ *, C/EBP $\alpha$ *, SREBP-1c*, FABP4*, FAS*, SCD1*, Pref-1*		
	<b>Pseudoprotodiocsina</b>	<i>Dioscorea nipponica</i> Makino	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ *, C/EBP $\alpha$ *, LPL*, Leptina*	Inhibición de la adipogénesis	[105]
	<b>Ácido tánico</b>	<i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Per.	Preadipocitos 3T3-L1	c-fos*, c-jun*, c-myc*	PPAR $\gamma$ * pIR $\beta$ * pAkt*	Promueve el transporte de glucosa dentro de las células. Inhibe adipogénesis	[106]
	<b>(-)-Epigallocatequina</b>	NR	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ *, C/EBP $\alpha$ *, FoxO1*	Inhibe proliferación celular Reduce significativamente acumulación lipídica celular	[107]
	<b>Fucosterol</b>	<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPAR $\gamma$ * y C/EBP $\alpha$ *	Disminuye la acumulación de lípidos en adipocitos	[82]

PPAR	Compuestos	Material vegetal	Modelo de estudio	Efecto		Posible efecto biológico	Ref.
				+	-		
γ	Gingenósido Re	<i>Gingseng panax</i>	Preadipocitos 3T3-L1	PPARγ*, FAS*, ACC*, SREBP1-c* Adiponectina*, e, GLUT4+	TNFα <sup>e</sup> , *	Inhibición de la adipogénesis	[108]
	Licochalcona A	<i>Brassica Rapa</i>	Preadipocitos 3T3-L1	NR	PPARγ*, C/EBPα*, SREBP1-c*, FABP*, FAS*	Inhibe la diferenciación de adipocitos Disminuye triglicéridos, colesterol y ácidos grasos esterificados en ratones CD1 obesos	[109]
	Lucidona	<i>Lindera erythrocarpa</i> Makino	Adipocitos 3T3-L1	NR	PPARγ*, C/EBPα*, LPL*, TNFα, leptina	Inhibición de la adipogénesis	[105]
Δ	Ácidos grasos omega 3 (EPA, DHA)	NR	Hígado de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en fructosa	PPARδ*	NR	Disminución de triglicéridos y colesterol	[110]

\*: RNAm, +: Proteína, t: transactivación, d: Docking molecular, e: Ensayo de ELISA, NR: No reportado.

**Tabla 4. Extractos de plantas agonistas duales de PPAR.**

PPAR	Nombre científico	Extracto	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\gamma$	<i>Daphne genkwa</i>	Etanol	HepG2 transfectadas con PRE-Luc pSG5-PPAR $\alpha$ y pCMV-rPPAR $\gamma$	PPAR $\alpha/\gamma$ <sup>t+</sup>	Antihiper glucémico	[63]
	<i>Thymelaea hirsuta</i>					
	<i>Arnica montana</i>					
	<i>Illicium anisatum</i>					
	<i>Juniperus virginiana.</i>					
	<i>Terminalia chebula.</i>					
	<i>Terminalia hirsuta</i>					
	<i>Echinacea purpurea</i>	Hexano DCM	Para PPAR $\alpha$ se utilizaron células Hepa1-6 transfectadas con pM-hPPAR $\alpha$ -LBD y para PPAR $\gamma$ Células endoteliales arteriales de bovino (BAEC) transfectadas con PPRE-luc y	PPAR $\alpha/\gamma$ <sup>t</sup>	Antihiper glucémico	[111]
<i>Sambucus nigra</i>	DCM					

PPAR	Nombre científico	Extracto	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\gamma$			pM-hPPAR $\gamma$ y LBD			
	<i>Punica granatum</i>	Metanol	Hígado de ratas diabetizadas con ZDF	FATP*, PPAR $\alpha$ *, AMPK $\alpha$ 2*, CPT1*, ACO*, ACC*	Antidiabético	[112]
			Células de riñón de embrión de humano HEK 293 transfectadas	PPAR $\alpha$ <sup>t</sup> y PPAR $\gamma$ <sup>t</sup>		
	<i>Albizia julibrissin Durazz.</i>	Éter de petróleo	Células HEK 293 transfectadas con pCMX-mPPAR $\alpha$ y pCMX-mPPAR $\gamma$ respectivamente	PPAR $\alpha/\gamma$ <sup>t</sup> ,	Antidiabético Antiinflamatorio	[74]
		Acetato de etilo				
		Metanol				
	<i>Arisaema sp</i>	Éter de petróleo				
	<i>Cnidium monnieri (L.) Cuss</i>	Acetato de etilo				
	<i>Pinellia ternata (Thunb.) Breit</i>	Éter de petróleo				
	<i>Tribulus terrestris L</i>	Acetato de etilo				

PPAR	Nombre científico	Extracto	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
δ/γ	<i>Origanum vulgare</i>	Hexano	Para PPARδ se utilizaron células EM3 transfectadas con pM-hPPAR δ –LBD y para PPARγ células endoteliales arteriales de bovino (BAEC) transfectadas con PPRE-luc y pM-hPPARγ y LB	PPARδ/γ <sup>t</sup>	Antidiabético	[111]
	<i>Origanum vulgare ssp vulgare</i>	Hexano				
	<i>de Origanum vulgare ssp hirtium</i>	Metanol				
	<i>Sambucus nigra</i>	Etanol/agua				
	<i>Satureja hortensis</i>	Metanol				
DCM						

\*: RNAm, +: Proteína, t: transactivación, d: docking molecular, e: ensayo de ELISA, NR: No reportado.

**Tabla 5. Compuestos de origen vegetal agonistas de PPAR.**

PPAR	Compuestos aislados o identificados	Planta de origen	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\gamma$	<b>Ácido sargaquinóico</b>	<i>Sargassum yezoense</i>	Células CV-1 transfectadas con vector pcDNA 3-hPPAR $\alpha/\gamma$	PPAR $\alpha/\gamma^t$ ,	Antihiperglucemiante Antidiabético	[113]
	<b>Ácido hidrosargaquinóico</b>		Adipocitos 3T3-L1	$\alpha P2^*$ , PPAR $\gamma^*$ , C/EBP1c*, resistina*, adiponectina*, GLUT4*		
	<b>Ácido oleico conjugado</b>	NR	Cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas Sprague Dawley transfectadas con dnPPAR $\alpha$ y dnPPAR $\gamma$	PPAR $\alpha/\gamma^t$	Inhibición de hipertrofia	[114]
	<b>Naringenina</b>	<i>Citrus arantium</i>	Células U-205 transfectadas con vector reportero PPRE	PPAR $\alpha^t$ PPAR $\gamma^t$ Adiponectina <sup>+</sup>	Antidiabético	[115]
	<b>Hesperitina</b>					
$\alpha/\gamma$	<b>Farnesol</b>	NR	Adipocitos 3T3-L1 y HepG2	CPT1A*, $\alpha P2^*$ , ACS*	NR	[44]

PPAR	Compuestos aislados o identificados	Planta de origen	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\gamma$	geraniol		Células de riñón de mono CV1 transfectadas con vectores pM-hPPAR $\gamma$ y pM-hPPAR $\alpha$	PPAR $\alpha/\gamma^t$		
	Geranilgeraniol		Células de riñón de mono CV1 transfectadas con vectores pM-hPPAR $\gamma$ y pM-hPPAR $\alpha$ para ensayo de transactivación y adipocitos 3T3-L1 y HepG2 para ensayo de expresión	PPAR $\alpha/\gamma^t$ , CPT1A*, ACS*		
$\delta/\gamma$	Pluviatilol	<i>Asarum sieboldii</i>	Hepatocitos HepG2 tranfectadas con Gal4/PPAR $\gamma$ -LBD y	PPAR $\delta/\gamma^t$	Antiinflamatorio Antidiabético	[116]
	Epipinoresinol					

PPAR	Compuestos aislados o identificados	Planta de origen	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\delta/\gamma$	Cinamaldehído		Gal4/PPAR $\delta$ -LBD			[117]
			Adipocitos 3T3-L1	PPAR $\delta/\gamma^*$	Aumento de la sensibilidad a la insulina	
			Ratones diabéticos db/db	NR	Disminución de hiperglucemia e hiperlipidemia	
$\alpha/\delta$	Ácido linoleico	NR	Cultivo primario de hepatocitos de pollo	PPAR $\alpha/\delta^*$ , $+$ , GPR40 $^+$ , G6Pasa $^+$ , PEPCK $^+$	Antihiperglucemiante	[118]
	$\gamma$ -Mangostina	<i>Garcinia mangostana</i>	Células COS-1 transfectadas con pPPAR ( $\alpha$ y $\delta$ )-GALA4 respectivamente	PPAR $\alpha/\delta^t$	Antihiperglucemiante	[119]
			Células L6	UCP3 $^+$ , CPT1A $^+$ , ACS $^+$	Antihiperlipemiante	
	Vaticanol C	NR	Células endoteliales arteriales de bovino (BAEC) transfectadas con PPRE-luc y GS--hPPAR $\alpha$ o	PPAR $\alpha/\delta^t$ , FABP1 $^+$ , UCP3 $^+$ , PDK4 $^+$	Antihiperglucemiante Antihiperlipemiante	[120]

PPAR	Compuestos aislados o identificados	Planta de origen	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\delta$			pCMX-NUC1, respectivamente			
	<b>Ombuina 3-O-<math>\beta</math>-Dglucopiranosido</b>	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Ensayo in vitro TR-FRET	PPAR $\alpha/\delta$ <sup>t</sup>	Antidiabético	[121]
			Células HepG2	PPAR $\alpha$ <sup>*</sup> PPAR $\delta$ <sup>*</sup> , FATP4 <sup>*</sup> , CPT- 1 <sup>*</sup> , APOC3 <sup>*</sup> .		

\*: RNAm, +: Proteína, t: transactivación, d: docking molecular, e: ensayo de ELISA, NR: No reportado.

**Tabla 6. Extractos de plantas con efecto pan agonista.**

PPAR	Nombre científico	Extracto	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\delta/\gamma$	<i>Fagopyrum tataricum</i>	Hexano	Para PPAR $\delta$ y PPAR $\gamma$ se utilizaron células transfectadas con pM-hPPAR $\gamma$ -LBD o pM-hPPAR $\delta$ -LBD y para PPAR $\alpha$ se utilizaron células Hepa1-6 transfectadas con pM-hPPAR $\alpha$ -LBD	PPAR $\alpha^t$ , PPAR $\delta^t$ , PPAR $\gamma^t$	Antidiabético	[111]
		DCM				
	<i>Galega officinalis</i>	DCM				
	<i>Prunus cerasus</i>	Hexano				
	<i>Rhodiola roseal</i>	Hexano				
	<i>Triginella foenum-graecum</i>	Hexano				
<i>Urtica dioica</i>	DCM					

*t*: transactivación

**Tabla 7. Compuestos aislados de plantas con efecto pan agonista**

PPAR	Compuestos aislados o identificados	Planta de origen	Modelo de estudio	Efecto sobre	Posible efecto biológico	Ref.
$\alpha/\delta/\gamma$	<b>Resveratrol</b>	<b><i>Vitis vinifera</i></b>	Células endoteliales arteriales de bovino (BAEC) transfectadas con PPRE-luc y GS-hPPAR $\alpha$ o pCMX-NUC1 o pCMX-hPPAR $\gamma$ 1 respectivamente Células CV-1 transfectadas con pcDNA 3-hPPAR $\alpha/\delta/\gamma$	PPAR $\alpha^t$ , PPAR $\delta^t$ , PPAR $\gamma^t$ .	Antidiabético	[120]
	<b>Piperitol</b>	<b><i>Asarum sieboldii</i></b>	Células HepG2 transfectadas con Gal4/PPAR $\alpha$ -LBD, Gal4/PPAR $\gamma$ -LBD y Gal4/PPAR $\delta$ -LBD	PPAR $\alpha^t$ , PPAR $\delta^t$ , PPAR $\gamma^t$	Antidiabético	[116]
	<b>p-ment-3-ene1,2,8-triol.</b>					
	<b>(1'R,2'R)-4-O-metilguaiacil glicerol.</b>					
<b>N-isobutil-2E,4E,8Z-decatrienamida</b>						

*t: transactivación*

## 2.2. AMPK $\alpha$ 1 y su asociación con los PPAR

AMPK $\alpha$ 1 (de sus siglas en inglés: *adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase alpha 1*) es una proteína serina/treonina cinasa importante en la homeostasis metabólica. Varios estudios han demostrado su importancia en varios procesos metabólicos, principalmente regulando la oxidación de lípidos y la homeostasis de la glucosa. Los efectos de AMPK $\alpha$ 1 son pleiotrópicos debido a su expresión en varios órganos, como el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo e hipotálamo, entre otros. La regulación de la activación de esta cinasa depende de las concentraciones de AMP en relación con las de ATP, además de algunos eventos de fosforilación [122].

El aumento de la relación AMP/ATP aumenta la activación de AMPK $\alpha$ 1, ya que AMP es el sustrato activador de AMPK $\alpha$ 1, el cual ocurre cuando la demanda energética aumenta, generalmente en estados de ejercicio, hipoxia o privación de glucosa. AMPK es una enzima heterotrimérica que comprende 2 subunidades catalíticas ( $\alpha$ 1 o  $\alpha$ 2) y 2 subunidades reguladoras ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2, y  $\gamma$ 3), todas ellas codificadas por diferentes genes. AMPK $\alpha$ 1 es activada principalmente por 2 vías diferentes: por vía dependiente de Ca<sup>2+</sup> mediada por CaMKK $\beta$  y por la vía LKB1 dependiente de AMP [123].

El AMP se une en la subunidad  $\gamma$  de AMPK, lo cual da origen a un cambio conformacional que favorece la exposición de un sitio de fosforilación importante para la activación de esta cinasa. Aunado a dicho evento de acoplamiento, debe ocurrir un evento de fosforilación en la subunidad  $\alpha$  en Thr172, determinante para

que ocurra la activación completa de AMPK $\alpha$ 1 [124]. Además se ha reportado que la activación de esta cinasa promueve la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática [125]. Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2 como la metformina y la pioglitazona tienen efecto inhibitor de la síntesis de ATP y el consecuente aumento de AMP [102, 126]. Sin embargo, aún no se encuentra completamente descrito el mecanismo por el cual ejercen dicho efecto.

La troglitazona, un agonista sintético de PPAR $\gamma$ , ha demostrado aumentar la fosforilación de AMPK $\alpha$ 1 en cultivo de músculo de ratas, además de aumentar la biosíntesis mitocondrial [122]. AMPK $\alpha$ 1 regula también la expresión de PGC-1 $\alpha$ , el cual es un coactivador transcripcional que regula la expresión de los PPAR, principalmente PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$  [127]. En la actualidad se conocen algunos compuestos y extractos de origen natural, como el extracto metanólico de *Rosmarinus officinalis* L. [126], el flavonoide tangeretina [128], el ácido ursólico [129], gingenósido Rc obtenido de *Panax ginseng* y el ácido  $\alpha$ -lipóico [130], los cuales han mostrado efecto sobre la activación de AMPK $\alpha$ 1.

AMPK parece tener un efecto de regulación sinérgica con los PPAR, participando en el metabolismo de lípidos y carbohidratos de manera conjunta. En un estudio se ha observado que agonistas de PPAR $\gamma$ , las tiazolidinedionas tienen efecto sobre la activación de AMPK $\alpha$ , disminuyendo la concentración de AMP indirectamente, a través del desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones [102], lo cual también puede estar relacionado con la activación de PPAR $\delta$ . Debido a esto, se considera un blanco terapéutico interesante, ya que es un sensor energético y maestro regulador de vías que desencadenan efectos metabólicos, principalmente

sobre el catabolismo de ácidos grasos a través de la  $\beta$ -oxidación y sensibilización de la insulina que, además, parece tener un efecto sinérgico al efecto de los PPAR, que finalmente tiene impacto determinante en la homeostasis energética [122, 123, 125].

### **2.3. Akt2 y su asociación con los PPAR**

Akt/PKB es también una serina/treonina cinasa que se encuentra metabólicamente involucrada con a efectos anabólicos, principalmente regulada por insulina en varios tejidos y órganos, principalmente los insulinosensibles, como el tejido adiposo, músculo esquelético, hígado, páncreas y riñones [131, 132].

Una de sus acciones principales del metabolismo es regular el proceso adipogénico, a través de la incorporación de glucosa y lípidos, a través de promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática [133], la expresión de otros genes adipogénicos y la activación río abajo de PPAR $\gamma$  y SREBP, la glucogenogénesis a través de la inactivación de GSK3 $\beta$  [134], promoviendo la expresión de FAS, que cataliza varios pasos de la conversión de malonil CoA y acetyl CoA en ácidos grasos.

Dichos eventos son factores clave en la disminución de hiperglucemia e hiperlipidemia [133]. Aunado a la activación de los PPAR, es importante conocer si dicha regulación es sinérgica con la vía Akt2.

Así, AMPK $\alpha$ 1 y Akt2 son vías de señalización importantes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, por lo que muy probablemente se encuentran asociados con los

PPAR. Si esto es así, se lograría visualizar un panorama más completo de los mecanismos moleculares por los que *H. sabdariffa* afecta el metabolismo de glucosa y lípidos.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 *Hibiscus sabdariffa* L.**



Planta perteneciente a la familia Malvaceae, es una planta originaria de la India, distribuida en países tropicales y subtropicales, tales como Nigeria, Sudan, Arabia Saudita, Malasia y México [135]. Es conocida popularmente en México como “flor de hibiscus”, “Jamaica” o “flor de Jamaica”. Se cultiva en varios estados de la república mexicana, debido a que sus flores se utilizan para preparar platillos y bebidas; los estados con mayor cultivo son Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nayarit, Puebla, Tabasco y Veracruz. Ha sido ampliamente usada en la medicina tradicional como agente antiobesidad, antihipertensivo, diaforético, diurético y coagulante [136]. Sus principales constituyentes químicos son ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos, ácidos orgánicos y flavonoides [136]. Unos de sus principales componentes son las antocianinas delfinidin-3-O-(2-O-β-d-xilopiranosil)- β -d-glucopiranosido, cianidin 3-O-

(2-O-  $\beta$ -d-xilopiranosil)-  $\beta$ -d-glucopiranosido [137]. La quercetina, otro compuesto identificado en esta planta, se ha asociado con vasodilatación a nivel renal mediante el incremento en la filtración glomerular, lo que podría explicar parte de su efecto diurético, el cual también se ha asociado con la liberación de óxido nítrico [138].

También se ha reportado que reduce la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia [136]. Otros estudios indican que favorece la pérdida de peso y decremento en la glucemia en ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina [138]. Delfinidina-3-sambubiosido y cianidina-3-sambubiosido son algunas antocianinas constitutivas de esta planta, a las que se les ha atribuido efectos hipertensivos, antioxidantes e hipocolesterolémicos [139]. También se ha comprobado una disminución en colesterol, triacilglicéridos y LDL en adolescentes con obesidad [140].

Otra investigación mostró que el extracto acuoso inhibe la diferenciación de adipocitos a través de cascadas de señalización PI3-K (fosfatidil inositol-3-fosfato) y MAPK (mitogen-activated protein kinase) y, consecuentemente, la adipogénesis [77, 141]. Se ha sugerido que podría estar actuando a través de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ , ya que estos son reguladores del metabolismo de lípidos [77, 137]. Otros estudios han demostrado que las antocianinas cianidina 3 glucósido (C3G) y cianidina (Cy) tienen efecto positivo en la expresión de leptina y adiponectina; asimismo, la Cy favorece la síntesis de LPL, proteína de anclaje de ácidos grasos (aP2), UCP2 y PPAR $\gamma$ . Otros reportes mostraron que la administración de estas antocianinas en adipocitos promovió la activación de AMPK $\alpha$ 1, cinasa involucrada en procesos de oxidación de ácidos grasos [142].

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, se ha mostrado que un extracto diclorometánico de *H. sabdariffa* (HS-DCM), tiene un efecto antihipeglucemiante, además de tener un efecto dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$ . Sin embargo, las moléculas involucradas en dicho efecto no se han identificado, ni se conocen los mecanismos de acción, los cuales probablemente se encuentren asociados con AMPK $\alpha$ 1 y Akt.

### 3. Justificación

La DT2 tanto en México como a nivel mundial, se ha incrementado drásticamente en los últimos años y continúa en aumento, siendo una de las enfermedades con mayor incidencia [10]. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2 controlan el problema de manera temporal y en la mayoría de los casos producen efectos adversos.

Un aspecto importante en el desarrollo de la DT2 es el desequilibrio energético, lo cual implica un desbalance metabólico de lípidos y carbohidratos, en donde PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , AMPK $\alpha$ 1 y Akt2 juegan un papel fundamental, debido a sus acciones metabólicas, y pueden ser considerados como blancos terapéuticos para enfermedades con un componente metabólico [8, 143].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010), las plantas medicinales son fundamentales para el desarrollo de nuevos fármacos, recurriendo cada vez más a las plantas como estrategia de búsqueda de soluciones nuevas y menos costosas para el cuidado de la salud. Las plantas medicinales con propiedades antiobesidad y antihiperglucemiantes representan un buen campo de investigación para el desarrollo de fármacos que puedan utilizarse en el control de la DT2.

Se calcula que en el mundo existen alrededor de 350 mil especies de plantas superiores y en México la diversidad se estima entre 23 mil y 30 mil especies [144]. La diversidad química en las plantas es muy amplia y poco estudiada. Se calcula que sólo se ha estudiado un porcentaje mínimo de especies vegetales en relación a la

estructura química y propiedades biológicas de sus compuestos [144]. El conocimiento que se tiene en la actualidad de las propiedades de los fitoquímicos ha contribuido enormemente a resolver problemas de salud, ya que una alta proporción de los medicamentos que se utilizan son derivados de plantas [144].

En la búsqueda de evitar efectos adversos, en la actualidad se ha intensificado la búsqueda de moléculas más selectivas dirigidas a la activación dual de los PPAR. A nivel mundial se han reportado más de 800 plantas utilizadas empíricamente para el tratamiento de la DT2. Tan solo en México existen cerca de 170 plantas que se usan empíricamente para el tratamiento de la diabetes y, dentro de éstas, sólo en una pequeña parte se ha explorado su mecanismo de acción, por lo cual *H. sabdariffa* es un blanco de estudio interesante, principalmente por sus efectos metabólicos.

El desbalance del metabolismo de lípidos y carbohidratos generado por la alimentación alta en grasas y carbohidratos, el sedentarismo y la genética, son factores que condicionan el desarrollo de obesidad y DT2.

Los PPAR representan blancos terapéuticos interesantes, ya que se encargan de regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, principalmente en la incorporación celular y oxidación de lípidos, así como en el metabolismo y captación de glucosa [7, 26, 41, 145, 146].

Los agonistas de PPAR que se encuentran en el mercado actual, resuelven el problema parcialmente, como las glitazonas, las cuales disminuyen la hiperglucemia, sin embargo, inclinan el metabolismo en un solo sentido, aumentando la acumulación

de lípidos y la consecuente ganancia de peso, y el desarrollo de otras enfermedades asociadas a la obesidad, como aterosclerosis y enfermedades coronarias [147], además de que se ha asociado a osteoporosis [148]. Desafortunadamente otros agonistas de PPAR también presentan efectos adversos, y algunos con efectos carcinogénicos, debido principalmente a que no son agonistas específicos, teniendo efectos no deseados en otros tejidos y órganos [149]. Por otro lado, algunos otros se encuentran en fase experimental. Hoy en día, el agonista dual saroglitazar únicamente se encuentra en el mercado en la India y continúa en prueba para ser aceptado a nivel internacional [150].

La activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  promete una mejora terapéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas ya que, además de incrementar la captación de glucosa y lípidos a través de PPAR $\gamma$ , aumentaría el catabolismo de lípidos a través de la activación de PPAR $\delta$ , evitando el aumento de peso observado con las glitazonas. La terapéutica empleando agonistas duales de PPAR $\delta$ / $\gamma$  podría mejorar la condición del paciente de manera global, aumentando la sensibilidad a la insulina, disminuyendo la glucemia y la disminución de peso.

Algunos extractos y compuestos derivados de plantas medicinales, como son algunos ácidos grasos, flavonoides y terpenos, se han reportado cómo agonistas de PPAR, mientras que otros han mostrado activar AMPK $\alpha$ 1 y Akt2. Por lo cual, el encontrar agonistas duales de PPAR $\delta$ / $\gamma$  que además activen AMPK $\alpha$ 1 y Akt2 podría generar nuevas y mejores alternativas de tratamiento para enfermedades asociadas al síndrome metabólico, como DT2 y obesidad, con la posibilidad de contrarrestar el

desbalance metabólico tanto de lípidos como de carbohidratos, brindando información valiosa para entender los mecanismos por medio de los cuales ocurren estos efectos.

Dentro de las plantas con un efecto potencial agonista dual de PPAR se encuentra *Hibiscus sabdariffa* L., debido a que sus efectos principales reportados son sobre el metabolismo, principalmente respecto a efectos sobre obesidad y DT2 [137, 151]. A pesar de que se cuenta con diversos estudios farmacológicos que respaldan su actividad biológica, el estudio de esta planta se ha enfocado al extracto acuoso. En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, se ha mostrado que un extracto diclorometánico de *H. sabdariffa* (HS-DCM), tiene efecto dual de PPAR $\delta/\gamma$ . Sin embargo, las moléculas involucradas en dicho efecto no se han identificado, ni se conocen los mecanismos de acción.

El encontrar compuestos agonistas duales de PPAR $\delta/\gamma$  en *H. sabdariffa* que sean más selectivos, y además que tengan efecto multimodal sobre otros reguladores metabólicos como AMPK $\alpha$ 1 y Akt2, podrían explicar algunos de los mecanismos de acción que *H. sabdariffa* posee sobre el metabolismo, y brindaría información valiosa para la elucidación de los mecanismos involucrados. Esto resultaría en una terapia más completa para el tratamiento de enfermedades como la DT2, ya que atacarían de manera global el desbalance metabólico de la DT2, aumentando la oxidación de ácidos grasos y, conjuntamente, un incremento en la captación de glucosa y lípidos, corrigiendo el desbalance metabólico, disminuyendo la obesidad y el proceso inflamatorio causado por dicho desbalance, lo cual resultaría en un aumento en la sensibilidad de la insulina, revirtiendo el desbalance metabólico de una manera mas

eficiente, brindando la posibilidad de proponer compuestos para el desarrollo de nuevos y mejores fármacos con efectos multimodales, que contrarresten la etiología de las patologías mencionadas, con menos efectos adversos y que eviten la polifarmacia la cual es recurrente en el tratamiento de DT2 y otras enfermedades asociadas al síndrome metabólico.

## 4. Pregunta de investigación

¿Qué compuestos del HS-DCM poseen efecto dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  y qué efecto tienen sobre la vía AMPK $\alpha$ 1 y Akt2?

## 5. Hipótesis

Los efectos sobre el metabolismo de glucosa y lípidos del HS-DCM se deben a que contiene compuestos con actividad dual para PPAR $\delta$ / $\gamma$ , la cual está asociada con las vías AMPK $\alpha$ 1 y Akt2.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo general

- Aislar e identificar los compuestos con efecto sobre el metabolismo de glucosa y lípidos en el HS-DCM, determinar la acción de estos compuestos sobre PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  y evaluar su impacto en las vías AMPK $\alpha$ 1 y Akt2.

### 6.2 Objetivos particulares

- Fraccionar el HS-DCM.
- Evaluar el efecto de las fracciones resultantes sobre la expresión de PPAR $\delta$ / $\gamma$  en adipocitos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.
- Aislar e identificar los compuestos involucrados en el efecto dual de la expresión de PPAR $\delta$ / $\gamma$  en adipocitos 3T3-L1 y mioblastos C2C12.
- Predecir el modo de unión de compuestos activos sobre PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  mediante un modelo *in silico* a través de docking molecular.

- Determinar el efecto de los compuestos activos sobre la producción de proteína de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP, GLUT4, p-AMPK $\alpha$ 1 y p-Akt2 en cultivo de mioblastos C2C12.
- Evaluar el efecto de los compuestos más activos sobre GLUT4 mediante un método de inmunohistoquímica en mioblastos C2C12.
- Evaluar los compuestos activos sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1.
- Determinar si estos compuestos poseen efecto antihiper glucemiante en un modelo *in vivo*.

## **7. Metodología**

### **7.1 Fitoquímica**

#### **7.1.1 Colecta del material vegetal**

*Hibiscus sabdariffa* L. fue colectada en diciembre de 2014 en el municipio de Axochiapan en el Estado de Morelos, cuya ubicación se encuentra bajo las siguientes coordenadas: N 18°30.931', W098°45.070' a una altitud de 1,045 msnm.

#### **7.1.2 Identificación de *H. sabdariffa* L.**

El cotejamiento y registro de los ejemplares recolectados se llevó a cabo en el Herbario de plantas medicinales del IMSS del Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Ciudad de México (Herbario-IMSS-M) por el M. en C. Santiago Xolalpa y la M. en C. Abigaíl Aguilar. El número de registro del ejemplar de herbario depositado en este herbario es 16000097.

#### **7.1.3 Preparación del material vegetal**

Sépalos y cálices se secaron bajo aireación constante. El material seco se trituró en un molino eléctrico (Wiley modelo 4), usando una rejilla de 2 mm de diámetro. El material resultante se utilizó para la obtención del HS-DCM.

#### **7.1.4 Obtención del HS-DCM**

El material seco y molido (15 kg) de *H. sabdariffa* se maceró en 20 L de diclorometano (Merck®), realizando 3 maceraciones consecutivas de 24 h a temperatura ambiente. La mezcla obtenida de la maceración se filtró con papel filtro utilizando un embudo acoplado a un matraz Kitazato y bomba de vacío. El filtrado se colocó en un evaporador rotatorio (Buchi®) para concentrar el extracto mediante la evaporación del diclorometano; posteriormente, en una campana de flujo laminar con aireación constante durante 2 a 4 días para eliminar las trazas del disolvente. El extracto resultante se usó en los experimentos posteriores.

#### **7.1.5 Fraccionamiento del HS-DCM**

El HS-DCM (15 g) fue sometido a separación por cromatografía en columna abierta (500 mm x 50 mm), previamente empacada con sílica gel 60 (Merck, 0.2-0.5, 250 g), utilizando como fase móvil un gradiente *n*-hexano/acetato de etilo, empezando con un 100% de *n*-hexano con sucesivos incrementos de polaridad con acetato de etilo (volumen de cada fracción de 150 mL), con incrementos parciales del 5% de acetato de etilo cada 5 fracciones, hasta llegar al 100% de este último disolvente. Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina (CCF) con la finalidad de agrupar las fracciones con similitud química, resultando en 10 fracciones principales: F1 (0.7 g), F2 (3.3 g), F3 (4.1 g), F4 (1.8 g), F5 (0.91 g), F6 (1.2 g), F7 (0.41 g), F8 (0.94 g), F9 (0.62 g) y F10 (0.35 g), de las cuales, 4 fueron seleccionadas (F3, F4, F6 y F8) por ser las fracciones mayoritarias y más representativas de los componentes presentes en el HS-DCM.

La fracción F3 (1.5 g) fue sometida a cromatografía en columna abierta (400 x 25 mm) previamente empacada en sílica gel 60 (0.2-0.5 mm, 20 g) y fraccionada bajo las mismas condiciones (volumen de cada muestra 25 mL), resultando en 2 subfracciones: F3-1 (420 mg) y F3-2 (310 mg), las cuales fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y, subsecuentemente, fueron evaluadas en pruebas *in silico* e *in vitro*. Por su parte, la fracción 8 (0.94 g) produjo un precipitado blanco, que fue purificado por cromatografía en columna abierta (sílica gel 60, 0.2-0.5 mm, 300 x 20 mm) bajo las mismas condiciones descritas (volumen de cada muestra 10 mL), obteniendo nuevamente un precipitado identificado como 5-hidroximetil furfural (5-HMF) (115 mg), el cual fue corroborado por comparación directa con datos de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) reportados previamente [152].

Para la estandarización del HS-DCM el 5-HMF previamente aislado fue utilizado como estándar de referencia. Dicho compuesto fue analizado a 254 nm, mostrando un tiempo de retención de 7.919 min, en una concentración de 9.93 mg/g de extracto ( $R^2 = 0.997$ ).

### **7.1.6 Preparación de reveladores para CCF**

- 4-hidroxibenzaldehído

Se pesaron 0.5 g de 4-hidroxibenzaldehído (Sigma Aldrich) en un vaso de precipitados previamente en hielo, se agregaron 90 mL de etanol, manteniéndose en agitación

constante; posteriormente se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico al 96% muy lentamente y se dejó en agitación por 10 min.

- Sulfato cérico

Se pesaron 12 g de sulfato cérico amoniacal 0.1 N (Baker) y se colocaron en un vaso de precipitados previamente en hielo. Se agregaron 22 mL de ácido sulfúrico al 96% y se mezclaron con agitación constante por 20 min.

### **7.1.7 Identificación de compuestos por CG/EM**

La composición química de las fracciones F3-1 y F3-2 fue analizada por cromatografía de gases utilizando un detector de masas cuadrupolo de impacto de electrón a 70 eV. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna de capilaridad HP-5M (25 m. 0.2 mm i.d., en una membrana de 0.3  $\mu$ m). La temperatura del horno fue programada a 40°C por 2 min, posteriormente programada para incrementar de 40 a 260°C (con incrementos de 10°C/min) y después se mantuvo a 260°C por 20 min. Las condiciones del detector de masas fueron a una interfase de 200°C y la adquisición de la masa se obtuvo en un rango de 20 y 550 Da. La temperatura del inyector y detector fueron de 250°C y 280°C, respectivamente. Se inyectó 1  $\mu$ L por muestra (3 mg/mL) y helio (rango de flujo, 1 mL/min) como gas acarreador. La identificación química de cada pico espectrométrico fue cotejada por comparación con espectros de masa estándares de la librería 1.7 del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

## 7.2. Estudios *in silico*

El estudio *in silico* se llevó a cabo en el programa AutoDock version 4.2.6. Los códigos de proteínas se obtuvieron de la base de datos de Protein Data Bank: 3PEQ (resolución 2.4 Å) para PPAR $\delta$  y 3X1H (resolución 2.3 Å) para PPAR $\gamma$ . La estructura L-165041 (CID: 6603901) fue construida mediante el programa ChemDraw y ensayada dentro del sitio activo de PPAR $\delta$  y cotejada con los residuos de aminoácidos reportados: Tyr473, His449 e His323 [153], mientras que pioglitazona (CID: 4829), con los residuos del sitio activo de PPAR $\gamma$  His323, Thr289, y Tyr473 [55]. 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 dihedro flexible dentro del sitio de unión a ligando de la proteína rígida, en donde el programa realiza varias corridas en cada experimento de docking. Cada corrimiento 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 menor de 2.0 y rankeadas por la menor energía, representada por un valor de  $\Delta G$ : 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.

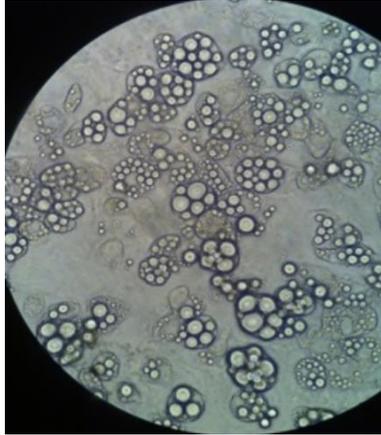
Todos los protocolos fueron validados a través de un re-docking de las moléculas cocrystalizadas dentro del sitio activo de cada isoforma: PPAR $\delta$  con ácido [(4-butil[2-metil-4'-(metilsulfanil) bifenil-3-il] sulfamoiil naftalen-1-il) oxi] acético, y PPAR $\gamma$  con ácido (7E,11Z, 14Z,17Z,20Z)-5-oxotricosa-7,11,14,17,20 pentaeno fanoxiacético. El RMSD 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 ligado, indicando que los parámetros del docking molecular pueden reproducir eficientemente las interacciones entre las estructuras cristalográficas de las moléculas y ambos receptores.

## **7.3 Estudios *in vitro***

### **7.3.1 Cultivo de las líneas 3T3-L1 y C2C12**

Se cultivaron fibroblastos de la línea 3T3-L1 murina a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en placas de cultivo de 6 pozos con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (8 X 10<sup>5</sup> células por pozo), con glucosa 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (0.1 mM), gentamicina, complementado con 10% de suero fetal bovino. El medio fue cambiado cada 2 días, hasta que se llegó a confluencia. Una vez que las células llegaron a confluencia, para inducir la diferenciación de fibroblastos a adipocitos, se trataron como se indica a continuación: en el día 0 se adicionó una mezcla conformada por isobutil metil xantina (100 µM), dexametasona (200 nM) e insulina bovina (80 nM). Estos tres compuestos son inhibidores de la proliferación y promotores de la diferenciación, induciendo la expresión de genes específicos encargados de la diferenciación, como la proteína de unión y amplificación de la caja CAAT β (C/EBPβ) y C/EBPδ [154] en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al día tres se adicionó nuevamente insulina bovina junto con medio DMEM y se continuó incubando bajo las mismas condiciones por cinco días más. La insulina, mediante la activación de su receptor, regula varias acciones que, a través de vías que promueven la glucogenogénesis y adipogénesis, activa factores nucleares involucrados en la diferenciación del fibroblasto en adipocito [154]. Durante toda la diferenciación se cambió el medio cada 2 días. Las células fueron usadas para experimentación al día 8 de diferenciación, al cual más del 95% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, presentando una forma circular-oval con

depósitos de grasa en forma de pequeñas esferas (Figura 2). Bajo las mismas condiciones de medio de cultivo, pero sin adicionar el coctel de diferenciación, fueron cultivados los mioblastos C2C12 (Figura 3) y llevados a confluencia para su posterior tratamiento.



**Figura 2.** Adipocitos diferenciados a partir de fibroblastos 3T3-L1. Microscopio óptico, 40X. Se pueden observar las vesículas lipídicas en el interior de las células.

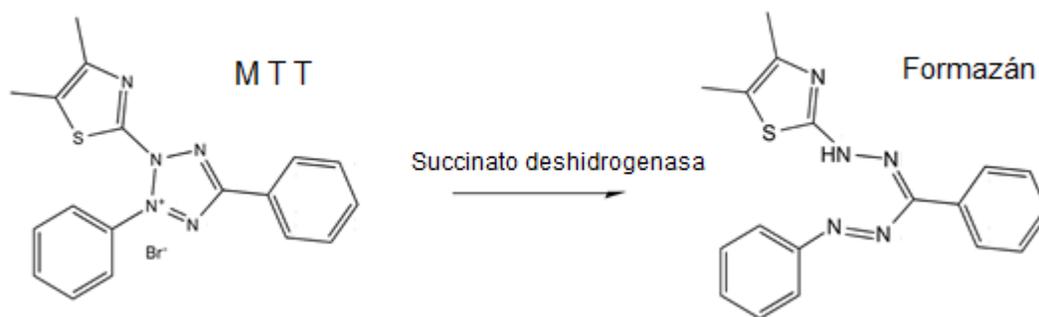


**Figura 3.** Mioblastos C2C12 observados en microscopio óptico a 10X.

### **7.3.2 Prueba de funcionalidad celular (MTT)**

Para conocer las concentraciones a las cuales no se afecta la funcionalidad celular, se realizaron pruebas de MTT a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con las fracciones F3, F4, F6 y F8, subfracciones F3-1 y F3-2, y los compuestos ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico,  $\alpha$ -amirina y lupeol (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ).

Por separado, las células 3T3-L1 y mioblastos C2C12 fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5000 células por pozo) y llevadas a confluencia en 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM, a las que se les cambió el medio cada 2 días; una vez en confluencia del 80%, se utilizaron para la prueba de funcionalidad celular. Tanto las fracciones como los compuestos puros se utilizaron a concentraciones de 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o  $\mu\text{M}$  para el caso de los compuestos ( $n=4$ ). Se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido, < 2%) ya que es un buen vehículo para moléculas no miscibles en agua (no polares). Se incluyó un control con DMSO. Las células se incubaron durante 24 h. La funcionalidad celular se determinó mediante la prueba de MTT (bromo de 3(4,5 dimetil-2-triazol-2,5) difenil tetrazoilo), compuesto que es reducido principalmente por la enzima mitocondrial integrante de la cadena transportadora de electrones (complejo II) succinato deshidrogenasa (entre otras deshidrogenasas) en formazán, el cual colorea las células de violeta. Siendo las células metabólicamente activas las que reducen el MTT a formazán (figura 4).



**Figura 4.** Reducción del MTT en formazán por la enzima mitocondrial del complejo 2, succinato deshidrogenasa.

Se prepararon 100 ml de MTT a una concentración de 0.1 mg/mL en PBS (buffer salino de fosfatos); una vez retirado el tratamiento con los extractos, se les agregó 200  $\mu$ l de la preparación de MTT a cada pozo, dejando en incubación por 3 h y cubriendo la placa con papel aluminio en condiciones de incubación. Transcurrido el tiempo se les retiró la preparación de MTT, se lavaron con PBS y se agregaron 200  $\mu$ l de isopropanol acidificado para solubilizar el formazán con 3.2  $\mu$ L/mL de HCl (0.04 M) y se mantuvo en agitación horizontal por 20 min. Se utilizó un lector de placas de Elisa (Thermo Scientific modelo Multiskan FC) para medir la absorbancia del compuesto colorido a 590 nm.

### 7.3.3 Tratamiento con las fracciones constitutivas de *H. sabdariffa*

Una vez seleccionadas las concentraciones mediante la prueba de MTT para los estudios posteriores con las fracciones, subfracciones y compuestos, se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 diferenciados en adipocitos y mioblastos C2C12 de la forma ya

mencionada en placas de 6 pozos (80,000 células por pozo). Los adipocitos y mioblastos se cultivaron por separado en 1.5 mL de medio DMEM por cada pozo (n=6); como controles positivos se utilizaron pioglitazona (25 mM) y L-165041 (10  $\mu$ M) en 1.5 ml de DMEM para cada uno de los pozos. Posteriormente se incubaron por 24 h. Transcurrido el tratamiento se aisló y cuantificó el RNAm, como se menciona a continuación.

### **7.3.4 Aislamiento y cuantificación del RNAm**

Una vez terminado el tratamiento por 24 h, se aisló el RNA total mediante el método de TRIzol de la siguiente manera:

Homogenización. Se eliminó el medio de los pozos, se agregó 500  $\mu$ L de TRIzol, el cual se basa en el uso de una solución monofásica constituida por fenol e isotiosinato de guanidina, que son facilitadores de la ruptura de la membrana plasmática y degradación de proteínas.

Separación. Una vez homogenizadas las células con TRIzol, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de TRIzol por cada tubo; se agitó vigorosamente 20 seg y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C, lo que permitió la formación de 3 fases: una superior de translúcida con el RNA, una interface y la fase inferior roja con el ADN y proteínas; se aisló la fase superior acuosa.

Precipitación. Se precipitó el RNAm con 500  $\mu$ L de isopropanol por cada mL de TRIZOL; se agitó suavemente por inversión. Se incubó en hielo por 30 min. Se

centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet.

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

Redisolución de RNA. Se eliminó el etanol y se dejó evaporar los residuos de etanol a temperatura ambiente. Se agregaron 20 µL de agua libre de RNAsas y se guardó a -70°C. Una vez aislado el ARN se cuantificó con el uso de un NanoDrop 2000 marca Thermo Scientific.

### **7.3.5 Expresión del RNAm por RT-qPCR**

La reacción de transcripción en reversa (RT) se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa (Estuche ImProm II de Promega) a partir de una concentración de 2 µg de RNA (templado); se utilizaron primers al azar (random primers 0.5 µg/µL) para obtener una cantidad abundante de cDNA total. Un volumen total de 20 µL de la mezcla de reacción, constituida por primers 0.5 mM de cada uno de los genes mostrados en la Tabla 8, y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl<sub>2</sub> 3.5 mM en un volumen final de 10 µL. Se incubó bajo el siguiente programa de 45 ciclos: desnaturalización 95°C por 10 seg; alineamiento 60°C por 7 seg; elongación 72°C por 10 seg para cada ciclo.

Para el análisis de expresión se utilizaron primers diseñados a partir de secuencias de genes de *Mus musculus* que se describen en la Tabla 4, utilizando como gen constitutivo al 36B4. Una vez obtenido los productos de PCR tiempo real se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para la comprobación de los productos de PCR.

**Tabla 8. Primers para el análisis de expresión en células 3T3L1 y C2C12.**

Genes 3TL-1	Primer directo	Primer reverso	Tamaño del producto (pb)
36B4 Gene Bank NM_007475.2	5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3'	5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3'	135
PPAR- $\alpha$ Gene Bank NM_011145	5'-TGGAGCTCGATGACAGTGAC-3'	5'-GTACTGGCTGTCAGGGTGGT-3'	161
PPAR- $\gamma$ Gene Bank NM_011146.1	5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3'	5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC'-3'	217
GLUT-4 Gene Bank NM_009204.2	5'-GATTCTGCTGCCCTTCTGTC-3'	5'-ATTGGACGCTCTCTCCTCAA-3'	168
FATP-1 Gene Bank NM_011977.3	5'-ACCAGTGTCAGGGGTACAG-3'	5'-TGTCTCCAGCTGACATGAG-3'	174

### **7.3.6 Western blot**

Para evaluar el efecto de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre las proteínas de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP, GLUT4, AMPK $\alpha$ 1 y Akt2 se utilizaron mioblastos C2C12 bajo las siguientes condiciones: Medio DMEM complementado con SFB, cambiando el medio cada 48 h, CO $_2$  al 5% y 37°C. Se utilizaron las mismas concentraciones del tratamiento de cultivo de adipocitos 3T3-L1. Se utilizaron cajas Petri para mayor obtención de proteína. Una vez pasados los tratamientos se extrajo la proteína total, como se indica a continuación.

#### **7.3.6.1 Obtención de proteínas totales**

Se retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con PBS frío, evitando despegar las células. Posteriormente se despegaron las células con gendarme y 2 mL de PBS frío, y se colocaron en tubos individuales por pozo. Se centrifugó a 5000 x g a 4°C por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se desechó. Posteriormente, las células se lisaron mediante congelamiento con nitrógeno 3 veces, dejando descongelar entre cada congelamiento. Se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de lisis (Por cada 1 mL: 10  $\mu$ L de HEPES [1M], 3.35  $\mu$ L de KCl [3M], 7  $\mu$ L de MgCl $_2$  [0.2 M], 1  $\mu$ L de DTT [1M], 40  $\mu$ L de PMSF [0.1M] y 5  $\mu$ L de Complete® (1 pastilla en 2 mL de H $_2$ O desionizada). Después se homogenizaron las muestras a pipeteo riguroso por 25 seg cada muestra. A continuación, se centrifugaron a 2058 x g a 4°C por 5 min y se colectó el sobrenadante (proteínas). Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas por medio de Nanodrop 2000 y se congelaron las muestras a -80°C.

### 7.3.6.2 Preparación de geles SDS PAGE

La preparación de los geles se realizó cómo se muestra en las siguientes tablas para el gel separador y para el gel concentrador:

Gel separador

	15%		12%		10%	
	2 geles	1 gel	2 geles	1 gel	2 geles	1 gel
Tris-HCl [1.5 M] pH 8.8	2.5 mL	1.25 mL	2.5 mL	1.25 mL	2.5 mL	1.25 mL
Agua desionizada	2.34 mL	1.17 mL	3.34 mL	1.67 mL	4.02 mL	2.01 mL
SDS (10%)	100 µL	50 µL	100 µL	50 µL	100 µL	50 µL
Acrilamida/BIS acrilamida (30%)	5 mL	2.5 mL	4 mL	2 mL	2.33 mL	1.66 mL
TEMED	10 µL	5 µL	10 µL	5 µL	10 µL	5 µL
Persulfato de amonio	50 µL	25 µL	50 µL	25 µL	50 µL	25 µL

## Gel concentrador

	2 geles	1 gel
Tris-HCl [1.5 M] pH 8.8	1.25 mL	0.625 mL
Agua desionizada	3.050 mL	1.520 mL
SDS (10%)	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Acrilamida/BIS acrilamida 30%)	650 $\mu$ L	325 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Persulfato de amonio	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L

### 7.3.6.3 Electroforesis de proteínas

- El buffer de corrida se utilizó frío y se utilizó máximo 3 veces.
- La concentración de proteína utilizada para los experimentos fue de 80  $\mu$ g.
- Previo al corrimiento electroforético las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos con el buffer de carga (Biorad) en una proporción 1:1.
- Se colocaron las muestras en los pozos de manera individual.
- El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 120 volts por 110 min.

- Una vez terminado el corrimiento se procedió a realizar la transferencia a una membrana PVDF, como se muestra a continuación.

#### **7.3.6.4 Transferencia del gel a membrana de PVDF (trans-blot turbo)**

- La membrana PVDF se colocó previamente en metanol frío por 30 seg y después se colocó en buffer de transferencia/metanol (20%). Posteriormente se colocó el gel (sin la región de gel concentrador).
- Se colocaron los geles y membrana entre 7 filtros (previamente embebidos en buffer de transferencia frío con metanol al 20%), formando un sándwich.
- Se realizó la transferencia a 1.5 volts por 25 min.

#### **7.3.6.5 Bloqueo de membrana**

- Se colocó la membrana en una solución de leche Svelty (2 g de leche en 40 mL de TBS frío).
- Se incubó en agitación de vaivén moderada por 2 h.
- Se lavaron las membranas 5 veces con TBS-Tween frío en agitación de vaivén por 5 min cada lavado.
- Se Lavó con TBS 1 vez por 5 min.

#### **7.3.6.6 Marcación de proteínas de interés con anticuerpos**

- Se incubaron las membranas con anticuerpo primario (dependiendo sea el caso) por 24 h en agitación de vaivén a 4°C.
- Pasado el tiempo, se repitieron los procedimientos de lavado.

- Se incubaron con anticuerpo secundario HRP (dependiendo el caso) por 2 h en agitación (temperatura ambiente).
- Se lavaron las membranas 5 veces en intervalos de 5 minutos como se mencionó anteriormente.
- Se reveló con luminol (500  $\mu$ L de luminol y 500  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno, se mezclaron y la membrana se bañó a pipeteo suave por 30 seg).
- Se reveló en fotodocumentador.
- Para revelar proteínas constitutivas (Housekeeping) se lavó la membrana 3 veces con buffer a pH 2 (3.028 g de Tris-HCl aforado a 500 mL de agua desionizada, y ajustado a pH a 2) frío (Stripping), 3 veces por 30 min cada lavado (temperatura ambiente).
- Se volvió a bloquear con solución bloqueadora (1 g de leche Svelty en 20 mL de TBS) con las mismas especificaciones mencionadas.
- Se lavó nuevamente con las mismas especificaciones mencionadas (TBS-Tween).
- Se incubó con anticuerpo secundario y después con primario bajo las mismas especificaciones de incubación y lavados mencionados.
- Finalmente se reveló como se ha mencionado.

## **7.4 Tinción de rojo oleoso para determinación de acumulación de lípidos**

Para evaluar la acumulación de lípidos se utilizaron adipocitos 3T3-L1 maduros, los cuales fueron tratados con  $\alpha$ -amirina y lupeol a una concentración de 10  $\mu$ M cada 24 h, por un periodo de 72 h (tratamientos: 0, 24, 48 y 72 h). Se utilizó pioglitazona como control positivo a una concentración de 5  $\mu$ M en intervalos de tratamiento similares. Después de 72 h, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con formaldehído al 3.7% por 30 min a temperatura ambiente. Después fueron lavadas 3 veces con PBS frío. A continuación, fueron teñidas con 1.2 mg/mL de rojo oleoso (Oil Red O dye/60% de solución de isopropanol, Sigma-Aldrich) por 10 min. Se retiró el rojo oleoso y se lavó 3 veces con PBS/etanol (10% v/v). Los adipocitos fueron fotografiados en microscopio a 10 x. Finalmente, el rojo oleoso contenido en los adipocitos se extrajo a través de agitación constante por 15 min con isopropanol previamente preparado al 4% de Nonidet P-40 y evaluado por espectrometría a 510 nm. Después los datos fueron normalizados con el control para determinar la acumulación de lípidos.

## **7.5 Inmunodetección de GLUT4**

Para la inmunodetección de GLUT4 se utilizó la línea celular C2C12 bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas, utilizando cajas de 8 pozos (Labotaq) a una concentración de  $5 \times 10^3$  células (n=4). Una vez a 80% de confluencia fueron tratadas con  $\alpha$ -amirina y lupeol [10 $\mu$ M], utilizando como control positivo pioglitazona [5  $\mu$ M]. Se dejaron incubando con los tratamientos independientes a 15 y 30 minutos.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se les retiró el medio de cultivo y fueron lavadas con PBS 2 veces. A continuación, las células fueron fijadas con formaldehído al 60% durante 15 minutos. Se lavaron las células nuevamente con PBS, 3 veces. Posteriormente se adicionó anticuerpo anti-GLUT4 (1:1000) y se dejaron incubando en vaivén por 2 horas a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBS, 3 veces en intervalos de 15 minutos. Después se adicionó anticuerpo secundario (1:2000) acoplado con rodamina y se incubaron en vaivén por 1 hora. A continuación, se lavó nuevamente con PBS, 3 veces por 15 minutos cada vez. Posteriormente fueron marcados los núcleos celulares con DAPI (1:2000) y se dejó incubando en vaiven por 15 minutos y se lavó 1 vez con PBS. Posteriormente se desacoplaron las cajas de cultivo de sus moldes y se le colocó un cubreobjetos a cada una de las laminillas. Finalmente, las laminillas fueron observadas y analizadas mediante un microscopio confocal a 10X y 40X, pudiéndose detectar a GLUT4 mediante la fluorescencia en color rojo.

## **7.6 Estudios in vivo**

### **7.6.1 Prueba de tolerancia a la glucosa oral**

Se utilizaron ratones macho normales de la cepa CD1, de 4 a 6 semanas de edad, con un peso entre los 25 y 35 g de peso, los cuales se obtuvieron del bioterio de la UAM-I. Los animales se alimentaron con alimento para roedor marca Laboratorios Harlan y agua baja en sales *ad libitum*, a una temperatura de cuarto de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con 45-65% humedad bajo condiciones de día y noche de 12 h de luz blanca y 12 h de oscuridad.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las normas nacionales e internacionales estándares, incluyendo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001, México) y la norma National Institutes of Health (NIH), publicación No. 85-23 de la salud, seguridad y confort de animales de experimentación. El Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa aprobó el experimento de acuerdo con el protocolo (Número de aprobación: DCBS.374.2018).

Se formaron 4 grupos con una n=5. Previamente fueron dejados en ayuno por 12 h y se les midió la glucemia (tiempo 0). El grupo 1 recibió 4 mL/Kg de solución Tween al 5%; el grupo 2 (control positivo) recibió 20 mg/kg de pioglitazona; los grupos del 3 y 4 recibieron 10 mg/kg de  $\alpha$ -amirina y lupeol respectivamente, vía intraperitoneal. Después de 15 min se administró dextrosa (2 g/Kg) vía intragástrica y, pasado el tiempo, se midió la glucemia a 30, 60, 90 y 120 min.

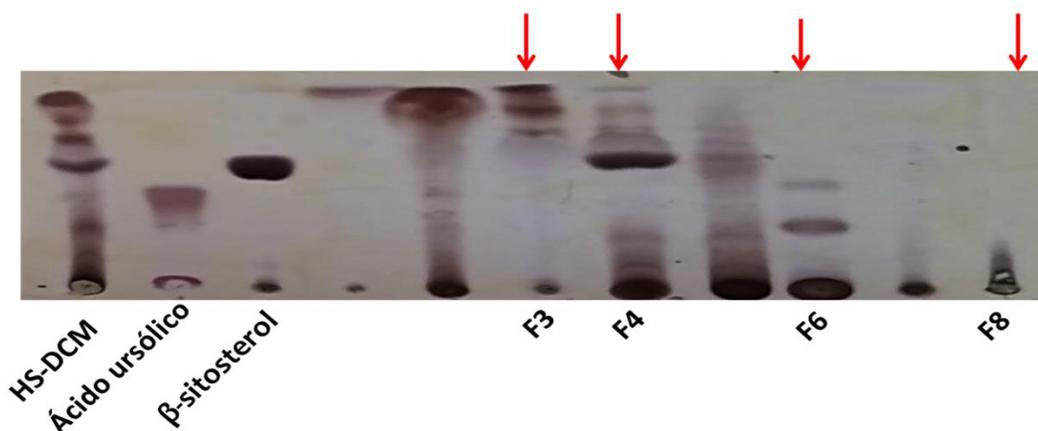
## **8. Análisis estadístico**

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

## 9. Resultados

### 9.1 Fitoquímica

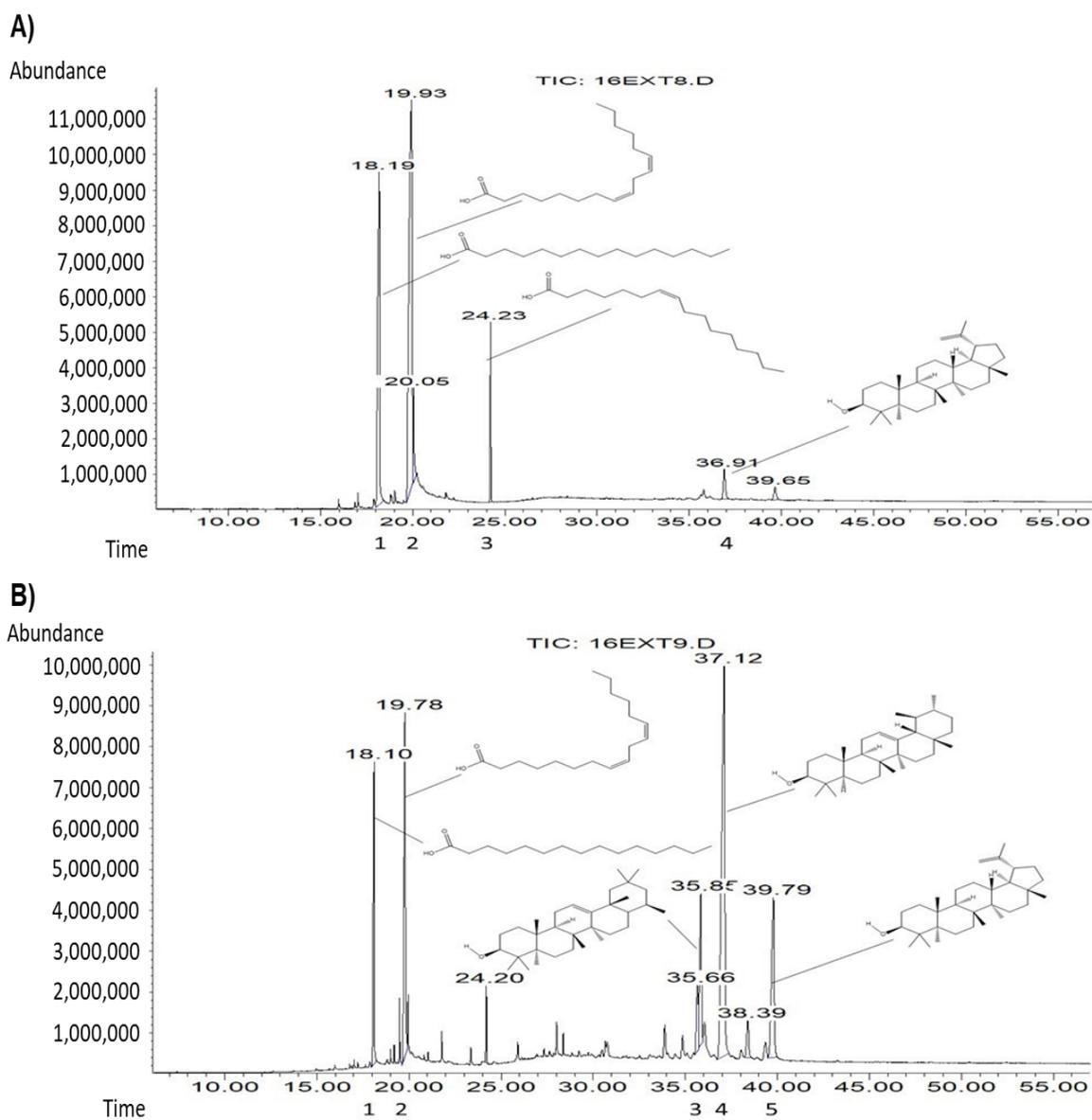
Se obtuvieron 71 fracciones del HS-DCM, las cuales fueron reunidas con base en su similitud química observada por CCF. Resultaron 10 fracciones: F1 (0.7 g), F2 (3.3 g), F3 (4.1 g), F4 (1.8 g), F5 (0.91 g), F6 (1.2 g), F7 (0.41 g), F8 (0.94 g), F9 (0.62 g) y F10 (0.35 g), de las cuales, 4 fueron seleccionadas (F3, F4, F6 y F8) por ser las fracciones mayoritarias y más representativas de los componentes presentes en el HS-DCM, tal como se ilustra en la figura 5.



**Figura 5.** CCF del HS-DCM. De izquierda a derecha: HS-DCM, ácido ursólico,  $\beta$ -sitosterol, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 y F8. Flechas en rojo muestran las fracciones mayoritarias y seleccionadas para los estudios posteriores. Sistema de corrimiento fase normal con n-hexano 70%/acetato de etilo 30%, revelado con sulfato cérico.

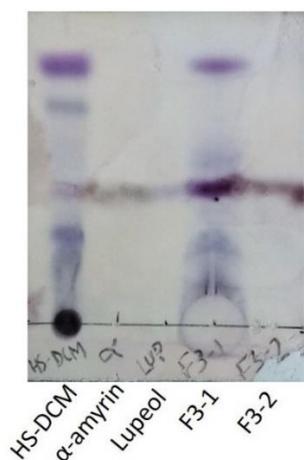
Posterior a la evaluación de las 4 fracciones seleccionadas en el cultivo celular y por RT-qPCR, la fracción con efecto dual F3 (1.5 g) se sometió a un nuevo fraccionamiento mediante CC bajo las siguientes condiciones: columna (400 x 25 mm) previamente empacada con silica gel 60 (Merck, 0.2-0.5 mm, 20 g) y fraccionada bajo las mismas condiciones (volumen de cada muestra 25 mL), resultando en 2 subfracciones; F3-1 (420 mg) y F3-2 (310 mg), las cuales fueron sometidas a análisis por CG-EM para la elucidación de sus componentes.

La identificación de compuestos a través de CG-EM muestra a 5 compuestos mayoritarios de las fracciones F3-1 y F3-2: ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico,  $\alpha$ -amirina y lupeol, siendo ácido linoleico y  $\alpha$ -amirina los componentes mayoritarios de la F3-1 y F3-2 respectivamente (figura 6).



**Figura 6.** Análisis e identificación de los compuestos mayoritarios en las subfracciones F3-1 y F 3-2 por CG-EM. A) F3-1, de izquierda a derecha: 1) ácido palmítico 27.73%, 2) ácido linoleico 58.7%, 3) ácido oleico 6.33% y 4) lupeol 1.46%. B) F3-2, 1) ácido palmítico 9.71%, 2) ácido linoleico 17.3%, 3)  $\beta$ -amirina 4.2%, 4)  $\alpha$ -amirina 41.96% y 5) Lupeol 8.98%.

Se realizó una CCF para corroborar la presencia de  $\alpha$ -amirina y lupeol en el HS-DCM y las fracciones F3-1 y F3-2, a través del cotejamiento con auténticos estándares ( $\alpha$ -amirina +98% de pureza, lupeol +94% de pureza, Sigma-Aldrich), en donde se observa la presencia de ambos triterpenos en las subfracciones F3-1 y F3-2 (figura 7).

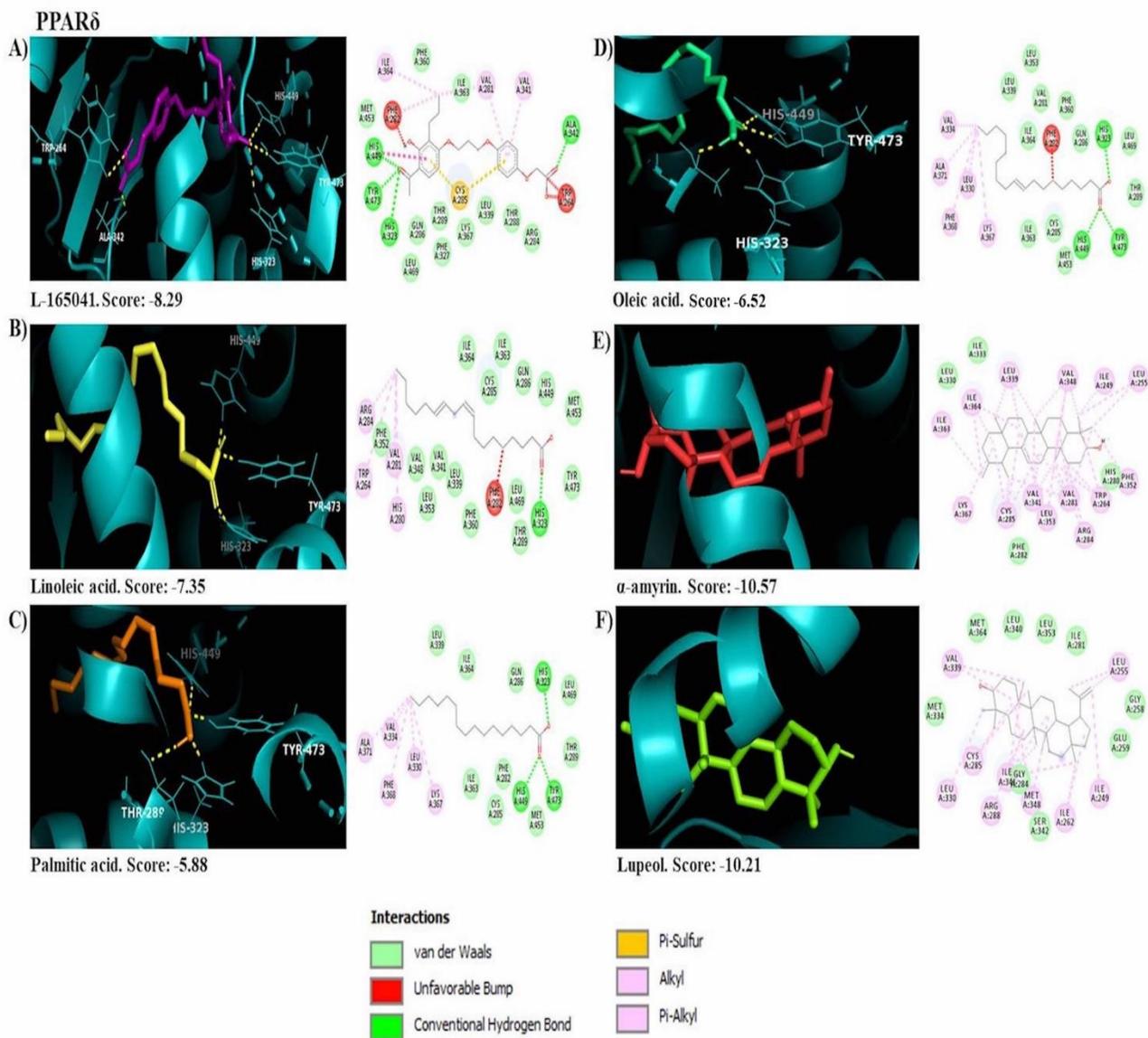


**Figura 7.** CCF para identificación y cotejamiento de  $\alpha$ -amirina y lupeol con HS-DCM, F3-1 y F3-2 por CCF. De izquierda a derecha: HS-DCM,  $\alpha$ -amirina, lupeol, F3-1 y F3-2. Fase normal, Sistema de elución con *n*-hexano 80% / acetato de etilo 20 %, revelado con 4-hidroxibenzaldehído.

## 9.2. Estudios *in silico*

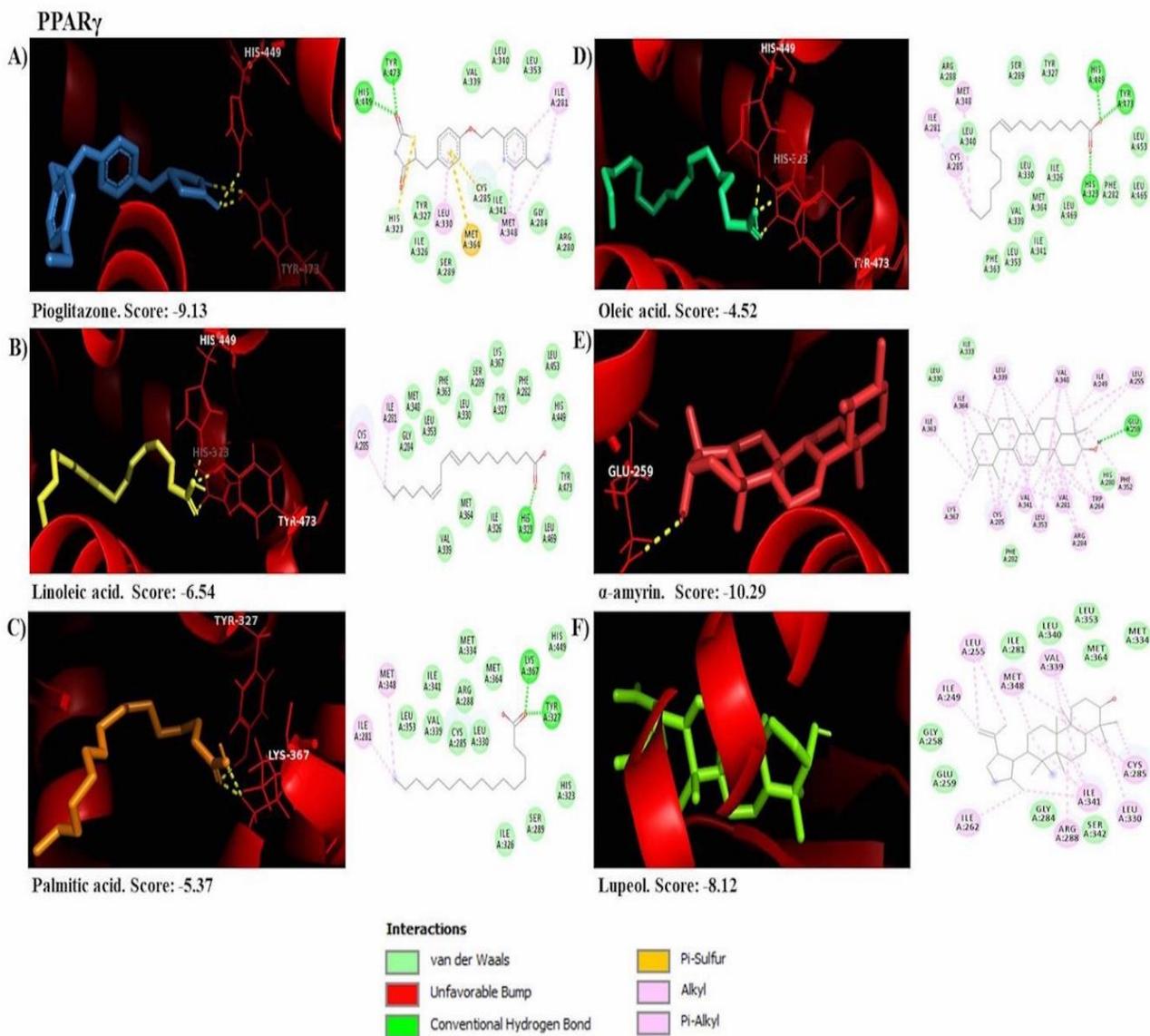
Respecto al estudio *in silico*, el L-165041 (control positivo para PPAR $\delta$ ) mostró una energía de unión denotada por  $\Delta G$  de -8.29 Kcal/mol, mostrando interacciones en el sitio de activación de PPAR $\delta$  mediante puentes de hidrógeno con residuos de

aminoácidos de His449, Tyr473, His323 y Ala342, los contactos en su residuo Cys385 fueron mediante interacción  $\pi$ -sulfuro con sus dos anillos aromáticos (figura 8A). El ácido linoleico mostró un  $\Delta G = -7.35$  Kcal/mol e interacciones polares con su residuo His323 similar a L-165041 (figura 8B); el ácido palmítico mostró un  $\Delta G = -5.88$  Kcal/mol, menor que L-165041, con interacciones polares a través de sus residuos His449, Thr289, His323 (figura 8C). En el caso del ácido oleico, un  $\Delta G = -6.52$  Kcal/mol e interacciones polares entre su cabeza polar con residuos de aminoácidos His449, Tyr473, His323, de manera similar a L-165041 y mayor al ácido palmítico (figura 8D). La  $\alpha$ -amirina no mostró interacciones polares, pero sí interacciones hidrofóbicas ( $\pi$ -sp<sup>3</sup> y van der Waals) con la mayoría de los residuos que conforman el sitio activo y un  $\Delta G$ : -10.52 Kcal/mol mayor a L-165041 (figura 8E). Lupeol mostró un tipo de interacción similar a  $\alpha$ -amirina y mayor al control positivo (Figura 8F). Todos los ácidos grasos mostraron interacciones no polares en la cola hidrofóbica mediante fuerzas de van der Waals (figuras 8B-D).



**Figura 8.** Modelamiento *in silico* de acoplamiento molecular en 3D y 2D de moléculas constitutivas del HS-DCM con el sitio de activación de PPAR $\delta$ . A) L-165041 (control positivo). B) Ácido linoleico. C) Ácido palmítico. D) Ácido oleico. E)  $\alpha$ -amirina. F) Lupeol. Valores mostrados en  $\Delta G$  Kcal/mol.

En el caso de PPAR $\gamma$ , pioglitazona (control positivo) exhibió un  $\Delta G$  de -9.13 Kcal/mol en el sitio de activación de PPAR $\gamma$  e interacciones polares con His449 y Tyr473, además de interacciones con algunos residuos de aminoácidos no polares mediante alkil y  $\pi$ -sp<sup>3</sup> con su cola hidrofóbica (figura 9A). Por otro lado, el ácido linoleico mostró un  $\Delta G$ = -6.54 Kcal/mol e interacciones con su cabeza polar con el residuo His323 (figura 9B). El ácido palmítico con una  $\Delta G$ : -5.37 Kcal/mol mediante puentes de hidrógeno en Lys367 y Tyr327 (figura 9C). Por otra parte, el ácido oleico mostró un  $\Delta G$ : -4.52 Kcal/mol e interacciones polares en His449, Tyr473, His323 (figura 9D). Todos los ácidos grasos exhibieron interacciones no polares en la cola hidrofóbica mediante fuerzas de van der Waals (figuras 9B-D). De manera interesante,  $\alpha$ -amirina exhibió un  $\Delta G$ = -10.29 Kcal/mol mayor a pioglitazona y una interacción polar con Glu259, además de interacciones no polares (sp<sup>3</sup> y  $\pi$ -sp<sup>3</sup>) entre los residuos del sitio activo y los anillos que conforman al triterpeno. Por otro lado, el lupeol mostró un  $\Delta G$ : -8.12 Kcal/mol e interacciones no polares de manera similar a  $\alpha$ -amirina (figuras 9E-F).



**Figura 9.** Modelamiento *in silico* de acoplamiento molecular 2D y 3D de moléculas constitutivas del HS-DCM con sitio de activación de PPAR $\gamma$ . A) Pioglitazona (control positivo). B) Ácido linoleico. C) Ácido palmítico. D) Ácido oleico. E)  $\alpha$ -amirina. F) Lupeol. Valores mostrados en  $\Delta G$  Kcal/mol.

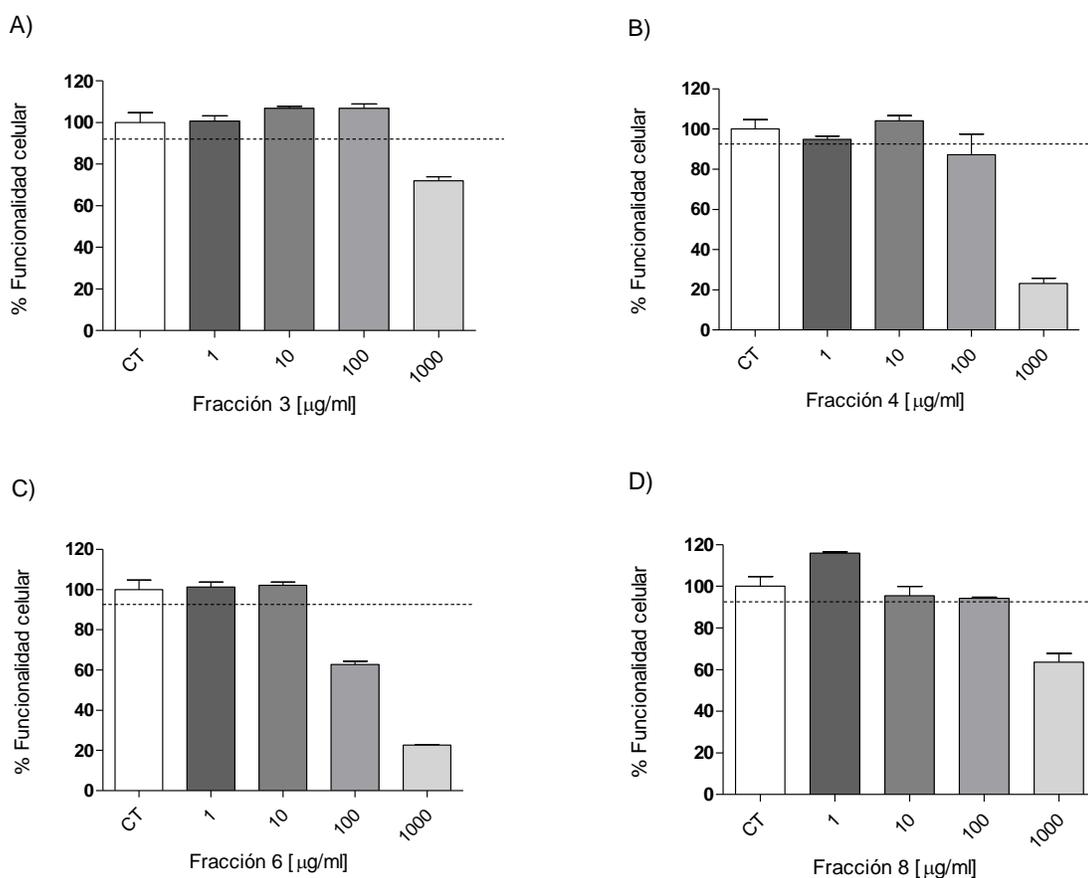
## 9.3 Estudios *in vitro*

### 9.3.1 Pruebas de Funcionalidad celular (MTT)

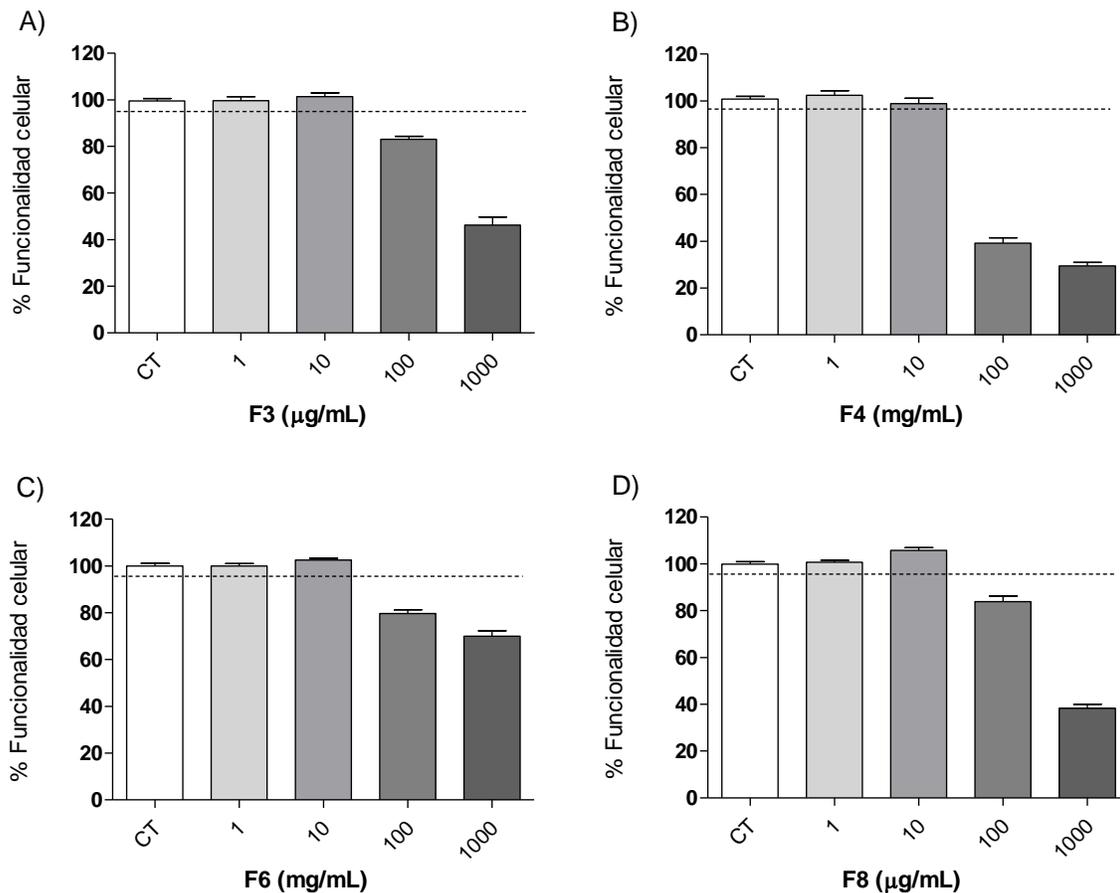
Tanto las fracciones F3, F4, F6 y F8, como las subfracciones F3-1 y F3-2 fueron evaluadas en una prueba de funcionalidad celular conocida como prueba de MTT en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12. La prueba se realizó con la finalidad de conocer las concentraciones adecuadas a las cuales las fracciones no afectarían la funcionalidad celular, es decir activas metabólicamente hablando, con un criterio de seleccionar aquellas que mantuvieran la funcionalidad celular entre el 90-100%.

Concentraciones de 1 a 100 µg/mL de la F3 no mostraron afectación en la funcionalidad celular de las células 3T3-L1. Sin embargo, la concentración de 1000 µg/mL sí disminuyó dicha funcionalidad. De manera similar, la concentración de 1 y 10 µg/mL no tuvo efecto, sin embargo, las concentraciones de 100 y 1000 µg/mL disminuyeron la funcionalidad celular en mioblastos C2C12 (figura 10A y 11A). La fracción F4 a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL no disminuyeron por debajo del 90% la funcionalidad celular en ambas líneas celulares. Por su parte, la concentración de 1000 µg/mL disminuyó notoriamente la funcionalidad celular en ambas líneas celulares (figuras 10B y 11B). La fracción F6 a concentraciones de 1 y 10 µg/mL se mantuvo de manera similar al control, sin embargo, a las concentraciones de 100 y 1000 µg/mL disminuyeron la funcionalidad celular en un 40% y 80% respecto al control en ambas líneas celulares (figura 10C y 11C). Respecto a F8, las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL no tuvieron efecto sobre la funcionalidad celular en fibroblastos 3T3-L1, pero la concentración de 1000 µg/mL disminuyó en un 40%. Por otro lado, en

mioblastos C2C12 las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  se mantuvieron similares al control. Sin embargo, las concentraciones de 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  disminuyeron la funcionalidad celular (figuras 10D y 11D).



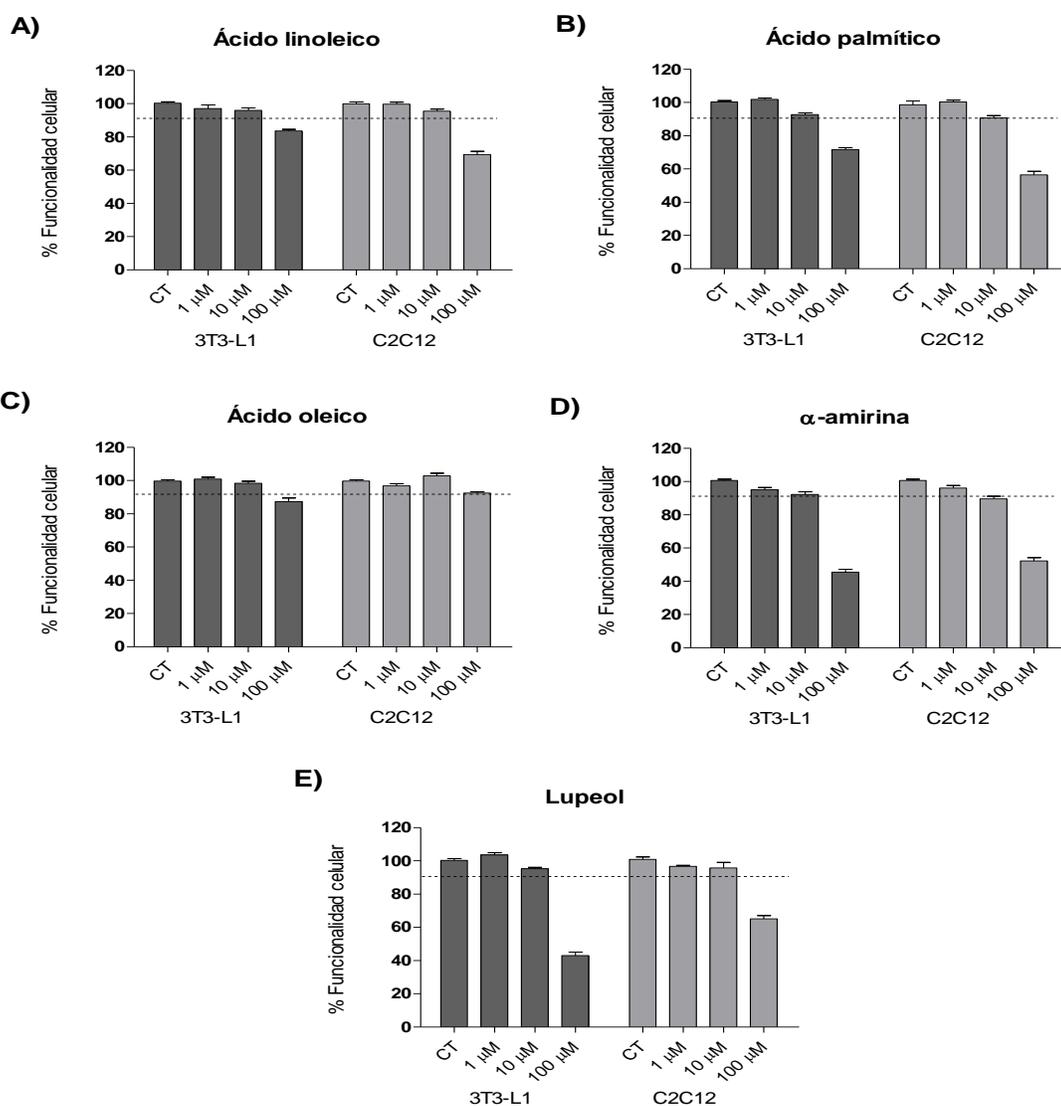
**Figura 10.** Prueba de funcionalidad celular a diferentes concentraciones de las fracciones mayoritarias del HS-DCM en fibroblastos 3T3-L1. Control: Medio DMEM+DMSO (<2%). n=6. A) F3. B) F4. C) F6. D) F8.



**Figura 11.** Prueba de funcionalidad celular (MTT) a diferentes concentraciones de las fracciones mayoritarias del HS-DCM en mioblastos C2C12. Control: Medio DMEM+DMSO (<2%). n=6. A) F3. B) F4, C) F6. D) F8.

En la evaluación de los compuestos sobre la funcionalidad celular se probaron 3 concentraciones: 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12. En donde los ácidos grasos linoleico, palmítico y oleico, a concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , mantuvieron la funcionalidad celular muy parecido al control en ambas líneas celulares. Sin embargo, las concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  disminuyeron la funcionalidad celular en

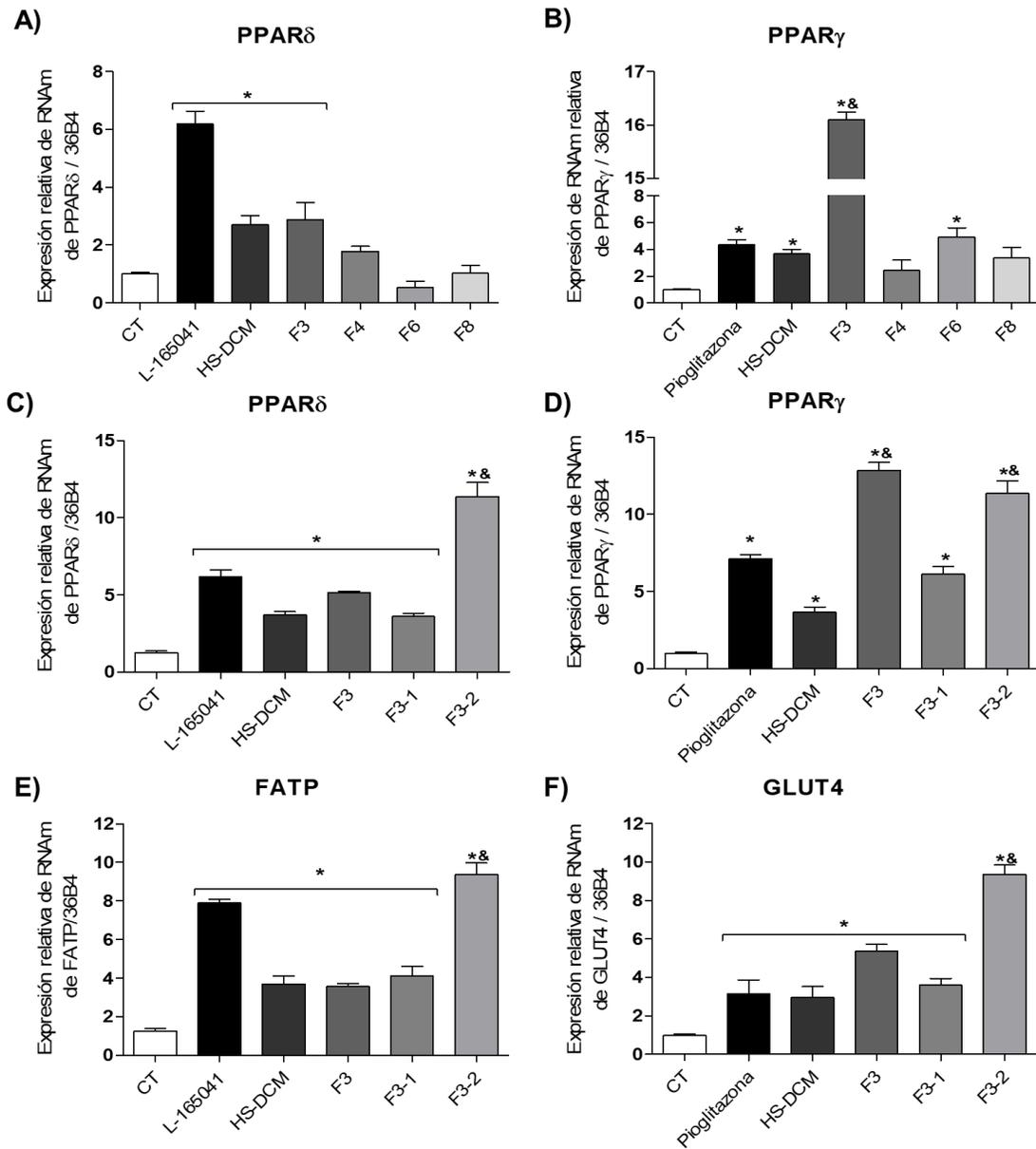
más de un 20%, a excepción del ácido oleico, el cual se mantuvo por encima del 90% en todas las concentraciones en fibroblastos 3T3-L1 (Figura 12A-C). En el caso de los triterpenos  $\alpha$ -amirina y lupeol, las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$  no disminuyeron la funcionalidad celular y se mantuvieron entre 90% y 100% en ambas líneas celulares. Sin embargo, la concentración de 100  $\mu\text{M}$  disminuyó la funcionalidad celular en más de un 40% en ambas líneas celulares (figuras 12D-E).



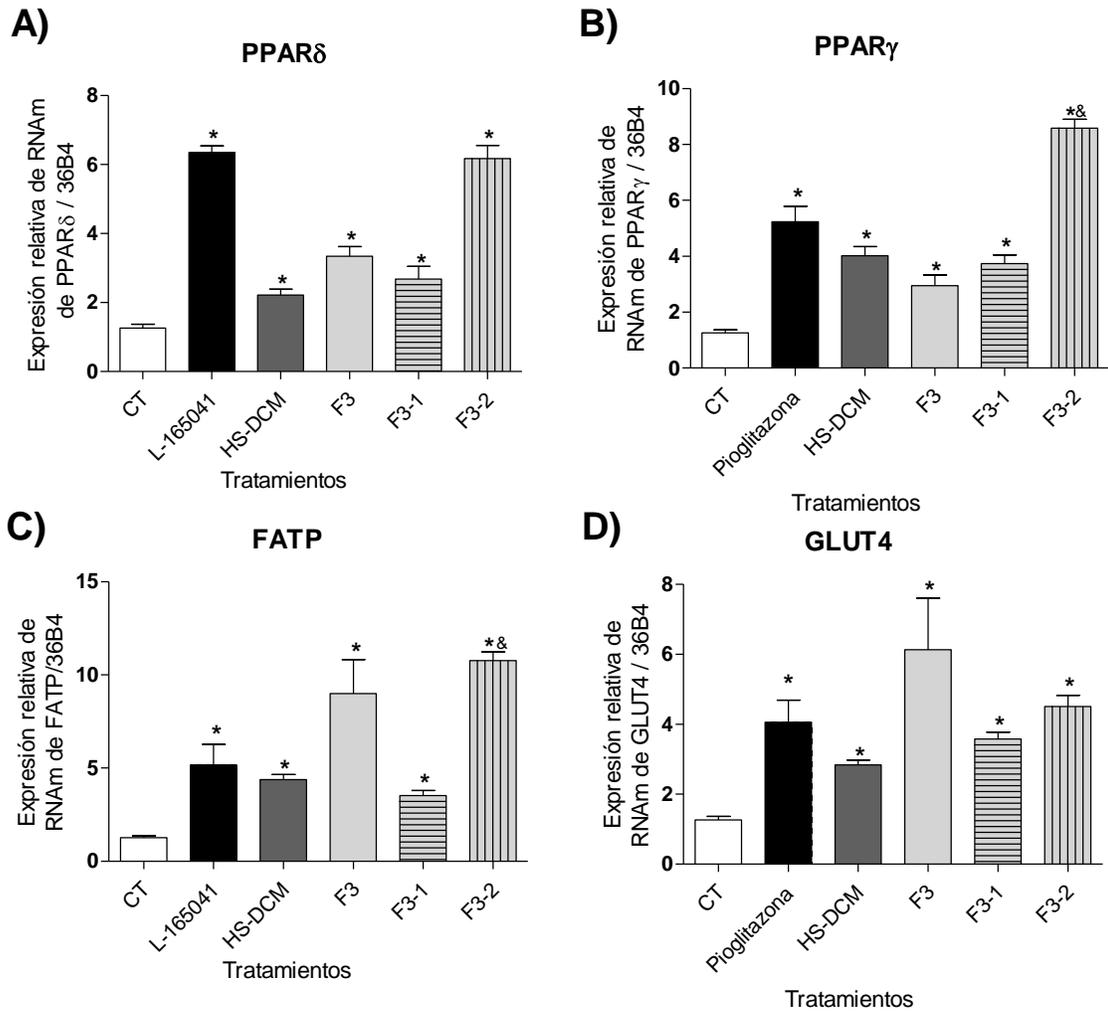
**Figura 12.** Prueba de funcionalidad celular (MTT) a diferentes concentraciones de los compuestos identificados en las subfracciones F3-1 y F3-2 en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos C2C12. Control: Medio DMEM+DMSO (<2%). n=6. A) Ácido linoleico. B) Ácido palmítico. C) Ácido oleico. D)  $\alpha$ -amirina. E) Lupeol.

### **9.3.2. Expresión de genes mediante RT-qPCR**

Tanto las fracciones F3, F4, F6 y F8, subfracciones F3-1 y F3-2 y compuestos puros fueron evaluados sobre la expresión del RNAm en adipocitos 3T3-L1 y mioblastos C2C12 mediante RT-qPCR. La fracción F3 y sus subfracciones, F3-1 y F3-2 mostraron efecto agonista dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  y sus genes río abajo FATP y GLUT4, respectivamente (figuras 13A-F y 14A-F). Respecto a la expresión de PPAR $\gamma$ , F3 mostró 4 veces más efecto comparado con pioglitazona y el HS-DCM en adipocitos (figura 13B). F6 tuvo efecto sobre la expresión de PPAR $\gamma$ , similar a pioglitazona y HS-DCM; sin embargo, no evidenció efecto sobre PPAR $\delta$  (figura 13A-B). Las fracciones F4 y F8 no tuvieron efecto sobre PPAR. De manera similar el HS-DCM, F3 y las subfracciones F3-1 y F3-2 tuvieron efecto dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$ , FATP y GLUT4, siendo el más potente la F3-2 (figuras 13C-F y 14C-F).

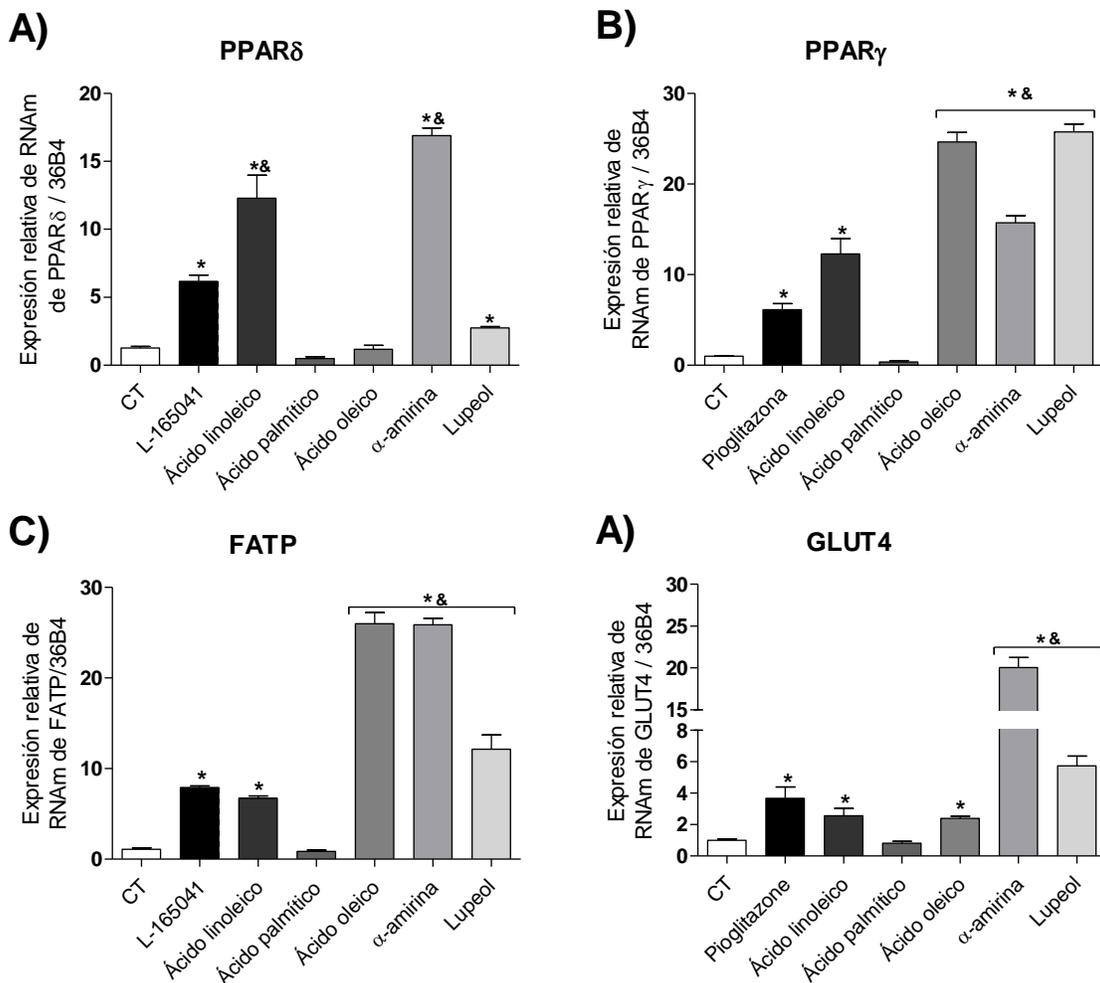


**Figura 13.** Efecto del HS-DCM y fracciones sobre la expresión de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en adipocitos 3T3-L1. A) PPAR $\delta$ . B) PPAR $\gamma$ . C) PPAR $\delta$ . D) PPAR $\gamma$ . E) FATP. F) GLUT4. CT: Control, pioglitazona (control positivo de PPAR $\gamma$ ), y L-16504 (control positivo de PPAR $\delta$ ). Media  $\pm$  EEM. ( $n = 6$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT; <sup>&</sup>Diferencia significativa respecto al CT positivo.  $p < 0.05$ .



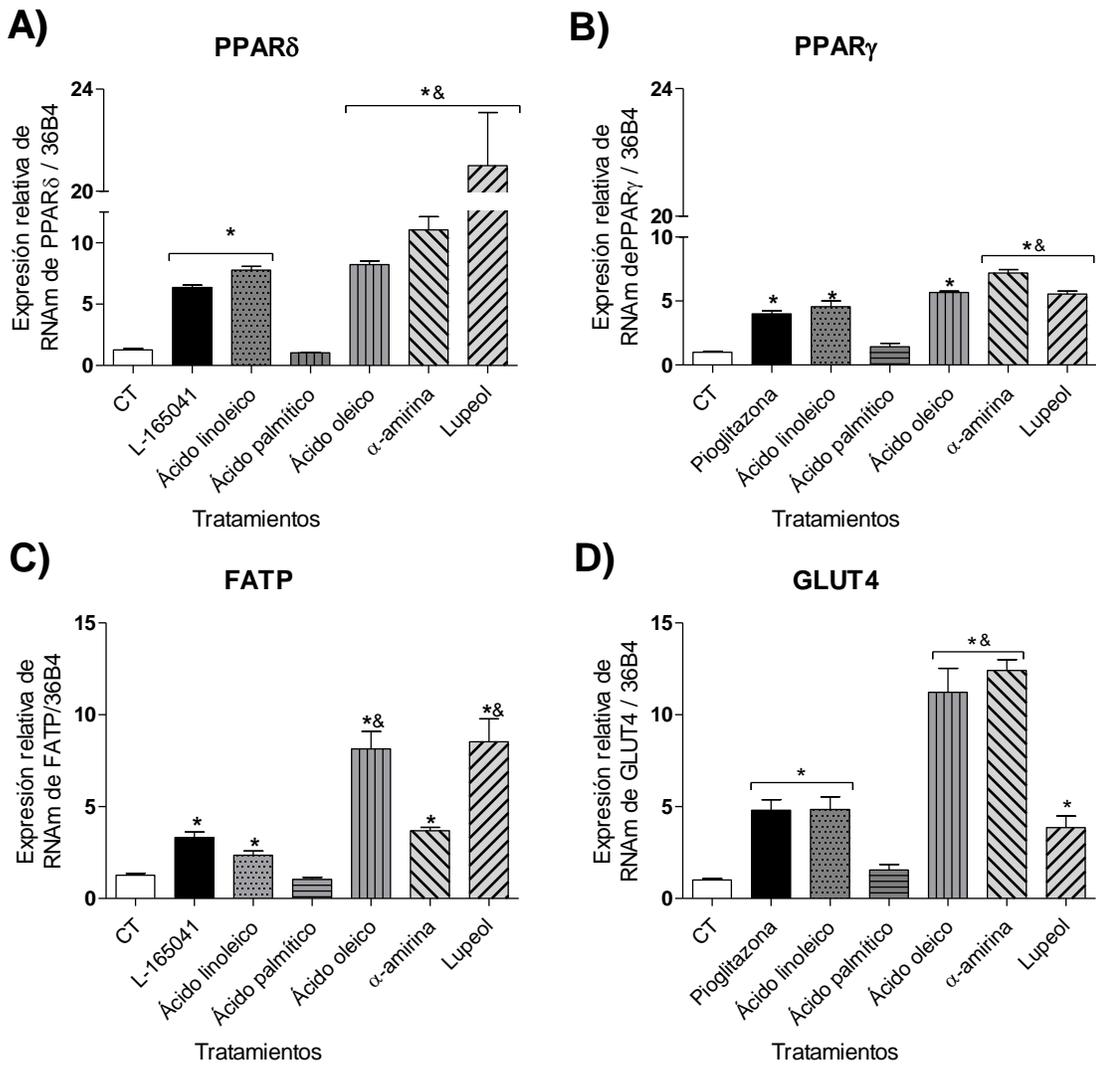
**Figura 14.** Efecto del HS-DCM, F3, subfracciones F3-1 y F3-2 sobre la expresión de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en mioblastos C2C12. A) PPAR $\delta$ . B) PPAR $\gamma$ . C) PPAR $\delta$ . D) PPAR $\gamma$ . E) FATP. F) GLUT4. CT: Control, Pioglitazona (control positivo de PPAR $\gamma$ ), y L-16504 (control positivo de PPAR $\delta$ ). Media  $\pm$  EEM. ( $n = 6$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT; <sup>&</sup>Diferencia significativa respecto al CT positivo.  $p < 0.05$ .

Respecto al efecto de los compuestos identificados en las subfracciones F3-1 y F3-2, el ácido linoleico y oleico mostraron efecto dual sobre PPAR $\delta$ / $\gamma$  y sus genes río abajo FATP y GLUT4 en ambas líneas celulares (figuras 15A-D y 16A-D), a excepción del ácido oleico que no mostró efecto sobre PPAR $\delta$  en adipocitos 3T3-L1. El ácido palmítico no tiene efecto sobre PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  en ambas líneas celulares (figuras 15A-D y 16A-D).



**Figura 15.** Efecto de compuestos mayoritarios en F3 sobre la expresión de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en adipocitos 3T3-L1. A) PPAR $\delta$ . B) PPAR $\gamma$ . C) FATP. D) GLUT4. CT: Control, pioglitazona (control positivo de PPAR $\gamma$ ), y L-16504 (control positivo de PPAR $\delta$ ). Media  $\pm$  EEM. ( $n = 6$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT ( $p < 0.05$ ). &Diferencia significativa respecto al CT positivo ( $p < 0.05$ ).

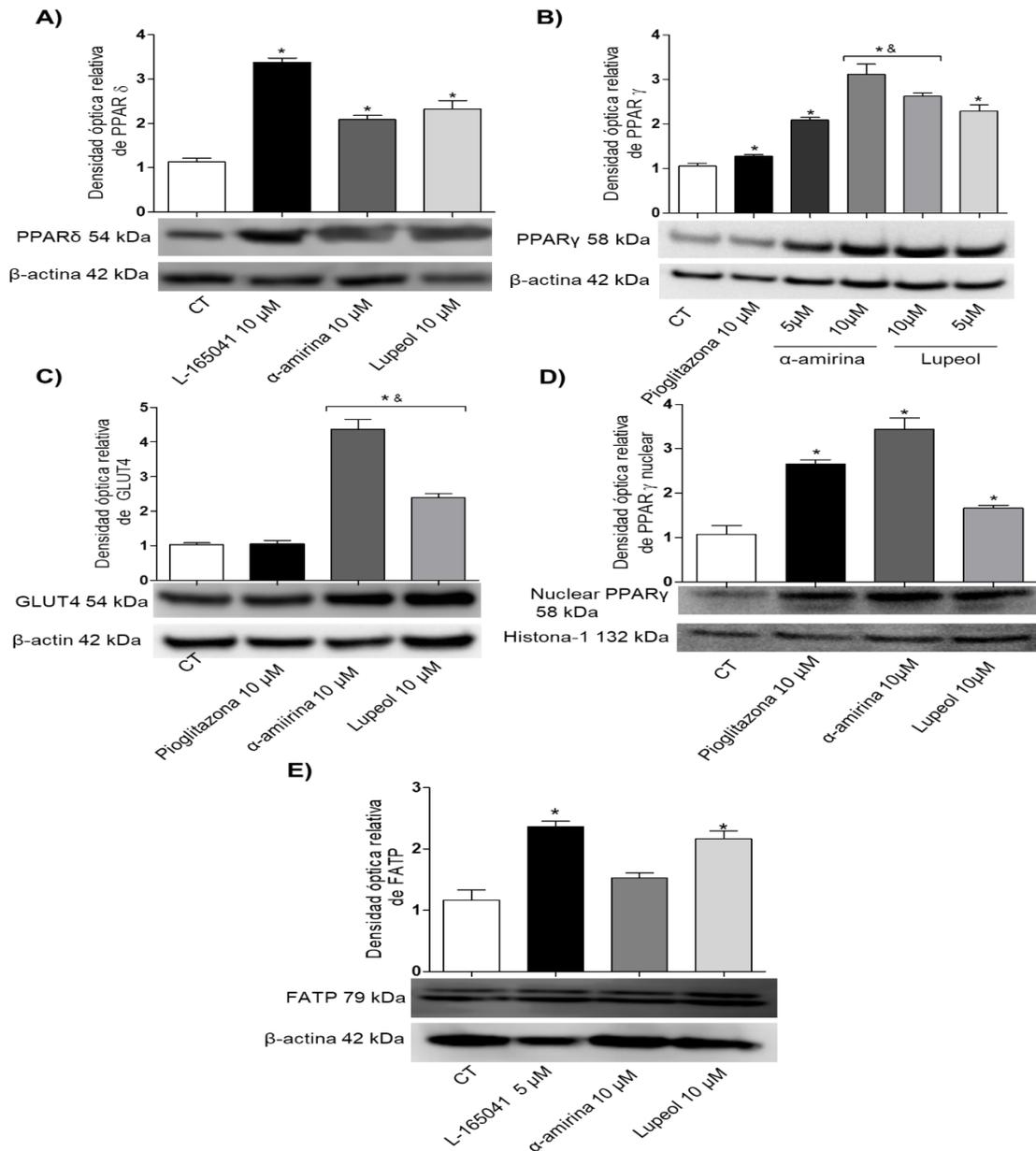
Respecto a los triterpenos,  $\alpha$ -amirina y lupeol tienen efecto dual de PPAR $\delta/\gamma$  y sus genes río abajo, inclusive en algunos casos mayor a los controles positivos (figura 15A-D y 16A-D).



**Figura 16.** Efecto de los compuestos identificados en F3 sobre la expresión de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en mioblastos C2C12. A) PPAR $\delta$ . B) PPAR $\gamma$ . C) FATP. D) GLUT4. CT: Control, pioglitazona (control positivo de PPAR $\gamma$ ), y L-165041 (control positivo de PPAR $\delta$ ). Media  $\pm$  EEM. ( $n = 6$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT ( $p < 0.05$ ). &Diferencia significativa respecto al CT positivo ( $p < 0.05$ ).

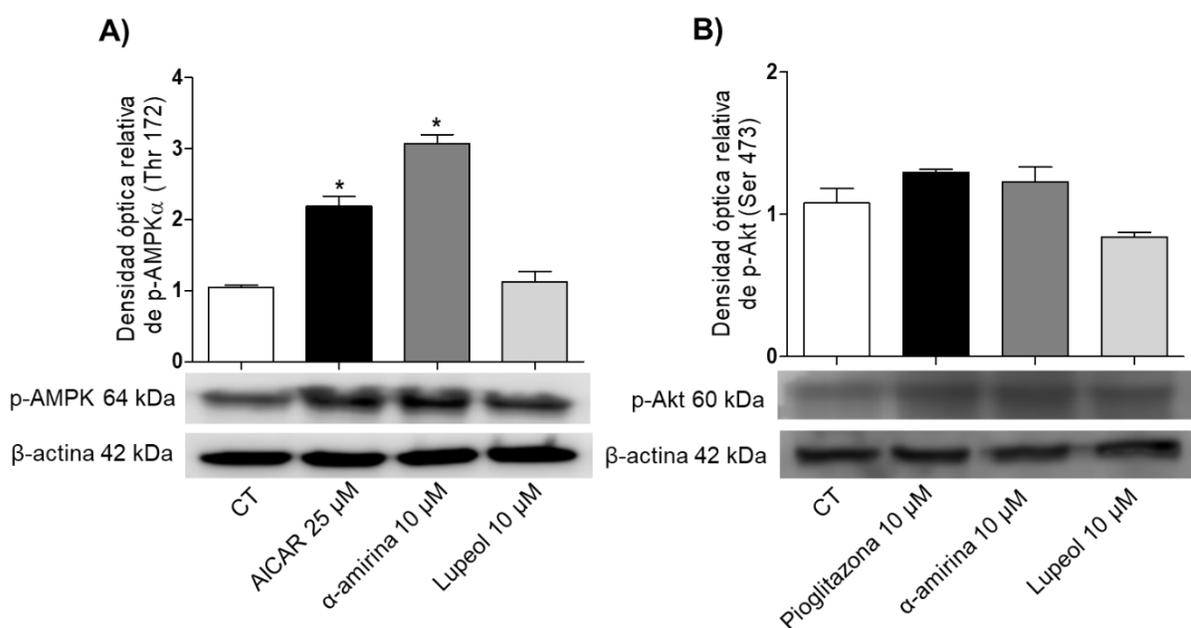
### 9.3.3. Western blot

El contenido de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$  citosólico y nuclear, GLUT4 y FATP fue analizado a los 30 minutos después de los tratamientos.  $\alpha$ -amirina y lupeol aumentaron el contenido de PPAR $\delta$ , aunque menor a la mostrada con L-165041 (figura 17A). Respecto a PPAR $\gamma$ ,  $\alpha$ -amirina (5  $\mu$ M) y lupeol (5  $\mu$ M) aumentaron de manera similar a pioglitazona. De manera interesante, la concentración de 10  $\mu$ M tuvo mayor efecto que pioglitazona y fue 2 veces mayor respecto al CT (figura 17B). En el caso de GLUT4, pioglitazona no aumentó respecto al CT.  $\alpha$ -amirina y lupeol aumentaron respecto a CT y pioglitazona, teniendo mayor efecto  $\alpha$ -amirina (figura 17C). Respecto al PPAR $\gamma$  nuclear,  $\alpha$ -amirina y lupeol lo aumentaron respecto al CT e inclusive  $\alpha$ -amirina en mayor magnitud que la pioglitazona (figura 17D). Respecto a FATP,  $\alpha$ -amirina no tuvo diferencias significativas respecto al CT y pioglitazona, mientras lupeol aumentó significativamente respecto a L-165041 (figura 17E).



**Figura 17.** Efecto de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre A) PPAR $\delta$ , B) PPAR $\gamma$ , C) GLUT4, D) PPAR $\gamma$  nuclear y E) FATP en mioblastos C2C12 a los 30 minutos. CT: control, L-165041: Control positivo de PPAR $\delta$  y pioglitazona: Control positivo de PPAR $\gamma$ . Media  $\pm$  EEM. ( $n = 3$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT; &Diferencia significativa respecto con el CT positivo.  $p < 0.05$ .

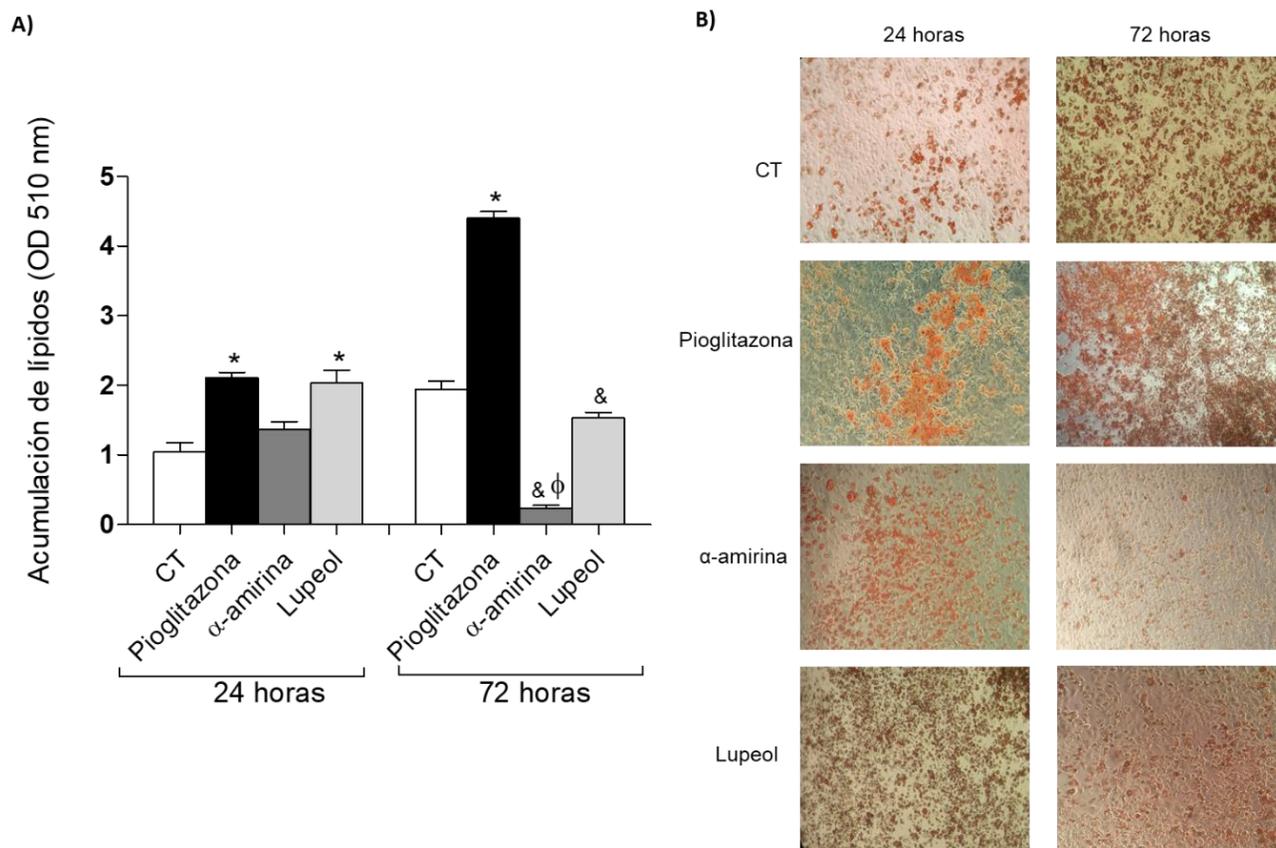
Posterior a la evaluación de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4, se evaluó su efecto sobre AMPK $\alpha$ 1 y Akt2 en su forma activa (fosforilación en Thr 172 y Ser 473, respectivamente).  $\alpha$ -amirina aumentó la concentración citosólica de p-AMPK $\alpha$ , mostrando diferencias significativas respecto al CT e incluso fue mayor que el control positivo (AICAR, sustrato activador sintético de AMPK $\alpha$ 1). Por otro lado, lupeol no mostró efecto (figura 18A). Al evaluar los triterpenos sobre p-Akt, éstos no mostraron efecto significativo respecto al control ni a pioglitazona (figura 18B).



**Figura 18.** Efecto de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre proteínas en mioblastos C2C12 a los 30 minutos. A) p-AMPK $\alpha$ 1 (Thr 172). B) p-Akt2 (Ser 473). AICAR: Control positivo de AMPK $\alpha$  y pioglitazona: Control positivo de Akt. Media  $\pm$  EEM. ( $n = 3$ ). \*Diferencia significativa respecto al CT ( $p < 0.05$ ).

En la evaluación de los triterpenos sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1, se observó que  $\alpha$ -amirina no tiene efecto sobre la acumulación de lípidos y se mantiene similar al CT después del tratamiento de 24 h; sin embargo, pioglitazona (control positivo) aumentó significativamente respecto al control y  $\alpha$ -amirina. Por otra parte, lupeol aumentó la concentración de lípidos de manera similar a pioglitazona. A las 72 h,  $\alpha$ -amirina redujo significativamente la concentración de lípidos respecto a CT y pioglitazona. Por el otro lado, lupeol se mantiene similar al control y significativamente menor a pioglitazona (figura 19A-B).

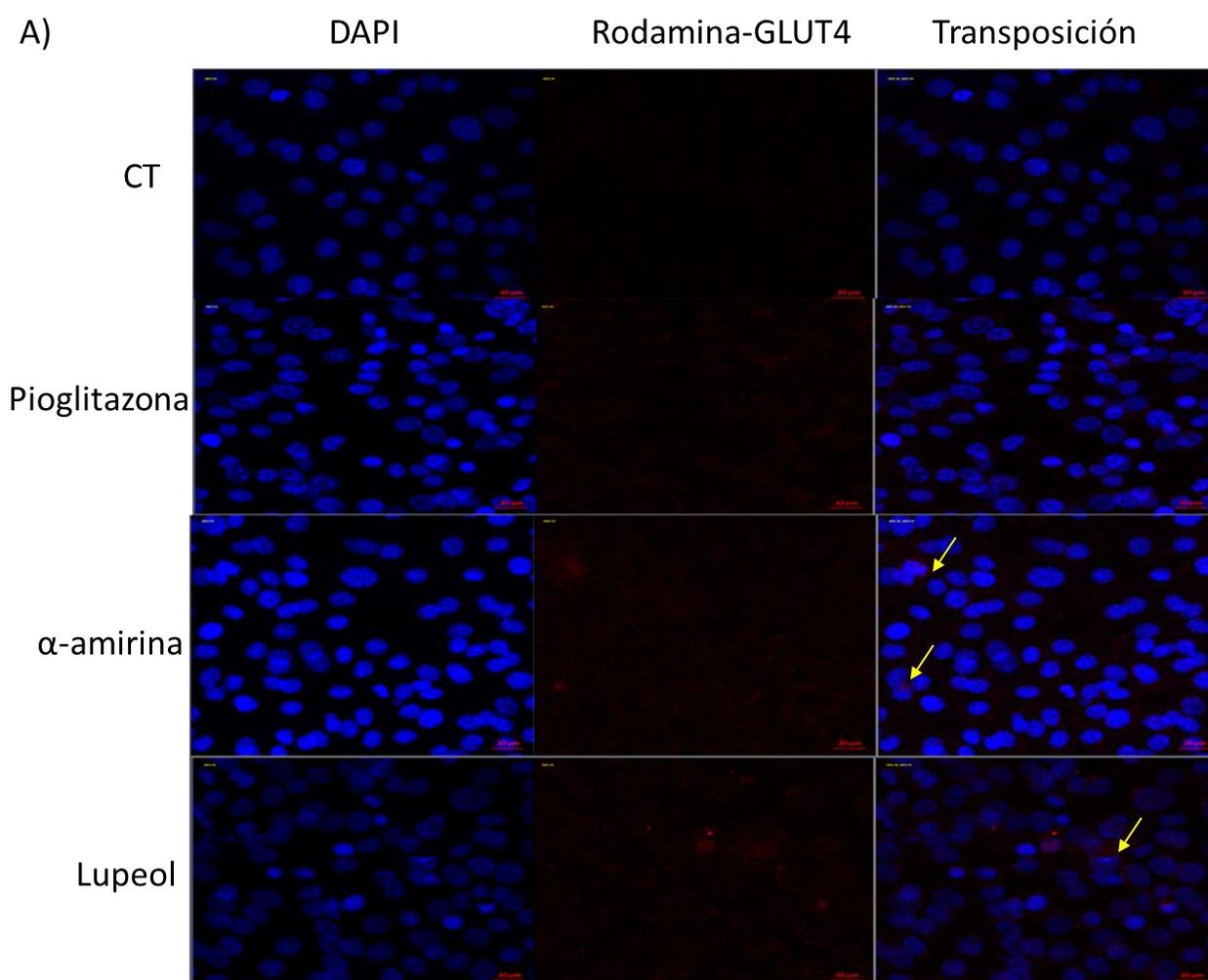
### 9.3.4. Evaluación de $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la acumulación de lípidos

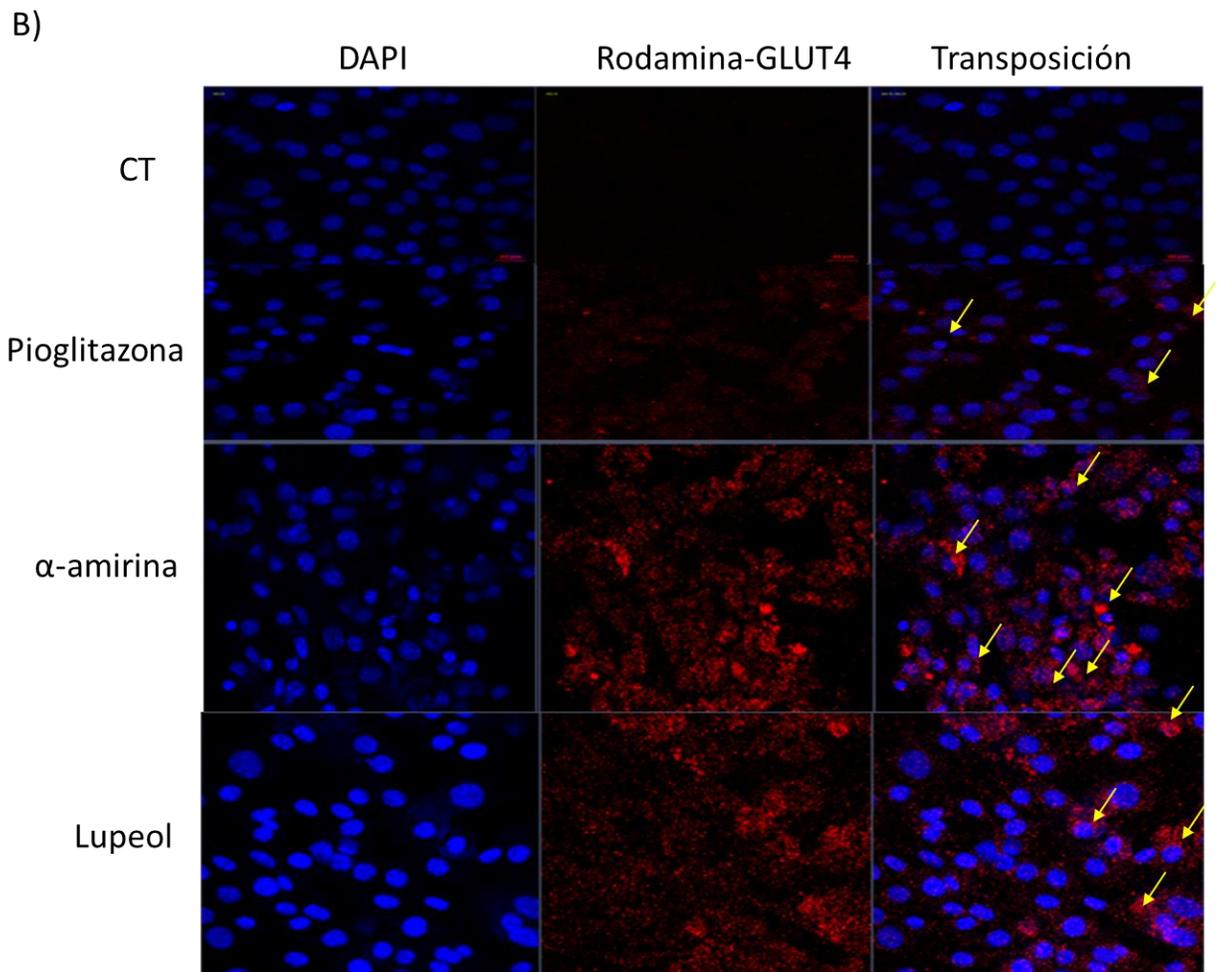


**Figura 19.** Efecto de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. **A)** Evaluación de la acumulación de lípidos después de 24 h y 72 h. **B)** Adipocitos 3T3-L1 teñidos con rojo oleoso después de tratamientos a 24 h y 72 h. Fotografías microscópicas a 10X. Pioglitazona: control positivo. \*Diferencia significativa respecto al CT ( $p < 0.05$ ), Media  $\pm$  EEM. &Diferencia significativa respecto a pioglitazona ( $p < 0.05$ ).  $\phi$ Disminución significativa de lípidos respecto al CT.

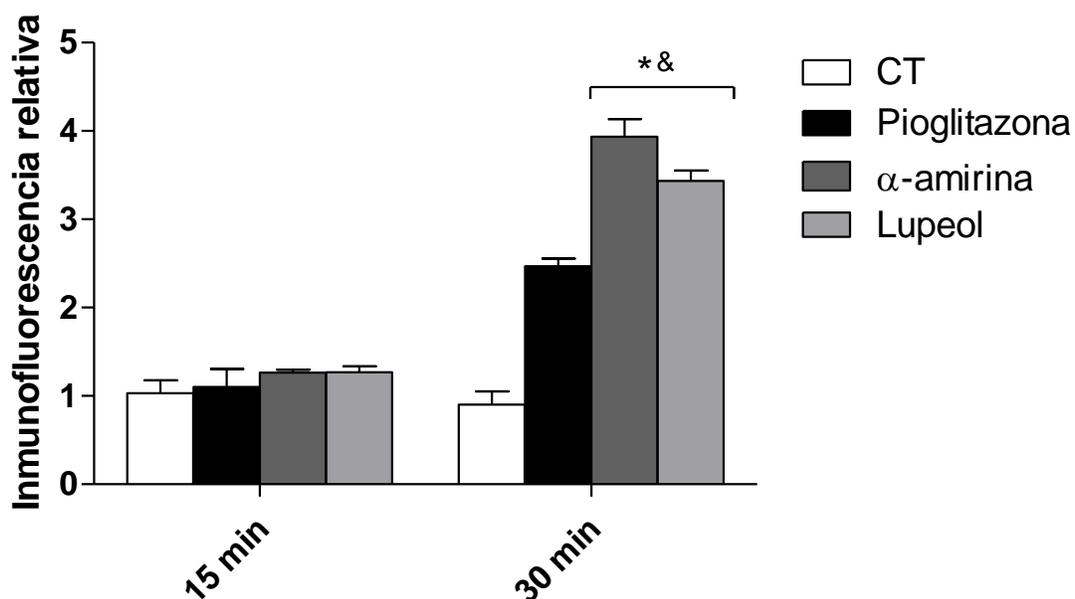
### 9.3.5. Inmunodetección de GLUT4

En la evaluación de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la detección de GLUT4 por inmunofluorescencia en mioblastos C2C12, se pudo observar que  $\alpha$ -amirina y lupeol no mostraron efecto significativo con respecto al CT a los 15 min posteriores al tratamiento (figuras 20A, 21). 30 minutos después del tratamiento,  $\alpha$ -amirina y lupeol tuvieron un efecto significativo sobre GLUT4 comparado con el control y pioglitazona (figuras 20B, 21).





**Figura 20.** Ensayo de inmunofluorescencia del efecto de la  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre GLUT4 en mioblastos C2C12. **A)** Efecto a los 15 min después de los tratamientos (n=4). **B)** Efecto a los 30 min después de tratamientos.  $\alpha$ -amirina y lupeol a [10  $\mu$ M] y pioglitazona [5 $\mu$ M]. DAPI: marcador de núcleos (Azul), Rodamina-GLUT4: Anticuerpo secundario contra GLUT4 marcado con rodamina (Rojo), Transposición: transposición de imágenes DAPI/GLUT4-rodamina. Microfotografías tomadas a 40x en microscopio confocal.

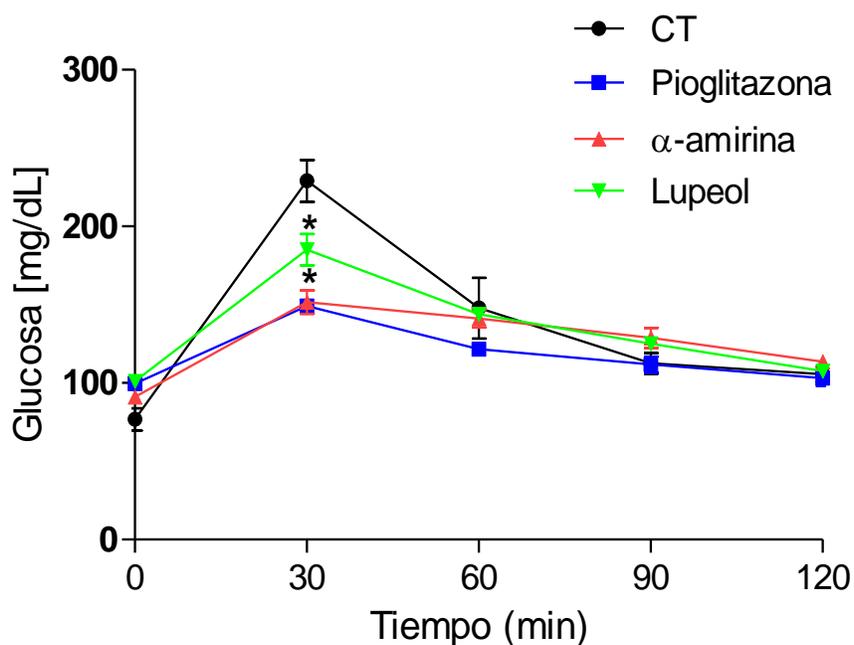


**Figura 21.** Representación gráfica de la inmunodetección de GLUT4. Inmunofluorescencia relativa de GLUT4 en mioblastos C2C12, detectada a los 15 y 30 minutos después de los tratamientos. \*Diferencia significativa respecto al CT ( $p < 0.05$ ), Media  $\pm$  EEM. &Diferencia significativa respecto al CT positivo ( $p < 0.05$ ) ( $n=4$ ).

#### 9.4 Estudios *in vivo*

Finalmente se evaluó el efecto de los triterpenos sobre la glucemia en ratones normales mediante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), en donde la  $\alpha$ -amirina mostró un efecto antihiper glucemiante de manera similar a pioglitazona y con diferencia significativa respecto al control, inhibiendo totalmente el pico hiper glucémico a los 30 min y manteniendo el descenso de glucosa a los 90 y 120 min, de manera similar a pioglitazona. El efecto del lupeol fue también antihiper glucemiante, sin embargo, menor a  $\alpha$ -amirina y pioglitazona (figura 22).

### 9.4.1. Efecto de $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la glucemia



**Figura 22.** Efecto de la  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre la glucemia en ratones normales cepa CD1. Ratones macho de 12 semanas de edad (entre 25 g y 35 g de peso). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, 15 min antes de la administración oral de glucosa (2 g/kg). Grupo control (Tween 20 al 5%), Pioglitazona (5 mg/ kg),  $\alpha$ -amirina y lupeol (10 mg/kg). n=5, Media $\pm$ EEM. \*Diferencia significativa respecto al control (CT), p<0.05.

## 10. Discusión

Al fraccionar el HS-DCM se obtuvieron cuatro fracciones mayoritarias (F3, F4, F6 y F8), las cuales fueron evaluadas sobre la expresión del RNAm de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4 en mioblastos C2C12 y adipocitos 3T3-L1. F3 mostró efecto en ambas líneas celulares, lo que sugirió que F3 contiene los compuestos activos principales del HS-DCM, con efecto dual sobre PPAR $\delta/\gamma$ .

La fracción F3 se sometió a un nuevo fraccionamiento, en donde sus componentes no se lograron separar individualmente debido a la similitud de sus constituyentes en sus propiedades fisicoquímicas, principalmente de polaridad, lo cual, aunque no permitió la separación de sus componentes de manera individual, permitió la obtención de dos subfracciones: F3-1 y F3-2.

La subfracción F3-1 mostró una acción dual para PPAR $\delta/\gamma$  y sus genes río abajo FATP y GLUT4, de manera similar a L-165041 y pioglitazona. F3-2 aumentó la expresión de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4, inclusive en mayor magnitud que los controles positivos en ambas líneas celulares. Esto perfila a la  $\alpha$ -amirina y al lupeol como los compuestos principales responsables del efecto dual de PPAR $\delta/\gamma$ .

Los compuestos ácido linoleico y ácido oleico identificados en F3-1 mostraron un efecto similar a los controles positivos en los ensayos *in vitro* e *in silico*. En otro estudio, el ácido linoleico también mostró efecto sobre la expresión de RNAm de PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  en un modelo de cultivo primario de hepatocitos de pollo [118]. En el presente trabajo se confirmó este efecto dual sobre PPAR $\delta/\gamma$ , pero en adipocitos 3T3-

L1 y mioblastos C2C12. Otro estudio con el ácido oleico también mostró que éste aumenta la expresión del RNAm de PPAR $\delta$  en cultivo primario de hepatocitos de ratón y en las líneas celulares Hep G2 y Huh 7 [155], lo cual también se corroboró en este trabajo en mioblastos C2C12 y adipocitos 3T3-L1.

El ácido palmítico no tuvo efecto sobre PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4. Al parecer, al ser un ácido graso saturado, pierde propiedades sobre el efecto agonista de PPAR. Comparado con ácidos grasos saturados, los ácidos grasos insaturados, como el ácido linoleico y ácido oleico se han reportado con efectos benéficos para la salud [156]. Se ha sugerido que los ácidos grasos saturados tienen propiedades estructurales por su mayor rigidez, lo cual les impide poseer propiedades y efectos biológicos, al menos sobre PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , como se muestra con el ácido palmítico, el cual difiere del ácido oleico por un doble enlace en el carbono 9, lo que parece brindarle propiedades agonistas duales de PPAR $\delta/\gamma$ .

Los resultados mostraron que tanto la fracción F3 y las subfracciones F3-1 y F3-2, el ácido linoleico, ácido oleico,  $\alpha$ -amirina y lupeol tienen efectos similares o mayores a los CT positivos, tanto en adipocitos 3T3-L1 como en mioblastos C2C12. Sin embargo, la expresión de PPAR $\gamma$  fue proporcionalmente mayor en adipocitos que en mioblastos, lo cual se puede explicar debido a que la expresión de este receptor nuclear es mayoritaria en tejido adiposo en comparación con cualquier otro tejido, tal y como reportó Janani y col. [7]. Estos resultados sugieren que dichos compuestos pueden no ser órgano-selectivos, lo que les podría brindar un efecto más generalizado, lo cual podría ser conveniente, debido a que muchos tejidos son afectados por el desbalance

metabólico presente en enfermedades como la DT2 y SM, existiendo la posibilidad de que puedan revertir dicho desbalance metabólico. Sin embargo, falta probar si esto ocurre en otros tejidos.

Respecto al estudio del efecto de las fracciones y subfracciones sobre la funcionalidad celular, las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/mL parecen ser, en la mayoría de los casos, inocuos, debido a que no disminuyeron por debajo del 95% la funcionalidad celular. Cabe señalar, sin embargo, que la concentración de 1000 mg/mL de la fracción F3 y subfracciones F3-1 y F3-2 si disminuyeron la funcionalidad celular muy por debajo del 95%. Por otro lado, las concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M de los compuestos no disminuyeron la funcionalidad celular por abajo del 95%; únicamente la concentración de 100  $\mu$ M disminuyó sustancialmente la funcionalidad por debajo de dicho porcentaje.

Los triterpenoides han estado asociados con varios efectos benéficos para la salud. Algunos estudios han mostrado efectos antiproliferativos promisorios *in vitro* y con efectos antitumorales en estudios *in vivo* [157, 158]. Además, han mostrado efecto hepatoprotector [159], propiedades antiinflamatorias a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos [160] y propiedades antibacteriales contra *Streptococcus mutans* y *Fusobacterium nucleatum* [161], entre otros efectos. Los resultados muestran nuevas propiedades antidiabéticas de  $\alpha$ -amirina y lupeol vía activación dual de PPAR $\delta/\gamma$ , sin descartar la posible activación de PPAR $\alpha$ , lo que convertiría a estos compuestos en pan agonistas (agonistas de las 3 isoformas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ), lo cual debe ser abordado en futuros estudios.

En relación con lupeol, se ha reportado que reduce los niveles de glucosa en sangre, hemoglobina glicada y óxido nítrico, además de aumentar los niveles de insulina en ratones diabéticos [162], lo cual confirma y complementa los efectos de este triterpeno. También se ha reportado que el lupeol posee propiedades antiinflamatorias en ratas hembra con artritis experimental [163]. Debido a que  $\alpha$ -amirina y lupeol son parecidos estructuralmente, es posible que compartan propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias. Dichas propiedades pueden estar asociadas con la activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$ , ya que estudios han demostrado que la activación de PPAR $\gamma$  inhibe a NF $\kappa$ B y consecuentemente la disminución de la síntesis de citocinas proinflamatorias [8]. Los resultados sugieren abordar de manera integral los efectos de  $\alpha$ -amirina y lupeol a través de investigaciones que incluyan la evaluación de sus efectos antiinflamatorios, involucrando la posible relación con los efectos sobre el metabolismo y elucidando sus mecanismos de acción.

En relación con los agonista dual de PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , tal como Muraglitazar, hoy se sabe que su uso representa un riesgo potencial para la salud, ya que aumenta de manera transitoria la células de papiloma y carcinoma de vejiga en ratas macho e induce la aparición de tumores en tejido adiposo de ratas [149]. Tesaglitazar, otro agonista dual de PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , produce hemangiosarcoma en hamster [164]. Por su parte, los agonistas duales de PPAR $\delta$ / $\gamma$  aún no se encuentran en el mercado, pero podrían ser más selectivos y causar menos efectos adversos. La pioglitazona es el medicamento más usual para las primeras etapas de DT2, usado como antihiper glucemiante vía PPAR $\gamma$ . Sin embargo, no es recomendado por largos periodos de tiempo debido a que sólo

modulan el metabolismo en una dirección, es decir, hacia la acumulación de tejido adiposo, y en la periferia de tejidos y órganos, lo que a su vez promueve la acumulación de grasa que deriva en aumento de peso, lo cual se ha asociado con osteoporosis [148]. Cabe subrayar que hasta el día de hoy no hay agonistas de PPAR $\delta$  en el mercado, aunque algunos se encuentran en fase experimental, como el GW501516, GW610742 y L-165041 [165].

Los compuestos propuestos de plantas medicinales como el vaticanol C, un tetrámero de resveratrol, posee efecto dual sobre PPAR $\alpha/\delta$  en células endoteliales de bovino [120]. La curcumina aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  en ratas [166], el ácido clorogénico incrementa la expresión de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en adipocitos 3T3-L1 [167], el geraniol y geranilgeraniol incrementan la expresión de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en hepatocitos Hep G2 y adipocitos 3T3-L1 [44], y  $\gamma$ -mangostina activa PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$  [119], entre otros. Sin embargo, todos estos compuestos de origen vegetal se encuentran en la misma situación que los sintéticos, es decir en fase experimental.

*H. sabdariffa* ha demostrado tener efectos benéficos para la salud, particularmente en desórdenes metabólicos, como DT2 y obesidad. En este trabajo reportamos nuevas propiedades antidiabéticas de *H. sabdariffa* a través de la activación dual de PPAR $\delta/\gamma$  y la consecuente expresión de sus genes río abajo FATP y GLUT4, además de sus proteínas correspondientes. Esto corrobora su efecto no únicamente a nivel de expresión génica, sino también a nivel de la proteína funcional. Un punto importante es que, además,  $\alpha$ -amirina y lupeol promueven la activación de AMPK $\alpha$ 1; cinasa

central en el metabolismo de lípidos y glucosa que actualmente se considera un blanco terapéutico para diversas afecciones, incluyendo diabetes y cáncer.

AMPK $\alpha$ 1 tiene efectos sobre el aumento en la activación de vías catabólicas y se ha mencionado que es fundamental para la homeostasis de la glucosa y lípidos y disminución de vías anabólicas. Esta cinasa se considera uno de los reguladores de la homeostasis energética [122, 143] que, en conjunto con los PPAR, juega un papel maestro en el metabolismo. El presente trabajo muestra que la activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  favorece la activación de AMPK $\alpha$ 1, sin descartar la posibilidad de que  $\alpha$ -amirina y lupeol puedan estar activando AMPK $\alpha$ 1 y a los PPAR en manera conjunta, sin descartar efectos sinérgicos entre estos. Un estudio menciona que la activación de AMPK $\alpha$ 1 puede ser de manera indirecta, a través de la activación de PPAR $\delta$  y/o PPAR $\gamma$ , ya que se ha asociado dicha activación con el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones, a través de la expresión de la proteína desacoplante (UCP), lo cual aumenta el ratio AMP/ATP [102].

Es importante realizar un estudio de docking molecular, aunado a la expresión de las proteínas de genes regulados por PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , sugiere que ocurre primero la activación de estos receptores antes que la vía AMPK $\alpha$ 1, quedando por explorar dicho supuesto a través de una cinética de expresión/activación, complementado por un docking molecular (sustrato-AMPK $\alpha$ ) y un ensayo de transactivación de PPAR.

Los resultados de la presente investigación van dirigidos al estudio de la acción agonista dual para PPAR $\delta$ / $\gamma$  y activación de AMPK $\alpha$ 1, de los compuestos aislados de

*H. sabdariffa*. Algunos de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la DT2 es la metformina, con efectos sobre la activación de AMPK $\alpha$ 1 [124].

Como agonistas duales de PPAR $\delta$ / $\gamma$  que promuevan la activación de AMPK $\alpha$ 1, la  $\alpha$ -amirina y el lupeol deben ser consideradas como moléculas atractivas con efectos multimodales, con efectos similares a la metformina y pioglitazona, lo cual evitaría la polifarmacia, la cual se ha vuelto cada vez más recurrente en pacientes con DT2.

Este trabajo sugiere la posibilidad de mejorar el tratamiento de la DT2 con el propósito de resolver el problema de una manera más general a través de la activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  que, en conjunción con AMPK $\alpha$ 1, podrían regular de manera más eficaz el metabolismo, revirtiendo la etiología de dicha enfermedad; es decir, el mantenimiento de la homeostasis energética, especialmente por la disminución de la acumulación de lípidos y la disminución de la glucemia, la cual se ha mostrado en este trabajo.

La disminución de la glucosa y lípidos puede no únicamente estar involucrando a la activación de la vía Akt2 y PPAR $\gamma$ , sino también a AMPK $\alpha$ 1 y PPAR $\delta$ , tal y como Takahashi y cols., mencionan, que la activación de AMPK $\alpha$ 1 disminuye la liberación de glucosa por parte del hígado [47]. Un mecanismo alternativo por el cual podría estar involucrada AMPK $\alpha$ 1 en la translocación de GLUT4, es el reportado por Canto y col., el cual muestra que esta cinasa regula a TBC1D1, una Rab GTPasa homóloga a AS160 (GTPasa que es activada vía Akt2), las cuales promueven la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática a través de la disociación del complejo TBD1D1-GLUT4 [127]. Otro mecanismo por el cual se puede activar AMPK $\alpha$ 1 es a partir de la activación de PPAR $\gamma$ , ya que su activación promueve la expresión de adiponectina, la

cual es una citocina propia del tejido adiposo que actúa vía receptor de adiponectina, la cual es un receptor membranal que río abajo promueve el aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el sustrato de la proteína cinasa CaMKK, la cual se activa mediante un evento de fosforilación AMPK $\alpha$ 1 en Thr172 (Figura 23) [168].

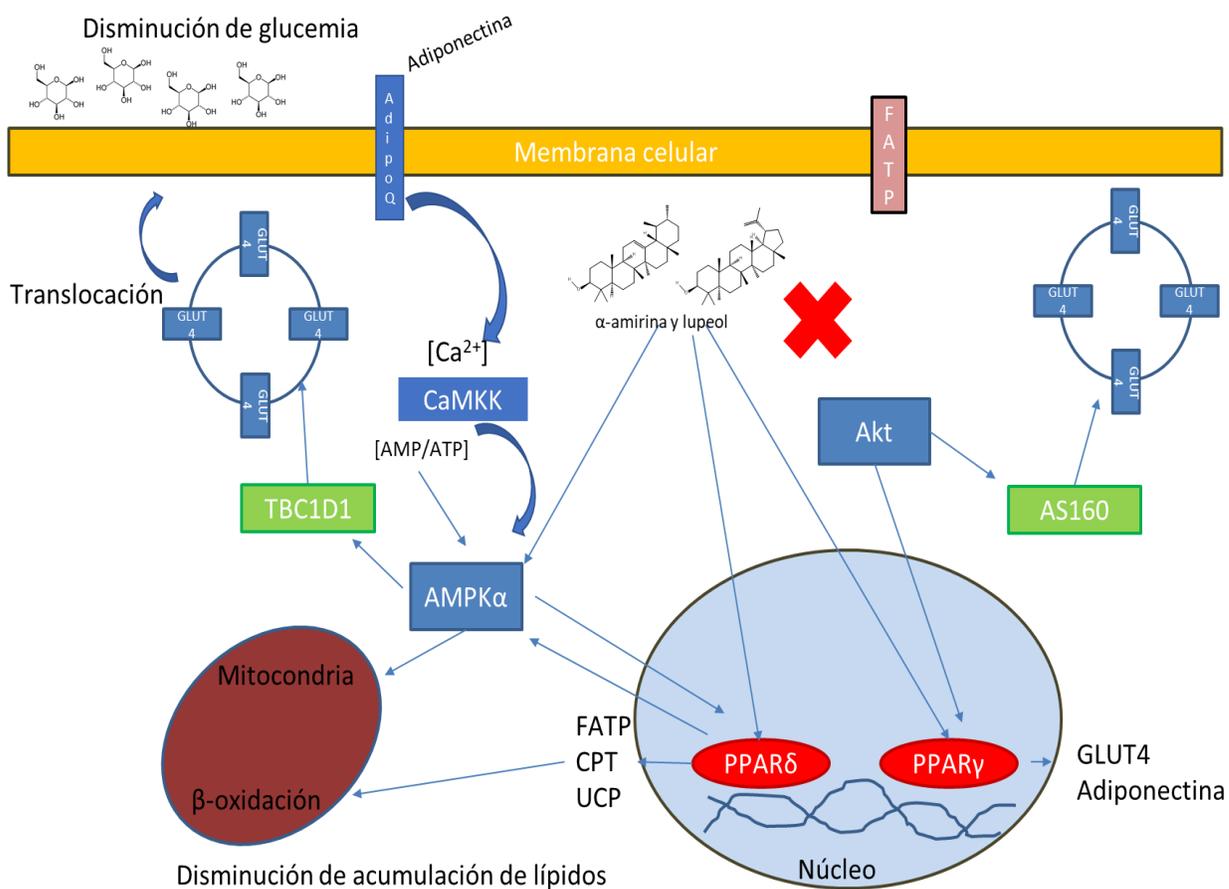
El estudio de la activación de AMPK $\alpha$ 1 por  $\alpha$ -amirina y el lupeol nos brinda información importante acerca del mecanismo de acción y de los efectos sinérgicos que tienen estos compuestos; no sólo promueven la expresión de genes de PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , FATP y GLUT4, sino que también aumentan las proteínas correspondientes a dichos genes, siendo  $\alpha$ -amirina la que tiene mayor efecto, respaldado en el ensayo de inmunodetección, con efectos sobre la proteína GLUT4 mayor a pioglitazona. Esto finalmente se asocia directamente con la disminución de la glucemia y la disminución de la acumulación de lípidos por este compuesto.

La vía más estudiada por la cual GLUT4 puede translocarse a la membrana plasmática, es vía Akt2, una vía que también favorece el proceso adipogénico, que a su vez se encuentra asociada con otros procesos metabólicos anabólicos, como la síntesis de glucógeno y lípidos, entre otros. Akt2 promueve vía AS160 la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática [169]. Se ha sugerido que el compuesto ácido 4-[(4-[(Z)-(2,4-dioxo-1,3-tiazolidin-5iliden)metil]fenoxi)-acetil]amino]fenoxiacético, activa PPAR $\gamma$  y la consecuente expresión de GLUT4, con efectos hipoglucemiantes en un modelo de ratas con diabetes experimental [170]. Sin embargo, en este trabajo se ha mostrado que  $\alpha$ -amirina y lupeol no influyen en la activación de Akt2, por lo cual la

translocación de GLUT4 aquí reportada probablemente sea a través de AMPK $\alpha$ 1 y no solamente vía PPAR $\gamma$ , descartando la vía AKt2.

En general,  $\alpha$ -amirina y lupeol pueden ayudar a corregir el desbalance metabólico característico en enfermedades como la DT2 y otras asociadas al síndrome metabólico. La  $\alpha$ -amirina y el lupeol pueden ser moléculas clave en el diseño de nuevos agonistas duales. Este estudio revela la posibilidad de una nueva alternativa de activación, sin interacción de los ligandos aquí propuestos con los residuos convencionales reportados en los agonistas sintéticos de PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ , tal y como se predijo en el análisis de docking molecular.

Es necesario conducir hacia futuras investigaciones el efecto de dichos triterpenos, con la finalidad de evaluarlos sobre las complicaciones y efectos adversos potenciales, como aquellos que ocurren con los agonistas simples y duales, tales como aumento de peso, osteoporosis, daño vascular, entre otros. Esto con el objetivo de desarrollar nuevos agonistas duales, más selectivos y sin efectos adversos.



**Figura 23.** Posible mecanismo de acción de  $\alpha$ -amirina y lupeol. La  $\alpha$ -amirina y el lupeol activan a PPAR $\delta$  y a PPAR $\gamma$ ; posteriormente translocan al núcleo en donde se unen a elementos de respuesta a PPAR, se transcriben genes FATP y GLUT4 y sus respectivas proteínas. La activación de PPAR y AMPK $\alpha$ 1 sugiere un efecto sinérgico, en donde AMPK $\alpha$ 1 y PPAR $\delta$  promueven la  $\beta$ -oxidación a nivel mitocondrial y la translocación de GLUT4 a través de TBC1D1, resultando en disminución de la acumulación de lípidos y la disminución de glucosa. Por otro lado, PPAR $\gamma$  promueve la expresión de GLUT4 e incorporación de lípidos. Los resultados muestran que Akt2 no participa en el mecanismo por el cual disminuye la glucosa.

## 11. Conclusiones

- *H. sabdariffa* exhibe propiedades antidiabéticas novedosas que implican la activación dual de PPAR $\delta$ / $\gamma$  debido a su contenido de  $\alpha$ -amirina y lupeol.
- Estos compuestos activan también a AMPK $\alpha$ 1, ofreciendo la posibilidad de modular de manera más eficiente el desbalance metabólico de la DT2 y otras enfermedades metabólicas.
- Se corroboró que los ácidos grasos linoleico y oleico son agonistas duales de PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  moderados, en comparación con los convencionales (L-165041 y pioglitazona).
- Los triterpenos  $\alpha$ -amirina y lupeol deben ser considerados como moléculas prototipo para desarrollar nuevos fármacos en el tratamiento de la DT2 y otras enfermedades asociadas al SM, con efectos multimodales.
- Son necesarios más estudios para sustentar el efecto dual de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre PPAR $\delta$ / $\gamma$ . Los estudios futuros deben enfocarse en la evaluación de la transactivación de PPAR, así como en otros elementos de respuesta, con relevancia en el funcionamiento celular.
- En este contexto, el desarrollo de compuestos que poseen actividad dual y multimodal, tal y como lo han mostrado  $\alpha$ -amirina y lupeol, podrían disminuir la polifarmacia, lo cual ofrece ventajas en comparación con otros fármacos actuales usados en el tratamiento de la DT2 y otras enfermedades asociadas al SM.

## 12. Perspectivas

- Realizar estudios para sustentar el efecto dual de  $\alpha$ -amirina y lupeol sobre PPAR $\delta/\gamma$  mediante técnicas complementarias como TR-FRET y EMSA.
- Evaluar el efecto de estos compuestos sobre la expresión de PPAR $\alpha$ , una forma predominantemente expresada en hígado, la cual también es considerada un blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades metabólicas, como el hígado graso, hipertrigliceridemia e hipercolesteronemia, asociada con problemas cardiovasculares, y la posibilidad de que  $\alpha$ -amirina y lupeol actúen como pan-agonistas de PPAR.
- Evaluar dichos compuestos sobre TBC1D1 para complementar el mecanismo de activación asociado a la translocación GLUT4.
- Realizar un docking molecular de dichos compuestos con AMPK $\alpha$ 1 para determinar si interactúan con esta cinasa.
- Evaluar los triterpenos en un modelo *in vivo* de diabetes experimental y/o SM.

### 13. Bibliografía

1. Guariguata L: **Contribute data to the 6th edition of the IDF Diabetes Atlas.** *Diabetes Res Clin Pract* 2013, **100**(2):280-281.
2. Ahmad R: **Diabetes and renal disease: who does what?** *Clin Med (Lond)* 2014, **14**(1):93.
3. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A: **Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms.** *J Cell Physiol* 2019, **234**(6):8152-8161.
4. Ainuddin JA, Kazi S, Aftab S, Kamran A: **Metformin for preventing gestational diabetes in women with polycystic ovarian syndrome.** *J Coll Physicians Surg Pak* 2015, **25**(4):237-241.
5. Correa PJ, Vargas JF, Sen S, Illanes SE: **Prediction of gestational diabetes early in pregnancy: targeting the long-term complications.** *Gynecol Obstet Invest* 2014, **77**(3):145-149.
6. Flores-Padilla L, Solorio-Paez IC, Melo-Rey ML, Trejo-Franco J: **[Pregnancy and obesity: risk of developing gestational diabetes in the northern border area of Mexico].** *Gac Med Mex* 2014, **150** Suppl 1:73-78.
7. Janani C, Ranjitha Kumari BD: **PPAR gamma gene--a review.** *Diabetes Metab Syndr* 2015, **9**(1):46-50.
8. Gross B, Staels B: **PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007, **21**(4):687-710.
9. IDF: **DIABETES ATLAS Ninth edition 2019.** 2019.
10. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B: **IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.** *Diabetes Res Clin Pract* 2018, **138**:271-281.
11. Boden G: **Obesity, insulin resistance and free fatty acids.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011, **18**(2):139-143.
12. Guo S: **Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms.** *J Endocrinol* 2014, **220**(2):T1-T23.
13. Karczewski J, Sledzinska E, Baturó A, Jonczyk I, Maleszko A, Maleszko A, Samborski P, Begier-Krasinska B, Dobrowolska A: **Obesity and inflammation.** *Eur Cytokine Netw* 2018, **29**(3):83-94.
14. Bastarrachea RA, Lopez-Alvarenga JC, Bolado-Garcia VE, Tellez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG: **[Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance].** *Gac Med Mex* 2007, **143**(6):505-512.
15. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PI, Jr.: **Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes.** *Biochem J* 2016, **473**(24):4527-4550.
16. Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E: **Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1842**(9):1693-1706.

17. Arner P, Ryden M: **Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance**. *Obes Facts* 2015, **8**(2):147-155.
18. Margarita Díaz-Flores LAB-G, Miguel Ángel Ibáñez-Hernández, Dalila Pascoe-Lira, Alberto M. Guzmán-Greenfel, Jesús Kumate-Rodríguez: **Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica**. *Medigraphic* 2004, **140**(4).
19. Chang JH, Tseng CF, Wang JY: **Hypoglycemia-induced myocardial infarction: an unusual adverse effect of sulfonylureas**. *Int J Cardiol* 2007, **115**(3):414-416.
20. Apovian CM: **Management of diabetes across the course of disease: minimizing obesity-associated complications**. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2011, **4**:353-369.
21. Bano G: **Glucose homeostasis, obesity and diabetes**. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2013, **27**(5):715-726.
22. Krentz AJ, Bailey CJ: **Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus**. *Drugs* 2005, **65**(3):385-411.
23. Capuano A, Sportiello L, Maiorino MI, Rossi F, Giugliano D, Esposito K: **Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy--focus on alogliptin**. *Drug Des Devel Ther* 2013, **7**:989-1001.
24. Gallwitz B: **Emerging DPP-4 inhibitors: focus on linagliptin for type 2 diabetes**. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013, **6**:1-9.
25. Benz V, Kintscher U, Foryst-Ludwig A: **Sex-specific differences in Type 2 Diabetes Mellitus and dyslipidemia therapy: PPAR agonists**. *Handb Exp Pharmacol* 2012(214):387-410.
26. Kelly DP: **The pleiotropic nature of the vascular PPAR gene regulatory pathway**. *Circ Res* 2001, **89**(11):935-937.
27. DeFronzo RA, Mehta RJ, Schnure JJ: **Pleiotropic effects of thiazolidinediones: implications for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus**. *Hosp Pract (1995)* 2013, **41**(2):132-147.
28. Schilling T, Noth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, Schutze N: **Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells**. *Mol Cell Endocrinol* 2007, **271**(1-2):1-17.
29. Zhang Y, Yu L, Cai W, Fan S, Feng L, Ji G, Huang C: **Protopanaxatriol, a novel PPARgamma antagonist from Panax ginseng, alleviates steatosis in mice**. *Sci Rep* 2014, **4**:7375.
30. Reilly SM, Lee CH: **PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease**. *FEBS Lett* 2008, **582**(1):26-31.
31. Chiarelli F, Di Marzio D: **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives**. *Vasc Health Risk Manag* 2008, **4**(2):297-304.
32. Gilardi F, Giudici M, Mitro N, Maschi O, Guerrini U, Rando G, Maggi A, Cermenati G, Laghezza A, Liodice F et al: **LT175 is a novel PPARalpha/gamma ligand with potent insulin-sensitizing effects and reduced adipogenic properties**. *J Biol Chem* 2014, **289**(10):6908-6920.

33. Toyoda T, Kamei Y, Kato H, Sugita S, Takeya M, Suganami T, Ogawa Y: **Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue.** *Obesity (Silver Spring)* 2008, **16**(6):1199-1207.
34. Burns KA, Vanden Heuvel JP: **Modulation of PPAR activity via phosphorylation.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1771**(8):952-960.
35. Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, Perrin A, Carlavan I, Voegel JJ, Vignon F, Nicolas JC, Balaguer P: **Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands.** *Anal Biochem* 2005, **344**(1):8-15.
36. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: **International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention.** *Diabet Med* 2007, **24**(5):451-463.
37. Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M: **PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box?** *Pharmacol Res* 2007, **56**(2):91-98.
38. Bulchandani D, Nachnani JS, Herndon B, Molteni A, Pathan MH, Quinn T, Hamdan HA, Alba LM, Graves L: **Effect of exendin (exenatide)--GLP 1 receptor agonist on the thyroid and parathyroid gland in a rat model.** *Eur J Pharmacol* 2012, **691**(1-3):292-296.
39. Duval C, Fruchart JC, Staels B: **PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation.** *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004, **97**(6):665-672.
40. Barish GD, Narkar VA, Evans RM: **PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome.** *J Clin Invest* 2006, **116**(3):590-597.
41. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB: **Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic beta-cell function.** *Nutr Metab (Lond)* 2005, **2**(1):1.
42. Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA: **Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1740**(2):313-317.
43. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT: **PPARs: therapeutic targets for metabolic disease.** *Trends Pharmacol Sci* 2005, **26**(5):244-251.
44. Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K *et al*: **Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes.** *FEBS Lett* 2002, **514**(2-3):315-322.
45. Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Hu R, Sugiyama E, Kamijo Y, Tanaka N, Hara A *et al*: **Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions.** *Genes Cells* 2010, **15**(2):91-100.
46. Barger PM, Kelly DP: **PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism.** *Trends Cardiovasc Med* 2000, **10**(6):238-245.
47. Takahashi S, Tanaka T, Sakai J: **New therapeutic target for metabolic syndrome: PPARdelta.** *Endocr J* 2007, **54**(3):347-357.
48. Seedorf U, Aberle J: **Emerging roles of PPARdelta in metabolism.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1771**(9):1125-1131.

49. Cho HW, Shin S, Park JW, Choi JY, Kim NY, Lee WK, Lee HK, Song KD, Cho BW: **Molecular Characterization and Expression Analysis of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPARdelta) Gene before and after Exercise in Horse.** *Asian-Australas J Anim Sci* 2015, **28**(5):697-702.
50. Jung TW, Hwang HJ, Hong HC, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM: **BAIBA attenuates insulin resistance and inflammation induced by palmitate or a high fat diet via an AMPK-PPARdelta-dependent pathway in mice.** *Diabetologia* 2015, **58**(9):2096-2105.
51. Ding Y, Yang KD, Yang Q: **The role of PPARdelta signaling in the cardiovascular system.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014, **121**:451-473.
52. Banga A, Unal R, Tripathi P, Pokrovskaya I, Owens RJ, Kern PA, Ranganathan G: **Adiponectin translation is increased by the PPARgamma agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **296**(3):E480-489.
53. Mitra S, Sangle G, Tandon R, Sharma S, Roy S, Khanna V, Gupta A, Sattigeri J, Sharma L, Priyadarsiny P *et al*: **Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPARalpha/gamma agonist, in db/db mice: adipogenesis/or oedema?** *Br J Pharmacol* 2007, **150**(4):480-487.
54. Glinghammar B, Berg AL, Bjurstrom S, Stockling K, Blomgren B, Westerberg R, Skanberg I, Hellmold H, Andersson U: **Proliferative and molecular effects of the dual PPARalpha/gamma agonist tesaglitazar in rat adipose tissues: relevance for induction of fibrosarcoma.** *Toxicol Pathol* 2011, **39**(2):325-336.
55. Hidalgo-Figueroa S, Ramirez-Espinosa JJ, Estrada-Soto S, Almanza-Perez JC, Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar FJ, Hernandez-Rosado JV, Moreno-Diaz H, Diaz-Coutino D, Navarrete-Vazquez G: **Discovery of thiazolidine-2,4-dione/biphenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR alpha/gamma modulator with antidiabetic effect: in vitro, in silico and in vivo approaches.** *Chem Biol Drug Des* 2013, **81**(4):474-483.
56. Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E: **Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism.** *Diabetes Care* 2011, **34**(9):2008-2014.
57. Xu C, Wang LL, Liu HY, Zhou XB, Cao YL, Li S: **C333H, a novel PPARalpha/gamma dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism.** *Acta Pharmacol Sin* 2006, **27**(2):223-228.
58. Bronson J, Black A, Dhar M, Ellsworth B, Robert Merritt J: **To Market, To Market—2013.** In.; 2014: 437-508.
59. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori CR, Mitro N, Ruscica M: **PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role?** *Int J Mol Sci* 2018, **19**(4).
60. Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P: **Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation.** *Eur J Pharmacol* 2005, **517**(3):174-181.

61. Phillipson JD: **Phytochemistry and medicinal plants.** *Phytochemistry* 2001, **56**(3):237-243.
62. Kim T, Lee W, Jeong KH, Song JH, Park SH, Choi P, Kim SN, Lee S, Ham J: **Total synthesis and dual PPARalpha/gamma agonist effects of amorphastilbol and its synthetic derivatives.** *Bioorg Med Chem Lett* 2012, **22**(12):4122-4126.
63. Yang MH, Avula B, Smillie T, Khan IA, Khan SI: **Screening of medicinal plants for PPARalpha and PPARgamma activation and evaluation of their effects on glucose uptake and 3T3-L1 adipogenesis.** *Planta Med* 2013, **79**(12):1084-1095.
64. Irons BK, Minze MG: **Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated.** *Diabetes Metab Syndr Obes* 2014, **7**:15-24.
65. Chen W, Fan S, Xie X, Xue N, Jin X, Wang L: **Novel PPAR pan agonist, ZBH ameliorates hyperlipidemia and insulin resistance in high fat diet induced hyperlipidemic hamster.** *PLoS One* 2014, **9**(4):e96056.
66. An HJ, Lee B, Kim SM, Kim DH, Chung KW, Ha SG, Park KC, Park YJ, Kim SJ, Yun HY *et al*: **A PPAR Pan Agonist, MHY2013 Alleviates Age-Related Hepatic Lipid Accumulation by Promoting Fatty Acid Oxidation and Suppressing Inflammation.** *Biol Pharm Bull* 2018, **41**(1):29-35.
67. Hajer GR, van Haften TW, Visseren FL: **Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases.** *Eur Heart J* 2008, **29**(24):2959-2971.
68. Ceddia RB: **The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism.** *Mol Cell Endocrinol* 2013, **366**(2):194-203.
69. Ghoshal K, Bhattacharyya M: **Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity.** *World J Diabetes* 2015, **6**(1):151-166.
70. Palomer X, Perez A, Blanco-Vaca F: **[Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease].** *Med Clin (Barc)* 2005, **124**(10):388-395.
71. Hadrich F, Garcia M, Maalej A, Moldes M, Isoda H, Fève B, Sayadi S: **Oleuropein activated AMPK and induced insulin sensitivity in C2C12 muscle cells.** *Life Sci* 2016, **151**:167-173.
72. Benetti E, Mastrocola R, Rogazzo M, Chiazza F, Aragno M, Fantozzi R, Collino M, Minetto MA: **High sugar intake and development of skeletal muscle insulin resistance and inflammation in mice: a protective role for PPAR-delta agonism.** *Mediators Inflamm* 2013, **2013**:509502.
73. Verma NK, Singh J, Dey CS: **PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells.** *Br J Pharmacol* 2004, **143**(8):1006-1013.
74. Rozema E, Atanasov AG, Fakhrudin N, Singhuber J, Namduang U, Heiss EH, Reznicek G, Huck CW, Bonn GK, Dirsch VM *et al*: **Selected Extracts of Chinese Herbal Medicines: Their Effect on NF-kappaB, PPARalpha and PPARgamma and the Respective Bioactive Compounds.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, **2012**:983023.

75. Shin SS, Jung YS, Yoon KH, Choi S, Hong Y, Park D, Lee H, Seo BI, Lee HY, Yoon M: **The Korean traditional medicine gyeongshingangjeehwan inhibits adipocyte hypertrophy and visceral adipose tissue accumulation by activating PPARalpha actions in rat white adipose tissues.** *J Ethnopharmacol* 2010, **127**(1):47-54.
76. Jung CH, Jang SJ, Ahn J, Gwon SY, Jeon TI, Kim TW, Ha TY: **Alpinia officinarum inhibits adipocyte differentiation and high-fat diet-induced obesity in mice through regulation of adipogenesis and lipogenesis.** *J Med Food* 2012, **15**(11):959-967.
77. Kim JK, So H, Youn MJ, Kim HJ, Kim Y, Park C, Kim SJ, Ha YA, Chai KY, Kim SM *et al*: **Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway.** *J Ethnopharmacol* 2007, **114**(2):260-267.
78. Yoke Yin C, So Ha T, Abdul Kadir K: **Effects of Glycyrrhizic Acid on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma), Lipoprotein Lipase (LPL), Serum Lipid and HOMA-IR in Rats.** *PPAR Res* 2010, **2010**:530265.
79. Choi HK, Won EK, Jang YP, Choung SY: **Antiobesity Effect of Codonopsis lanceolata in High-Calorie/High-Fat-Diet-Induced Obese Rats.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, **2013**:210297.
80. Jadeja RN, Thounaojam MC, Ramani UV, Devkar RV, Ramachandran AV: **Anti-obesity potential of Clerodendron glandulosum.Coleb leaf aqueous extract.** *J Ethnopharmacol* 2011, **135**(2):338-343.
81. Oben JE, Ngondi JL, Blum K: **Inhibition of Irvingia gabonensis seed extract (OB131) on adipogenesis as mediated via down regulation of the PPARgamma and leptin genes and up-regulation of the adiponectin gene.** *Lipids Health Dis* 2008, **7**:44.
82. Jung HA, Jung HJ, Jeong HY, Kwon HJ, Kim MS, Choi JS: **Anti-adipogenic activity of the edible brown alga Ecklonia stolonifera and its constituent fucosterol in 3T3-L1 adipocytes.** *Arch Pharm Res* 2014, **37**(6):713-720.
83. Lee J, Kim D, Choi J, Choi H, Ryu JH, Jeong J, Park EJ, Kim SH, Kim S: **Dehydrodiconiferyl alcohol isolated from Cucurbita moschata shows anti-adipogenic and anti-lipogenic effects in 3T3-L1 cells and primary mouse embryonic fibroblasts.** *J Biol Chem* 2012, **287**(12):8839-8851.
84. Watanabe T, Hata K, Hiwatashi K, Hori K, Suzuki N, Itoh H: **Suppression of murine preadipocyte differentiation and reduction of visceral fat accumulation by a Petasites japonicus ethanol extract in mice fed a high-fat diet.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2010, **74**(3):499-503.
85. Son Y, Nam JS, Jang MK, Jung IA, Cho SI, Jung MH: **Antiobesity activity of Vigna nakashimae extract in high-fat diet-induced obesity.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2013, **77**(2):332-338.
86. Yamasaki M, Ogawa T, Wang L, Katsube T, Yamasaki Y, Sun X, Shiwaku K: **Anti-obesity effects of hot water extract from Wasabi (Wasabia japonica Matsum.) leaves in mice fed high-fat diets.** *Nutr Res Pract* 2013, **7**(4):267-272.

87. Gwon SY, Ahn JY, Kim TW, Ha TY: **Zanthoxylum piperitum DC ethanol extract suppresses fat accumulation in adipocytes and high fat diet-induced obese mice by regulating adipogenesis.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2012, **58**(6):393-401.
88. Kwak DH, Lee JH, Kim T, Ahn HS, Cho WK, Ha H, Hwang YH, Ma JY: **Aristolochia manshuriensis Kom inhibits adipocyte differentiation by regulation of ERK1/2 and Akt pathway.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e49530.
89. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y: **Anti-obesity effect of Nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats.** *J Ethnopharmacol* 2006, **106**(2):238-244.
90. You JS, Lee YJ, Kim KS, Kim SH, Chang KJ: **Anti-obesity and hypolipidaemic effects of Nelumbo nucifera seed ethanol extract in human pre-adipocytes and rats fed a high-fat diet.** *J Sci Food Agric* 2014, **94**(3):568-575.
91. Shimada T, Nagai E, Harasawa Y, Watanabe M, Negishi K, Akase T, Sai Y, Miyamoto K, Aburada M: **Salacia reticulata inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes.** *J Ethnopharmacol* 2011, **136**(1):67-74.
92. Jia Y, Kim JY, Jun HJ, Kim SJ, Lee JH, Hoang MH, Kim HS, Chang HI, Hwang KY, Um SJ *et al.*: **Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1831**(4):698-708.
93. Hsu WH, Chen TH, Lee BH, Hsu YW, Pan TM: **Monascin and ankaflavin act as natural AMPK activators with PPARalpha agonist activity to down-regulate nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed C57BL/6 mice.** *Food Chem Toxicol* 2014, **64**:94-103.
94. Wu C, Jia Y, Lee JH, Jun HJ, Lee HS, Hwang KY, Lee SJ: **trans-Caryophyllene is a natural agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha.** *Bioorg Med Chem Lett* 2014, **24**(14):3168-3174.
95. Campbell SE, Stone WL, Whaley SG, Qui M, Krishnan K: **Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines.** *BMC Cancer* 2003, **3**:25.
96. Itoh T, Yamamoto K: **Peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized docosahexaenoic acids as new class of ligand.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008, **377**(4-6):541-547.
97. Atanasov AG, Wang JN, Gu SP, Bu J, Kramer MP, Baumgartner L, Fakhrudin N, Ladurner A, Malainer C, Vuorinen A *et al.*: **Honokiol: a non-adipogenic PPARgamma agonist from nature.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1830**(10):4813-4819.
98. Pferschy-Wenzig EM, Atanasov AG, Malainer C, Noha SM, Kunert O, Schuster D, Heiss EH, Oberlies NH, Wagner H, Bauer R *et al.*: **Identification of isosilybin a from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J Nat Prod* 2014, **77**(4):842-847.
99. Salam NK, Huang TH, Kota BP, Kim MS, Li Y, Hibbs DE: **Novel PPAR-gamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening,**

- induced-fit docking and biological assay study.** *Chem Biol Drug Des* 2008, **71**(1):57-70.
100. Liu Q, Yang QM, Hu HJ, Yang L, Yang YB, Chou GX, Wang ZT: **Bioactive diterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Scoparia dulcis*.** *J Nat Prod* 2014, **77**(7):1594-1600.
  101. Kwak HJ, Choi HE, Jang J, Park SK, Cho BH, Kim SK, Lee S, Kang NS, Cheon HG: **Suppression of Adipocyte Differentiation by Foenumoside B from *Lysimachia foenum-graecum* Is Mediated by PPARgamma Antagonism.** *PLoS One* 2016, **11**(5):e0155432.
  102. Chen Z, Zhang L, Yi J, Yang Z, Zhang Z, Li Z: **Promotion of adiponectin multimerization by emodin: a novel AMPK activator with PPARgamma-agonist activity.** *J Cell Biochem* 2012, **113**(11):3547-3558.
  103. Xu ME, Xiao SZ, Sun YH, Ou-yang Y, Guan C, Zheng XX: **A preadipocyte differentiation assay as a method for screening potential anti-type II diabetes drugs from herbal extracts.** *Planta Med* 2006, **72**(1):14-19.
  104. Ohtera A, Miyamae Y, Nakai N, Kawachi A, Kawada K, Han J, Isoda H, Neffati M, Akita T, Maejima K *et al*: **Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **440**(2):204-209.
  105. Xiao J, Wang NL, Sun B, Cai GP: **Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiocsin on adipogenesis in 3T3-L1 cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, **299**(1):C128-138.
  106. Klein G, Kim J, Himmeldirk K, Cao Y, Chen X: **Antidiabetes and Anti-obesity Activity of *Lagerstroemia speciosa*.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2007, **4**(4):401-407.
  107. Kim H, Sakamoto K: **(-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation through the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways.** *Cell Biol Int* 2012, **36**(2):147-153.
  108. Gao Y, Yang MF, Su YP, Jiang HM, You XJ, Yang YJ, Zhang HL: **Ginsenoside Re reduces insulin resistance through activation of PPAR-gamma pathway and inhibition of TNF-alpha production.** *J Ethnopharmacol* 2013, **147**(2):509-516.
  109. Quan HY, Baek NI, Chung SH: **Licochalcone A prevents adipocyte differentiation and lipogenesis via suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sterol regulatory element-binding protein pathways.** *J Agric Food Chem* 2012, **60**(20):5112-5120.
  110. Karsenty J, Landrier JF, Rousseau-Ralliard D, Robbez-Masson V, Margotat A, Deprez P, Lechene P, Grynberg A, Lairon D, Planells R *et al*: **Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha.** *Eur J Nutr* 2013, **52**(8):1865-1874.
  111. Christensen KB, Minet A, Svenstrup H, Grevsen K, Zhang H, Schrader E, Rimbach G, Wein S, Wolffram S, Kristiansen K *et al*: **Identification of plant extracts with potential antidiabetic properties: effect on human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), adipocyte**

- differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. *Phytother Res* 2009, **23**(9):1316-1325.
112. Li Y, Qi Y, Huang TH, Yamahara J, Roufogalis BD: **Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR-alpha/gamma activator properties.** *Diabetes Obes Metab* 2008, **10**(1):10-17.
  113. Kim SN, Choi HY, Lee W, Park GM, Shin WS, Kim YK: **Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from Sargassum yezoense stimulate adipocyte differentiation through PPARalpha/gamma activation in 3T3-L1 cells.** *FEBS Lett* 2008, **582**(23-24):3465-3472.
  114. Alibin CP, Kopilas MA, Anderson HD: **Suppression of cardiac myocyte hypertrophy by conjugated linoleic acid: role of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.** *J Biol Chem* 2008, **283**(16):10707-10715.
  115. Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY: **Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from Citrus aurantium up-regulate transcription of adiponectin.** *Phytother Res* 2008, **22**(10):1400-1403.
  116. Quang TH, Ngan NT, Minh CV, Kiem PV, Tai BH, Thao NP, Song SB, Kim YH: **Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of Asarum sieboldii.** *Bioorg Med Chem Lett* 2012, **22**(7):2527-2533.
  117. Li JE, Futawaka K, Yamamoto H, Kasahara M, Tagami T, Liu TH, Moriyama K: **Cinnamaldehyde Contributes to Insulin Sensitivity by Activating PPARdelta, PPARgamma, and RXR.** *Am J Chin Med* 2015, **43**(5):879-892.
  118. Suh HN, Huong HT, Song CH, Lee JH, Han HJ: **Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca<sup>2+</sup>/PLC, cPLA<sub>2</sub>, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **295**(6):C1518-1527.
  119. Matsuura N, Gamo K, Miyachi H, Iinuma M, Kawada T, Takahashi N, Akao Y, Tosa H: **gamma-Mangostin from Garcinia mangostana pericarps as a dual agonist that activates Both PPARalpha and PPARdelta.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2013, **77**(12):2430-2435.
  120. Tsukamoto T, Nakata R, Tamura E, Kosuge Y, Kariya A, Katsukawa M, Mishima S, Ito T, Iinuma M, Akao Y *et al*: **Vaticanol C, a resveratrol tetramer, activates PPARalpha and PPARbeta/delta in vitro and in vivo.** *Nutr Metab (Lond)* 2010, **7**:46.
  121. Malek MA, Hoang MH, Jia Y, Lee JH, Jun HJ, Lee DH, Lee HJ, Lee C, Lee MK, Hwang BY *et al*: **Ombuin-3-O-beta-D-glucopyranoside from Gynostemma pentaphyllum is a dual agonistic ligand of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta/beta.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **430**(4):1322-1328.
  122. Zhang BB, Zhou G, Li C: **AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome.** *Cell Metab* 2009, **9**(5):407-416.
  123. Steinberg GR, Kemp BE: **AMPK in Health and Disease.** *Physiol Rev* 2009, **89**(3):1025-1078.

124. Erika Gutierrez-Lara CM-C, Edgar Rosales-Ortega,, Juan José Ramírez-Espinosa JCR-L, David Centurión, Karla Carvajal,, Daniel Ortega-Cuellar SE-S, and Gabriel Navarrete-Vázquez: **Synthesis and In Vitro AMPK Activation of Cycloalkyl/Alkarylbiguanides with Robust In Vivo Antihyperglycemic Action.** *Journal of Chemistry* 2017, **2017**.
125. Lee WH, Kim SG: **AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists.** *PPAR Res* 2010, **2010**.
126. Tu Z, Moss-Pierce T, Ford P, Jiang TA: **Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract regulates glucose and lipid metabolism by activating AMPK and PPAR pathways in HepG2 cells.** *J Agric Food Chem* 2013, **61**(11):2803-2810.
127. Canto C, Auwerx J: **AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways.** *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**(20):3407-3423.
128. Kou G, Li Z, Wu C, Liu Y, Hu Y, Guo L, Xu X, Zhou Z: **Citrus tangeretin improves skeletal muscle mitochondrial biogenesis via activating the AMPK-PGC1-alpha pathway in vitro and in vivo: a possible mechanism for its beneficial effect on physical performance.** *J Agric Food Chem* 2018.
129. Chen J, Wong HS, Leong PK, Leung HY, Chan WM, Ko KM: **Ursolic acid induces mitochondrial biogenesis through the activation of AMPK and PGC-1 in C2C12 myotubes: a possible mechanism underlying its beneficial effect on exercise endurance.** *Food Funct* 2017, **8**(7):2425-2436.
130. Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, Kim MS, Kim SW, Lee KU, Park JY: **Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **332**(3):885-891.
131. Hers I, Vincent EE, Tavares JM: **Akt signalling in health and disease.** *Cell Signal* 2011, **23**(10):1515-1527.
132. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O: **PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis.** *Expert Rev Mol Med* 2012, **14**:e1.
133. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ: **Role of Akt/protein kinase B in metabolism.** *Trends Endocrinol Metab* 2002, **13**(10):444-451.
134. Balakrishnan BB, Krishnasamy K, Choi KC: **Moringa concanensis Nimmo ameliorates hyperglycemia in 3T3-L1 adipocytes by upregulating PPAR-gamma, C/EBP-alpha via Akt signaling pathway and STZ-induced diabetic rats.** *Biomed Pharmacother* 2018, **103**:719-728.
135. Riaz G, Chopra R: **A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L.** *Biomed Pharmacother* 2018, **102**:575-586.
136. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M: **Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review.** *Food Chem* 2014, **165**:424-443.
137. Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, Almanza-Perez JC, Romero-Nunez E, Campos-Sepulveda EA, Vazquez-Carrillo LI, Roman-Ramos R: **Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice.** *J Ethnopharmacol* 2007, **114**(1):66-71.

138. Mohamed J, Shing SW, Idris MH, Budin SB, Zainalabidin S: **The protective effect of aqueous extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. UKMR-2) against red blood cell membrane oxidative stress in rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Clinics* 2013, **68**(10):1358-1363.
139. Hopkins AL, Lamm MG, Funk JL, Ritenbaugh C: ***Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies.** *Fitoterapia* 2013, **85**:84-94.
140. Sabzghabae AM, Ataei E, Kelishadi R, Ghannadi A, Soltani R, Badri S, Shirani S: **Effect of *Hibiscus sabdariffa* Calices on Dyslipidemia in Obese Adolescents: A Triple-masked Randomized Controlled Trial.** *Mater Sociomed* 2013, **25**(2):76-79.
141. Gooda Sahib N, Saari N, Ismail A, Khatib A, Mahomoodally F, Abdul Hamid A: **Plants' metabolites as potential antiobesity agents.** *ScientificWorldJournal* 2012, **2012**:436039.
142. Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, Koda T, Horio F, Takahashi N, Kawada T, Osawa T: **Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **316**(1):149-157.
143. Carling D: **AMPK signalling in health and disease.** *Curr Opin Cell Biol* 2017, **45**:31-37.
144. Montes-Belmont: **Chemical diversity in plants against phytopathogenic fungi.** *Revista Mexicana de Micología* 2009, **29**  
7, 3-8
145. Bailey CJ: **Potential new treatments for type 2 diabetes.** *Trends Pharmacol Sci* 2000, **21**(7):259-265.
146. Flores AM, Li L, McHugh NG, Aneskievich BJ: **Enzyme association with PPARgamma: evidence of a new role for 15-lipoxygenase type 2.** *Chem Biol Interact* 2005, **151**(2):121-132.
147. Skochko OV, Kaidashev IP: **Effect of pioglitazone on insulin resistance, progression of atherosclerosis and clinical course of coronary heart disease.** *Wiad Lek* 2017, **70**(5):881-890.
148. Pillai HK, Fang M, Beglov D, Kozakov D, Vajda S, Stapleton HM, Webster TF, Schlezinger JJ: **Ligand binding and activation of PPARgamma by Firemaster(R) 550: effects on adipogenesis and osteogenesis in vitro.** *Environ Health Perspect* 2014, **122**(11):1225-1232.
149. Tannehill-Gregg SH, Sanderson TP, Minnema D, Voelker R, Ulland B, Cohen SM, Arnold LL, Schilling BE, Waites CR, Dominick MA: **Rodent carcinogenicity profile of the antidiabetic dual PPAR alpha and gamma agonist muraglitazar.** *Toxicol Sci* 2007, **98**(1):258-270.
150. Patel H, Giri P, Patel P, Singh S, Gupta L, Patel U, Modi N, Shah K, Jain MR, Srinivas NR *et al*: **Preclinical evaluation of saroglitazar magnesium, a dual PPAR-alpha/gamma agonist for treatment of dyslipidemia and metabolic disorders.** *Xenobiotica* 2018, **48**(12):1268-1277.

151. Ali BH, Al Wabel N, Blunden G: **Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review.** *Phytother Res* 2005, **19**(5):369-375.
152. Yamada P, Nemoto M, Shigemori H, Yokota S, Isoda H: **Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from Lycium chinense and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells.** *Planta Med* 2011, **77**(5):434-440.
153. Connors RV, Wang Z, Harrison M, Zhang A, Wanska M, Hiscock S, Fox B, Dore M, Labelle M, Sudom A *et al*: **Identification of a PPARdelta agonist with partial agonistic activity on PPARgamma.** *Bioorg Med Chem Lett* 2009, **19**(13):3550-3554.
154. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: **Understanding adipocyte differentiation.** *Physiol Rev* 1998, **78**(3):783-809.
155. Wu HT, Chen W, Cheng KC, Ku PM, Yeh CH, Cheng JT: **Oleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor delta to compensate insulin resistance in steatotic cells.** *J Nutr Biochem* 2012, **23**(10):1264-1270.
156. Warensjo E, Riserus U, Gustafsson IB, Mohsen R, Cederholm T, Vessby B: **Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008, **18**(10):683-690.
157. Liby KT, Yore MM, Sporn MB: **Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(5):357-369.
158. Petronelli A, Pannitteri G, Testa U: **Triterpenoids as new promising anticancer drugs.** *Anticancer Drugs* 2009, **20**(10):880-892.
159. Xu GB, Xiao YH, Zhang QY, Zhou M, Liao SG: **Hepatoprotective natural triterpenoids.** *Eur J Med Chem* 2018, **145**:691-716.
160. Feng J, Yi X, Huang W, Wang Y, He X: **Novel triterpenoids and glycosides from durian exert pronounced anti-inflammatory activities.** *Food Chem* 2018, **241**:215-221.
161. Zhao WW, Zan K, Wu JY, Gao W, Yang J, Ba YY, Wu X, Chen XQ: **Antibacterial triterpenoids from the leaves of Ilex hainanensis Merr.** *Nat Prod Res* 2018:1-5.
162. Gupta R, Sharma AK, Sharma MC, Dobhal MP, Gupta RS: **Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycaemia.** *Nat Prod Res* 2012, **26**(12):1125-1129.
163. Geetha T, Varalakshmi P: **Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats.** *J Ethnopharmacol* 2001, **76**(1):77-80.
164. Lindblom P, Berg AL, Zhang H, Westerberg R, Tugwood J, Lundgren H, Marcusson-Stahl M, Sjogren N, Blomgren B, Ohman P *et al*: **Tesaglitazar, a dual PPAR-alpha/gamma agonist, hamster carcinogenicity, investigative animal and clinical studies.** *Toxicol Pathol* 2012, **40**(1):18-32.
165. Giordano Attianese GM, Desvergne B: **Integrative and systemic approaches for evaluating PPARbeta/delta (PPARD) function.** *Nucl Recept Signal* 2015, **13**:e001.

166. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P: **Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation.** *PPAR Res* 2007, **2007**:89369.
167. Sanchez MB, Miranda-Perez E, Verjan JCG, de Los Angeles Fortis Barrera M, Perez-Ramos J, Alarcon-Aguilar FJ: **Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR alpha/gamma dual agonist.** *Biomed Pharmacother* 2017, **94**:169-175.
168. Chen YY, Lee MH, Hsu CC, Wei CL, Tsai YC: **Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes.** *J Agric Food Chem* 2012, **60**(4):955-963.
169. Schultze SM, Jensen J, Hemmings BA, Tschopp O, Niessen M: **Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism.** *Arch Physiol Biochem* 2011, **117**(2):70-77.
170. Navarrete-Vazquez G, Torres-Gomez H, Hidalgo-Figueroa S, Ramirez-Espinosa JJ, Estrada-Soto S, Medina-Franco JL, Leon-Rivera I, Alarcon-Aguilar FJ, Almanza-Perez JC: **Synthesis, in vitro and in silico studies of a PPARgamma and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect.** *Bioorg Med Chem Lett* 2014, **24**(18):4575-4579.



**Triterpenos de Hibiscus  
sabdarriffa L. con efecto  
multimodal PPARδ/γ y  
AMPKα1: estudios in vivo, in  
vitro e in silico.**

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
- DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR
- DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO
- DR. SERGIO NEMORIO HIDALGO FIGUEROA
- DR. GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ

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

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ

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



ABRAHAM GIACOMAN MARTINEZ  
ALUMNO

Aprobar

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DR. MANASES GONZALEZ CORTAZAR

VOCAL

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

VOCAL

DR. SERGIO NEMORIO HIDALGO FIGUEROA

SECRETARIO

DR. GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ