



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M. en B. E. Hilda Loza Rodríguez

“ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO, URSÓLICO Y SUS DERIVADOS  
METILADOS COMO AGONISTAS DE PPAR”

COMITÉ TUTORAL

- Co- Director interno: Dr. Julio César Almanza Pérez
- Co- Director externo: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
- Asesor: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

MIEMBROS DEL JURADO

- Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
- Dr. Fausto Sánchez Muñoz
- Dra. Margarita Canales Martínez
- Dra. Fengyang Huang

Iztapalapa, Ciudad de México, febrero 2021

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 26 de enero de 2021

Comisión Académica del Posgrado

### **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presente

La que suscribe **HILDA LOZA RODRIGUEZ** alumna con número de matrícula **207381857**, del posgrado **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “**ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS URSÓLICO Y OLEANÓLICO Y SUS DERIVADOS METILADOS COMO AGONISTAS DE PPAR**” a desarrollar en **LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

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



**HILDA LOZA RODRIGUEZ**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **HILDA LOZA RODRIGUEZ**, alumna del posgrado **EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS URSÓLICO Y OLEANÓLICO COMO AGONISTAS DE PPAR”**,

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **26 de enero** del 2021.

Atentamente



**HILDA LOZA RODRIGUEZ**

## **COMITÉ TUTORAL**

- **Dr. Julio César Almanza Pérez**

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, Ciudad de México.

- **Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

## **ASESOR**

- **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, Ciudad de México.

**“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.**

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

**El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el  
CONACyT a través de la beca otorgada a la alumna Hilda Loza Rodríguez con  
el Número de CVU/BECARIO: 229804/212817**

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa Aprobó la tesis titulada “**ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO, URSÓLICO Y SUS DERIVADOS METILADOS COMO AGONISTAS DE PPAR**”, que presentó la M. en B.E. Hilda Loza Rodríguez el día 1 de febrero 2021.

- **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar (PRESIDENTE)**

Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa.



---

**FIRMA**

- **Dr. Fausto Sánchez Muñoz (SECRETARIO)**

Investigador en Ciencias Médicas D.  
Departamento de Inmunología  
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.



---

**FIRMA**

- **Dra. Margarita Canales Martínez (VOCAL).**

Lab. De Farmacognosia. FES Iztacala UNAM.

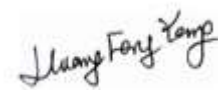


---

**FIRMA**

- **Dra. Fengyang Huang (VOCAL).**

Jefe de Laboratorio de Investigación en Farmacología,  
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.



---

**FIRMA**

## DEDICATORIAS

**“NUNCA DEJES QUE NADIE TE DIGA QUE NO PUEDES HACER ALGO, NI SIQUIERA YO. SI TIENES UN SUEÑO, TIENES QUE PROTEGERLO. LAS PERSONAS QUE NO SON CAPACES DE HACER ALGO POR ELLOS MISMOS, TE DIRÁN QUE TÚ TAMPOCO PUEDES HACERLO. SI QUIERES ALGO, VE POR ELLO”**

A lo largo de estos 4 años, he tenido el privilegio de tener a mi lado a gente muy valiosa para mí, que en ningún momento dejaron de apoyarme y animarme para que pudiera alcanzar este sueño.

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mis hijos **Ilse** y **Emilio**, deben saber que siempre se puede lograr todo lo que nos proponamos con esfuerzo y dedicación que, aunque pudiera parecer imposible, siempre habrá alguien que los apoyará. Los amo.

Dedico con todo mi amor este trabajo a mi esposo **Jair**. Sabes mi amor que siempre estaré apoyándote, así como tú lo hiciste desde el primer día que inicie este sueño. Gracias por tanto, por tus consejos y todas tus palabras de aliento cuando más las necesite. Te amo.

Dedico esta tesis y agradezco profundamente a mis papás **Juan** y **Dominga** y a mi hermano **Miguel Ángel**, siempre han sido y serán parte de mi fortaleza, parte de mis pilares y mis ejemplos a seguir, nunca dejaré de agradecerles lo que nos han apoyado. Los amo.

Dedico esta tesis a cada una de las personas que estuvieron conmigo apoyándome y alentándome cuando más lo necesite, en especial a la **Sra. Lilia Garduño** quien, con su ejemplo de fortaleza, logre llegar a la meta. Todos y cada uno de ustedes forman parte de este sueño que ya es una realidad. Gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Julio César Almanza Pérez**

Muchas gracias por todo el apoyo, consejos y motivación que me brindaste para la culminación de este proyecto. Sin duda, el camino no fue fácil, pero hemos llegado a la meta, eres un gran maestro y seguramente seguirás formando excelentes profesionistas.

### **Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**

Muchas gracias por la confianza que depositó en mi para poder realizar este proyecto. Gracias por los consejos y el apoyo que siempre me brindó.

### **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

Muchas gracias por todas sus enseñanzas, consejos y apoyo. Me llevo un gran aprendizaje que pondré en práctica siempre.

### **Dra. Fengyang Huang y Dr. Guillermo Aquino Jarquín**

Muchas gracias por recibirme en sus laboratorios, ya que sin conocerme me brindaron todo el apoyo que necesite en momentos complicados.

**Son unos grandes y valiosos investigadores que nos impulsan a querer hacer las cosas lo mejor posible, a generar nuevo conocimiento para que en un futuro podamos ayudar con nuestras investigaciones. GRACIAS por hacer una diferencia en mi vida.**

**A mis amigos: Edna, Lety, Ángeles, Norma, Martha, Erika, Nayeli, Gerardo, Israel, Jhovan, Mario y Christian.** Muchas gracias por todas sus palabras de aliento cuando las circunstancias no eran favorables, por ser mis amigos y por el cariño que me tienen.



| <b>ÍNDICE GENERAL</b>                           | <b>PÁGINAS</b> |
|---|----------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>                        | I              |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>                         | III            |
| <b>ABREVIATURAS</b>                             | IV             |
| <b>RESUMEN</b>                                  | X              |
| <b>ABSTRACT</b>                                 | XIV            |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                          |                |
| 1.1 Diabetes mellitus                           | 1              |
| 1.2 Diagnóstico de la DM                        | 2              |
| 1.2.1 Clasificación de la DM                    | 3              |
| 1.2.2 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)            | 4              |
| 1.2.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)            | 5              |
| 1.2.4 Diabetes mellitus tipo MODY y gestacional | 6              |
| 1.3 Epidemiología de la DM                      | 6              |
| 1.3.1 Fisiopatología y complicaciones de la DM2 | 8              |
| 1.4 Fármacos para el tratamiento de DM2         | 11             |
| 1.4.1 Sulfonilureas                             | 12             |
| 1.4.2 Biguanidas                                | 12             |
| 1.4.3 Meglitinidas                              | 13             |
| 1.4.4 Inhibidores de las $\alpha$ -glucosidasas | 14             |
| 1.4.5 Inhibidores de DDP-IV                     | 14             |
| 1.4.6 Inhibidores de SGLT2                      | 15             |
| 1.4.7 Tiazolidinedionas                         | 15             |

|   |    |
|---|----|
| 1.5 PPAR y su participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. | 16 |
| 1.5.1 Características estructurales y funcionales de PPAR                 | 17 |
| 1.5.2 Localización de PPAR y su función biológica                         | 19 |
| 1.5.2.1 PPAR $\alpha$   | 19 |
| 1.5.2.2 PPAR $\delta$   | 22 |
| 1.5.2.3 PPAR $\gamma$   | 24 |
| 1.6 Agonistas naturales y sintéticos para PPAR                            | 26 |
| 1.6.1 Agonistas para PPAR $\alpha$  | 26 |
| 1.6.2 Agonistas para PPAR $\delta$  | 27 |
| 1.6.3 Agonistas para PPAR $\gamma$  | 28 |
| 1.6.4 Agonistas duales y Pan para PPAR                                    | 30 |
| 1.7 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR                    | 31 |
| 1.7.1 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\alpha$         | 32 |
| 1.7.2 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\delta$         | 32 |
| 1.7.3 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\gamma$         | 32 |
| 1.7.4 Compuestos de origen vegetal como agonistas duales y Pan para PPAR  | 33 |
| 1.8 Compuestos triterpénicos  | 34 |
| 1.8.1 Ácido oleanólico  | 34 |
| 1.8.2 Ácido ursólico  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 1.9 Músculo esquelético y tejido adiposo como modelos de estudio. | 36 |
|   | 38 |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>  |    |
| 2.1 Propiedades farmacológicas del AO y el AU                     | 38 |
| <b>3.JUSTIFICACIÓN</b>  | 41 |
| <b>4.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>                                | 42 |
| <b>5. HIPÓTESIS</b>   | 42 |
| <b>6. OBJETIVO GENERAL</b>  | 42 |
| <b>7. OBJETIVOS PARTICULARES</b>                                  | 42 |
| <b>8. MATERIAL Y MÉTODO</b>                                       | 43 |
| 8.1 Compuestos químicos   | 44 |
| 8.2 Cultivo de adipocitos 3T3-L1                                  | 44 |
| 8.3 Cultivo de mioblastos C2C12                                   | 45 |
| 8.4 Prueba de funcionalidad celular                               | 45 |
| 8.5 Condiciones experimentales                                    | 46 |
| 8.6 Extracción y cuantificación de RNAm                           | 46 |
| 8.6.1 Retrotranscripción q-PCR                                    | 47 |
| 8.7 Extracción y cuantificación de proteína citosólica            | 48 |
| 8.8 Western Blot  | 49 |
| 8.9 Inmunodetección de GLUT-4 por microscopia confocal            | 50 |
| 8.9.1 Acumulación de lípidos                                      | 51 |
| 9. Estudios <i>in vivo</i>  | 51 |
| 9.1 Modelo de estudio de obesidad                                 | 51 |

|  |    |
|--|----|
| 9.2 Estandarización de la dieta de cafetería   | 51 |
| 9.3 Grupos de estudio  | 52 |
| 9.3.1 Grupo control negativo   | 52 |
| 9.3.2 Grupo control positivo y experimental  | 52 |
| 9.4 Tratamientos   | 53 |
| 9.5 Prueba de tolerancia a la glucosa  | 54 |
| 9.6 Prueba de tolerancia a la insulina   | 54 |
| 9.7 Parámetros bioquímicos y antropométricos   | 54 |
| <b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>  | 55 |
| <b>11. RESULTADOS</b>  | 56 |
| 11.1 Prueba de funcionalidad en el modelo in vitro   | 56 |
| 11.1.1 Mioblastos C2C12  | 56 |
| 11.1.2 Adipocitos 3T3-L1   | 57 |
| 11.2 Efecto del AO, AU y AO/M sobre la expresión de PPAR $\alpha$ y sus genes regulados en mioblastos. | 58 |
| 11.3 Efecto del AO, AU y AO/M sobre la expresión de PPAR $\gamma$ y sus genes regulados en mioblastos. | 58 |
| 11.4 Efecto del AO, AU y AO/M sobre la expresión de PPAR $\alpha$ y sus genes regulados en adipocitos. | 60 |
| 11.5 Efecto del AO, AU y AO/M sobre la expresión de PPAR $\gamma$ y sus genes regulados en adipocitos. | 60 |
| 11.6 Efecto del AO, AU y AO/M sobre las proteínas de PPAR $\alpha$ y FATP1 en mioblastos.              | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| 11.7 Efecto del AO, AU y AO/M sobre las proteínas de PPAR $\gamma$ y GLUT4 en mioblastos | 63  |
| 11.8 Translocación de GLUT-4 en mioblastos C2C12   | 64  |
| 11.9 Efecto del AO, AU y AO/M sobre la acumulación de lípidos en adipocitos              | 68  |
| 12. Estudios <i>in vivo</i>  | 69  |
| 12.1 Estandarización de la dieta de cafetería  | 69  |
| 12.2 Consumo de agua durante la dieta DCAF   | 70  |
| 12.3 Parámetros bioquímicos  | 71  |
| 12.4 Prueba de tolerancia a la glucosa   | 72  |
| 12.5 Prueba de tolerancia a la insulina  | 73  |
| <b>13 DISCUSIÓN</b>  | 74  |
| <b>14 CONCLUSIONES</b>   | 91  |
| <b>15 PERSPECTIVAS</b>   | 92  |
| <b>16 BIBLIOGRAFÍA</b>   | 93  |
| <b>17 PUBLICACIÓN</b>  | 115 |

| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>  | <b>PÁGINAS</b> |
|---|----------------|
| <b>FIGURA 1.</b> Diagnóstico de la Diabetes mellitus.   | 2              |
| <b>FIGURA 2.</b> Elementos de unión de los PPAR.  | 18             |
| <b>FIGURA 3.</b> Mecanismo de activación de PPAR.   | 18             |
| <b>FIGURA 4.</b> Mecanismos involucrados en los efectos benéficos de los fibratos.                                    | 21             |
| <b>FIGURA 5.</b> Mecanismos involucrados en el mecanismo de la glucosa a través de la estimulación de PPAR $\gamma$ . | 25             |
| <b>FIGURA 6.</b> Estructura molecular del ácido oleanólico.   | 35             |
| <b>FIGURA 7.</b> Estructura molecular del ácido ursólico.   | 36             |
| <b>FIGURA 8.</b> Secuencia de primers utilizados para q-PCR.  | 48             |
| <b>FIGURA 9.</b> Funcionalidad celular en mioblastos C2C12.   | 56             |
| <b>FIGURA 10.</b> Funcionalidad celular en adipocitos 3T1-L1.   | 57             |
| <b>FIGURA 11.</b> Expresión del RNAm de PPAR $\alpha$ , FATP-1 y ACSL en mioblastos.                                  | 59             |
| <b>FIGURA 12.</b> Expresión del RNAm de PPAR $\gamma$ , AdipoQ y GLUT-4 en mioblastos.                                | 59             |
| <b>FIGURA 13.</b> Expresión del RNAm de PPAR $\alpha$ , FATP-1 y ACSL en adipocitos.                                  | 61             |
| <b>FIGURA 14.</b> Expresión del RNAm de PPAR $\gamma$ , AdipoQ y GLUT-4 en adipocitos.                                | 61             |
| <b>FIGURA 15.</b> Expresión proteínica de PPAR $\alpha$ y FATP-1.   | 62             |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 16.</b> Expresión proteínica de PPARy y GLUT-4.  | 63 |
| <b>FIGURA 17.</b> Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4 15 min.                 | 64 |
| <b>FIGURA 18.</b> Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4 30 min.                 | 65 |
| <b>FIGURA 19.</b> Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4 60 min.                 | 66 |
| <b>FIGURA 20.</b> Efecto del AO, AU y AO/M sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. | 67 |
| <b>FIGURA 21.</b> Estandarización de la dieta DCAF.  | 69 |
| <b>FIGURA 22.</b> Peso corporal y consumo de kilocalorías.                                       | 69 |
| <b>FIGURA 23.</b> Consumo de agua.   | 70 |
| <b>FIGURA 24.</b> Parámetros bioquímicos.  | 71 |
| <b>FIGURA 25.</b> Niveles de transaminasas GTP y TGO.  | 72 |
| <b>FIGURA 26.</b> Prueba de tolerancia a la glucosa.   | 73 |
| <b>FIGURA 27.</b> Prueba de resistencia a la insulina.   | 74 |

| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  | <b>PÁGINAS</b> |
|--|----------------|
| <b>TABLA 1.</b> Clasificación de los diferentes tipos de DM.                               | 3              |
| <b>TABLA 2.</b> Expresión de PPAR, genes que regula y su acción metabólica.                | 19             |
| <b>TABLA 3.</b> Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\alpha$ .             | 27             |
| <b>TABLA 4.</b> Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\delta$ .             | 28             |
| <b>TABLA 5.</b> Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\gamma$ .             | 30             |
| <b>TABLA 6.</b> Agonistas duales y Pan que activan a los PPAR.                             | 31             |
| <b>TABLA 7.</b> Productos utilizados para la dieta DCAF. Contenido calórico en porcentaje. | 52             |



## ABREVIATURAS

- **ACC:** Amino ciclopropano carboxilato
- **ACAT:** Coresterol aciltransferasa CoA
- **ACSL:** Acil-coenzima A sintetasa
- **ACOX:** Acil coenzima A oxidasa
- **AdipoQ:** Adiponectina
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AGL:** Ácidos grasos libres
- **AKT:** Cinasa serina/treonina
- **AMP:** Adenosina monofosfato.
- **AMPK:** Proteína cinasa activada por AMP
- **ANOVA:** Análisis de varianza
- **AO:** Ácido oleanólico
- **AO/M:** Ácido oleanólico metilado
- **aP2:** Dominio de unión APETALA 2
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **ATP:** Adenosina trifosfato
- **AU:** Ácido ursólico
- **Ca<sup>2+</sup>:** Calcio
- **CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio
- **cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **CAP:** Proteína asociada a Cb1

- **Cb1:** Cannabinoide 1
- **CD36:** Glicoproteína de superficie celular
- **C/EBP $\alpha$ :** Proteína de unión  $\alpha$  a CCAAT
- **CoA:** Coenzima A
- **COMPLETE:** Inhibidor de proteasas
- **COX-2:** Ciclooxygenasa-2
- **CPT1:** Carnitina palmitol transferasa tipo1
- **CTc:** Células T citotóxicas
- **DAPI:** Polifosfato inorgánico por 4', 6-diamidino-2-fenil-indol
- **DBD:** Dominio de unión al ADN
- **DCAF:** Dieta de cafetería
- **DDP-4:** Dipéptidil peptidasa 4
- **DE:** Dieta estándar
- **DHA:** Ácido docohexaenoico
- **DM:** Diabetes mellitus
- **DM2:** Diabetes mellitus tipo 1
- **DMEM:** Dulbecco's Modied Eagle's Medium
- **DMG:** Diabetes mellitus gestacional
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **DTT:** Ditioneitol
- **DR-1:** Elementos de respuesta
- **DX:** Dexametasona

- **EPA:** Ácido eicosapentanoico
- **EROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **FasL:** Ligando Fas
- **FAT:** Translocasa de ácidos grasos
- **FATP-1:** Proteína transportadora de ácidos grasos tipo 1
- **FID:** Federación Internacional de la Diabetes
- **GAD65:** Ácido glutámico 65
- **GLP-1:** Péptido parecido al glucagón 1
- **GLUT-1:** Transportador de glucosa tipo 1
- **GLUT-4:** Transportador de glucosa tipo 4
- **GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G
- **GPI:** Polipéptido inhibidor gástrico
- **GSK3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa/cinasa 3 $\beta$
- **GTO:** Glutaminoxalacético transaminasa
- **GTP:** Glutamipiruvato transaminasa
- **G6Pasa:** Glucosa 6 fosfatasa
- **HbA 1c:** Hemoglobina glicada
- **HDL:** Lipoproteína de alta densidad
- **HEPES:** Ácido hidroxietil piperazinentasulfoínico
- **HMG-CoA:** Hidrometilglutaril-coenzima A sintetasa
- **HNF-4:** factor nuclear hepático 4
- **Hexocinasa IV:** Glucosinasa

- **HLA clase II:** Leucocitario humano clase II
- **IA-2:** Tirosina fosfatasas tipo 2
- **IL-1:** Interleucina 1
- **IL-6:** Interleucina 6
- **iNOS:** Óxido nítrico sintasa
- **IRS-1:** Sustrato de receptor de insulina tipo 1
- **KCL:** Cloruro de potasio
- **LBD:** Dominio de unión al ligando
- **LCAD:** Acil coenzima A oxidasa de cadena larga
- **LDL:** Lipoproteína de baja densidad
- **LKB1:** Proteína treonina cinasa
- **LPL:** Lipoproteínlipasa
- **LTB4:** Leucotrieno B4
- **MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- **MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos
- **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio
- **MIX:** Metilhidroxibutilxantina
- **mL:** Mililitros
- **MODY:** Diabetes del adulto de inicio juvenil
- **NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- **NFκB:** factor nuclear kappa B
- **NK:** Asesino natural

- **nm:** Nanómetros
- **PBS:** Buffer de fosfato salino
- **PGF:** Flores de *Punica granatum*
- **PI3K:** Fosfatidil inositol 3 fosfato
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetisulfonilo. Inhibidor de proteasas.
- **PPAR:** Receptores activados por proliferadores del peroxisoma
- **PPAR $\alpha$ :** Receptor activado por proliferador del peroxisoma tipo  $\alpha$
- **PPAR $\delta$ :** Receptor activado por proliferador del peroxisoma tipo  $\delta$
- **PPAR $\gamma$ :** Receptor activado por proliferador del peroxisoma tipo  $\gamma$
- **PPER:** Elementos de respuesta a PPAR
- **PTP-1B:** Proteína tirosina fosfatasa 1B
- **PVDF:** Fluoruro de polivinilideno
- **q-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **RI:** Resistencia a la insulina
- **RT:** Retrotranscripción
- **RXR:** Receptores del ácido 9-cis-retinoico
- **SCD2:** Esteroil desaseturasa CoA
- **SFB:** Suero fetal bovino
- **SREBP-1C:** Proteína de unión a elementos regulatorios de esterol 1C
- **SU:** Sulfonilureas
- **TBS:** Buffer bloqueador
- **TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

- **TZD:** Tiazolidinedionas
- **UI:** Unidades internacionales
- **μM:** Micromolar
- **UCP-1 y 3:** Proteína acoplada a mitocondria 1 y 3
- **VLDL:** Proteínas de muy baja densidad.

## RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una de las principales enfermedades crónicas y se encuentra extendida por todo el mundo. Se define como un conjunto de trastornos metabólicos cuya característica principal es la concentración elevada de glucosa en la sangre (hiperglucemia) de manera persistente, hasta alcanzar concentraciones nocivas para los sistemas fisiológicos, provocando complicaciones micro y macrovasculares que culminan en enfermedades asociadas a esta enfermedad. Su prevalencia mundial en el año 2019 fue de 463 millones de personas con proyecciones de 578.4 millones para el 2030 y de 700.2 millones en 2045. En México, la prevalencia en el 2019 fue de 9.9% (12.8 millones de personas).

Entre los factores involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad se encuentran algunos asociados a la insulina, principalmente cuando existen cambios en la secreción y/o acción de esta; además, se incrementa la producción de glucosa a nivel hepático y la presencia de RI en tejidos sensibles a esta hormona (músculo, tejido adiposo, hígado y páncreas). El tratamiento para la DM2 es muy complejo. Entre los medicamentos utilizados se encuentran las tiazolidinedionas (TZD), los cuales se unen específicamente a los receptores activados por proliferadores del peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) e influyen en la expresión de genes responsables para la producción de proteínas asociadas con el metabolismo de carbohidratos en dos de los tejidos implicados en esta homeostasis: músculo esquelético y tejido adiposo.

El descubrimiento del papel que juegan los PPAR en el restablecimiento de la sensibilidad a la insulina ha abierto una nueva perspectiva en el tratamiento de los

pacientes con DM2, dando pauta al estudio de moléculas de origen vegetal que pudieran utilizar estos factores de transcripción como posibles blancos terapéuticos. Tal es el caso del ácido oleanólico (AO) y el ácido ursólico (AU), los cuales se han reportado con propiedades antidiabéticas e hipolipidémicas. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados sobre la activación de los PPAR, con la finalidad de conocer si ambos compuestos participan en la activación de moléculas clave en la homeostasis de la glucosa y los lípidos.

En este estudio se evaluó el efecto del AO, AU y AO/M sobre la funcionalidad de las células C2C12 y 3T3L-1, así como la expresión del ARNm de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ . Además, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la expresión de ARNm de proteínas importantes producidas durante la activación de PPAR. Estas proteínas tienen un papel clave en la oxidación de lípidos (FATP-1 y ACSL), como sensibilizadores a la insulina (AdipoQ y GLUT-4). Además, se evaluó la translocación de GLUT-4 y la acumulación de lípidos en las células C2C12 y 3T3-L1, respectivamente. Por otra parte, se determinó el efecto de estos compuestos sobre los parámetros bioquímicos en ratones sometidos a una dieta de cafetería (DCAF).

El presente estudio muestra evidencia de que el tratamiento con AO, AU y AO/M a concentraciones bajas no afecta la funcionalidad de las células C2C12 y 3T3-L1. Se utilizó la concentración de 10  $\mu$ M de cada uno de los compuestos en los experimentos posteriores, debido a que es la concentración máxima a la cual estos compuestos no generan cambios en la funcionalidad de ambos tipos celulares. Los



agonistas duales de PPAR $\alpha$ / $\gamma$  son una nueva clase de fármacos desarrollados para producir efectos antidiabéticos e hipolipidémicos. El AO y el AU son moléculas que pueden asociarse con un efecto agonista en PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ . Los resultados mostraron que el AO aumenta la expresión del ARNm de PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , AdipoQ, GLUT-4, FATP-1 y ACSL en mioblastos C2C12. En los adipocitos 3T3-L1, la expresión del RNAm de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  incrementaron tras el tratamiento con el AO. El análisis de expresión proteínica de PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , así como de GLUT-4 y FATP-1, mostraron que el AO aumenta las expresiones de estas tres proteínas. Nuestros resultados reflejan que el AO produce un efecto dual sobre PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , además de inducir un aumento en la producción de las proteínas reguladas por los genes FATP-1 y GLUT-4, lo que podría estar asociado a una mejora en la condición metabólica en las células.

La translocación de GLUT-4 es uno de los eventos clave en la sensibilidad a la insulina. De hecho, es uno de los mecanismos de las TZD. Nuestros resultados mostraron que el AO y el AU tienen mayor efecto a los 30 minutos de tratamiento. Hasta el momento no se conoce evidencia sobre la participación del AO y el AU en la translocación de GLUT-4 en las células musculares. La administración del AO, AU y AO/M en células 3T3L-1 no mostró una diferencia significativa en el almacenamiento de lípidos, con respecto al grupo control. Se ha demostrado que el AO atenúa la acumulación de lípidos en los adipocitos al regular a la baja la inducción de PPAR $\gamma$  a niveles transcripcionales y al proceso de diferenciación de los adipocitos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la dieta DCAF generó una ganancia significativa de peso a partir de la sexta semana del

consumo de la dieta. Además, los ratones consumieron mayor cantidad de kcal provenientes de la grasa contenida en la dieta DCAF cuando se compara con la dieta estándar. En cuanto a los parámetros bioquímicos, nuestros resultados mostraron que los niveles de glucosa tienden a disminuir con el AU, el colesterol disminuyó significativamente con ambos tratamientos, mientras que los niveles de triglicéridos sólo disminuyeron con el tratamiento de AO.

En cuanto a la prueba de tolerancia a la glucosa, los resultados mostraron tendencia a disminuir el pico hiperglucémico con el tratamiento de AU, mientras que en la prueba de resistencia a la insulina se observó que el AO y el AU tienden a niveles normales de glucosa, lo cual representa un dato importante debido a que estos compuestos podrían regular genes que participan directamente en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Todos estos resultados brindan la posibilidad de sentar las bases para que el AO y el AU puedan ser considerados como moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos que, por un lado, participen en la homeostasis de la glucosa y, por otro, mantengan niveles normales de lípidos, contrarrestando los efectos causados por la DM2. Para ello, es necesario realizar estudios *in vivo* e *in silico* que validen que estos triterpenos pueden actuar como moléculas agonistas duales en tejidos sensibles a la insulina, con la posibilidad de evitar la polifarmacia para el tratamiento de DM2.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the main chronic diseases at the present time and it is widespread throughout the world. It is defined as a set of metabolic disorders whose main characteristic is a persistent high blood glucose concentration (hyperglycemia), abnormal until reaching concentrations harmful to the physiological systems, causing micro and macrovascular complications. Its prevalence worldwide in 2019 was 463 million people with projections of 578.4 million in 2030 and 700.2 million in 2045. In Mexico, the prevalence in 2019 was 9.9% (12.8 million people).

Among the involved factors in the pathophysiology of this disease are those associated with insulin, mainly when there are changes in its secretion and/or action; besides, liver glucose production is increased and the presence of IR in sensitive tissues to this hormone (muscle, adipose tissue, liver and pancreas) is evident. The treatment for DM2 is very complex and among the drugs used for this disease are TZD and fibrates that specifically bind to PPAR  $\gamma$  and  $\alpha$ , respectively, influencing in the gene expression of responsible proteins of both carbohydrate and lipoprotein metabolism in two of the tissues involved in this homeostasis, such as skeletal muscle and adipose tissue.

The discovery of the role that PPARs play in the restoration of insulin sensitivity has opened a new perspective in the treatment of patients with DM2, giving rise to the study of molecules of plant origin with capacity of use these transcription factors as possible targets therapeutic, such is the case of OA and UA, which have been attributed

with antidiabetic and hypolipidemic properties. The objective of this research was to determine the effect of the ursolic and oleanolic acids and its methylated derivatives on the activation of PPARs in order to know if both compounds participate in the activation of key molecules in glucose and lipid homeostasis.

The effects of OA, UA and OA/M on the functionality of C2C12 and 3T3L-1 cells was evaluated, as well as the mRNA expression of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . Furthermore, the effect of these compounds on mRNA expression of important proteins expressed during PPAR activation was evaluated. These proteins play a key role in the oxidation of lipids (FATP-1 and ACSL), as sensitizers of insulin (AdipoQ and GLUT-4) and for the activation of the signaling cascade of this hormone (IRS-1). Furthermore, GLUT-4 translocation and lipid accumulation were evaluated in C2C12 and 3T3-L1 cells, respectively. On the other hand, the effects of these compounds on biochemical parameters in rodents subjected to a DCAF were determined.

The present study shows evidence that treatment with OA, UA and OA/M at low concentrations did not affect the functionality of C2C12 or 3T3-L1 cells. In the subsequent experiments, a concentration of 10  $\mu$ M of each of the compounds was used, since it was the maximum dose at which these compounds did not show changes in the functionality of both cell types. The dual agonists of PPAR $\alpha/\gamma$  are a new class of drugs developed to produce antidiabetic and hypolipidemic effects. The AO and UA are molecules that can be associated with a potent agonist effect on PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ . The results of this investigation showed that OA increased the expression of PPAR $\alpha/\gamma$  mRNA, AdipoQ, GLUT-4, FATP-1 and ACSL in C2C12 myoblasts. In 3T3-L1

adipocytes, the mRNA expression of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  increased after treatment with OC. The protein expression analysis of PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ , as well as GLUT-4 and FATP-1, showed that OA increases the expressions of these three proteins. Our results show that OA produces a dual effect on PPAR $\alpha/\gamma$ , in addition to inducing an increase in the production of proteins regulated by the FATP-1 and GLUT-4 genes, which could be associated with an improvement in metabolic condition in cells.

GLUT-4 translocation is one of the key events in insulin sensitivity. In fact, it is one of the mechanisms of TZD. Our results showed that OC and UA reach its greatest effect after 30 minutes of treatment. So far, no evidence is known about the participation of OA and UA in the translocation of GLUT-4 in muscle cells, so our results could establish a new approach for the treatment with T2D.

The administration of OA, UA and OA/M in 3T3L-1 cells did not show a significant difference in lipid storage, with respect to the control group, however, it has been shown that OA attenuates the accumulation of lipids in adipocytes by down regulate the induction of PPAR $\gamma$  at transcriptional levels and the adipocyte differentiation process. The results obtained in this investigation showed that the DCAF diet generated a significant weight gain from the six weeks of consumption of the diet. In addition, the mice consumed a greater amount of kcal from the fat contained in the DCAF diet when compare with the DE diet. Regarding the biochemical parameters, our results showed that glucose levels tend to decrease with UA, cholesterol significantly decreased with both treatments, while triglyceride levels significantly decreased after treatment with OA.

In the glucose tolerance test, our results showed a tendency to decrease it after treatment with UA when compared to the DCAF diet control, while in the insulin resistance test, OA and UA tended to maintain normal glucose levels against DCAF control. These findings are important because these compounds regulate genes that participate directly in lipid and carbohydrate metabolism, as it was observed in vitro, which it is being confirmed in vivo. All these results offer the possibility that OC and UA be considered like molecules for the development of new drugs that can modulate the glucose and lipids homeostasis, with the possibility of reducing polypharmacy and improving T2D control.

# 1. INTRODUCCIÓN

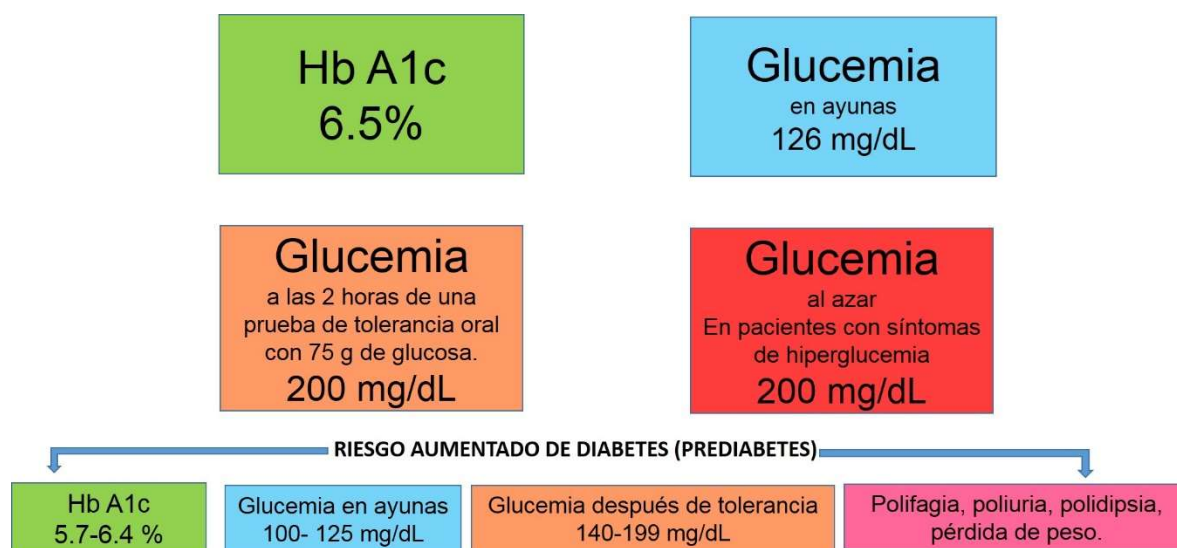
## 1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las principales enfermedades crónicas en el momento actual y se encuentra extendida por todo el mundo. Los nuevos hábitos de vida, fundamentalmente el exceso de ingesta calórica, la obesidad y el sedentarismo, permiten predecir un gran incremento en las próximas décadas, en especial en los países en vías de desarrollo. La DM se define como un conjunto de trastornos metabólicos caracterizados por concentraciones elevadas de glucosa en sangre (hiperglucemia) de manera persistente. Se trata de una enfermedad metabólica consecuencia del déficit en la acción de la insulina, debido a alteración en los tejidos efectores, que pierden sensibilidad a esta hormona (Madrigal-Bujaidar, 2012; Leslie et al., 2016).

Durante la DM la glucemia se eleva a valores anormales hasta alcanzar concentraciones nocivas para los distintos sistemas fisiológicos del organismo, provocando complicaciones micro y macrovasculares que propician otras enfermedades asociadas, como daño en el tejido nervioso (neuropatía), riñón (nefropatía), retina (retinopatía) y en prácticamente todo el organismo, con un pronóstico letal si no se controla. Las personas con DM también presentan mayor riesgo de contraer enfermedades cardíacas, arteriales periféricas y cerebrovasculares, e hígado graso no alcohólico (Canivell et al., 2014).

## 1.2 Diagnóstico de la DM

Los principales síntomas de la DM son poliuria (emisión excesiva de orina), polifagia (apetito exagerado), polidipsia (sed excesiva) y pérdida de peso sin razón aparente (Zimmet et al, 2001). Actualmente se recomiendan cuatro pruebas para el diagnóstico de DM, propuestos en 2019 por la Asociación Americana de Diabetes, que incluye los siguientes parámetros (Fig. 1).



**Figura 1.** Diagnóstico de diabetes mellitus (DM) de acuerdo a la ADA (2019).

Se considera un diagnóstico positivo de DM: valores de glucosa en plasma en ayunas  $\geq 126$  mg/dl, glucosa en plasma después de la carga 2 h  $\geq 200$  mg/dl, HbA1c  $\geq 6.5\%$ ; o una glucemia aleatoria  $\geq 200$  mg/dl en presencia de signos y síntomas (Mateos et al., 2002).



## 1.2 Clasificación de la DM

La DM se clasifica principalmente en diabetes tipo 1, tipo 2, diabetes asociada a mutaciones y algunas hiperglucemias producto de circunstancias traumáticas o secundarias a otras enfermedades. La Tabla 1 enlista algunos tipos de diabetes y su clasificación desde el punto de vista de su etiología (Canivell et al., 2014).

**TABLA 1.** Clasificación de los diferentes tipos de diabetes mellitus (DM).

| TIPO DE DIABETES MELLITUS   | CARACTERÍSTICAS   |
|---|---|
| <b>Diabetes tipo 1 (insulinodependiente).</b>                                 |   |
| DM de tipo 1A   | Destrucción autoinmune de las células $\beta$ - pancreáticas.   |
| DM de tipo 1B   | Carecen de inmunomarcadores indicadores de un proceso autoinmune destructivo de las células $\beta$ - pancreáticas.                         |
| <b>Diabetes tipo 2 (no insulinodependiente).</b>                              |   |
| DM tipo 2 común   | Existe la presencia de resistencia a la insulina y pérdida de la secreción de esta hormona por parte de las células $\beta$ - pancreáticas. |
| <b>Diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY)</b>                           |   |
| MODY 1  | Mutación del gen del factor nuclear de hepatocitos 4 $\alpha$ (HNF- 4 $\alpha$ ).   |
| MODY 2  | Mutación del gen de glucosinasa.  |
| MODY 3  | Mutación del gen del factor nuclear de hepatocitos 1 $^{\alpha}$ (TCF-1).   |
| MODY4   | Mutación del gen del factor promotor insulínico 1 (IPF1).   |
| MODY 5  | Mutación del gen del factor nuclear de hepatocitos 1 $\beta$ (HNF-1 $\beta$ ).  |
| MODY 6  | Mutación del gen de diferenciación neurógena (NEURODI).   |
| MODY X  | Mutación de los genes de insulina y el receptor de insulina.  |
| <b>Tipos de diabetes secundarias a circunstancias o patologías primarias.</b> |   |
| Diabetes por pancreatopatía.  | Pancreatitis crónica.<br>Operaciones quirúrgicas.   |
| Diabetes como consecuencia de endocrinopatías.                                | Enfermedad de Cushing.<br>Glucocorticoides.<br>Acromegalia.   |
| Otras   | Diabetes gestacional, secundaria a supresión inmunitaria, por farmacoterapia.   |

### ***Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1).***

Esta forma de diabetes representa únicamente del 5 al 10% de las personas con esta patología; es conocida como diabetes insulino dependiente, diabetes tipo 1 o diabetes de inicio juvenil, que resulta de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans en el páncreas. Existen distintas causas por las cuales puede ocurrir la destrucción de los islotes: virus, agentes químicos, autoinmunidad cruzada y predisposición genética. Los marcadores de la destrucción inmune de las células incluyen autoanticuerpos de células de los islotes de Langerhans, autoanticuerpos contra insulina, autoanticuerpos contra ácido glutámico 65 (GAD65) y autoanticuerpos contra las tirosina fosfatasas IA-2 (Maedler et al., 2008).

La destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas se asocia principalmente con la activación de dos vías apoptóticas: la vía de la perforina-granzima y la vía del ligando Fas (FasL). Estos inductores apoptóticos y algunas citocinas inflamatorias son sintetizados en las células T citotóxicas (CTc) y *natural killer* (NK) y son liberadas sobre la superficie de la célula blanco. Por otro lado, el FasL se localiza como una proteína integral en la membrana de la célula T y reconoce a un receptor CD95, el cual se encuentra implicado en el desarrollo de la DT1 y de la DT2 (Madrigal et al., 2012). Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar DT1 se encuentra en los genes del antígeno leucocitario humano clase II (HLA clase II) del cromosoma 6, que contribuyen con el 50% del riesgo, y están asociados con algunos polimorfismos genéticos en los sitios de unión del péptido (Gan et al., 2012).

Mediante la identificación de estos anticuerpos en personas sanas es posible establecer el riesgo de desarrollar la enfermedad; por ejemplo, la presencia de anticuerpos contra insulina confiere un riesgo pequeño, mientras que la combinación de anticuerpos contra células de los islotes y contra GAD65, o contra insulina, representa un riesgo alto para desarrollar DM1 (Jackson et al., 2001).

### ***Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)***

La DM2 representa entre el 90% y el 95% de la diabetes, con las proporciones más altas en los países de ingresos bajos y medianos. Es un problema de salud global común y grave que ha evolucionado en asociación con rápidos cambios en la dieta y el estilo de vida, como un mayor consumo de alimentos altamente procesados y bebidas azucaradas, reducción de la actividad física y estrés, lo que puede culminar en obesidad. Durante esta situación, el páncreas tiene una hiperactividad por la concentración alta y constante de glucosa en sangre, con una secreción de insulina elevada para conservar la glucemia en niveles normales (Sharabi et al., 2012).

Entre las causas que desencadenan la DM2 se encuentran diversos factores, como la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), junto con otros factores de riesgo que incluyen: obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de DM, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria (Madrigal et al., 2012). Varios órganos juegan un papel crucial en la fisiopatología de la DM2 (páncreas, hígado, músculo esquelético y tejido adiposo), cuya disfunción altera la homeostasis de la glucosa. (Kluth et al., 2011).

### ***Diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY) y gestacional***

La glucosinasa (hexocinasa IV) es una enzima que funciona como un sensor de glucosa y cataliza su fosforilación; se expresa en tejidos que regulan el metabolismo de la glucosa, como el hígado y páncreas. Las mutaciones en el gen de dicha enzima ocurren en cierto tipo de MODY y llevan a una disminución en la capacidad de fosforilar a la glucosa. Cuando las células  $\beta$ -pancreáticas se someten a dosis altas de glucosa de manera crónica, disminuye la cantidad y la actividad de la glucosinasa; además, la glicación de factores de transcripción del gen de glucosinasa, reduce su ARNm (Madrigal et al., 2012).

En la diabetes gestacional, el aumento de estrógenos y progesterona produce hiperplasia de las células  $\beta$ -pancreáticas y, por consiguiente, se afecta el metabolismo de los carbohidratos, aumentando la secreción de insulina. Durante la segunda mitad del embarazo (24-28 semanas), el metabolismo de los carbohidratos se afecta al aumentar la producción de somatostatina coriónica humana placentaria, prolactina, cortisol y glucagón, lo que contribuye a una disminución de la tolerancia a la glucosa y a mayor resistencia a la insulina (Kooptiwut et al., 2005).

### **1.3 Epidemiología de la DM**

La prevalencia de DM en todo el mundo fue de 463 millones de personas en 2019, con proyecciones de 578.4 millones en 2030 y de 700.2 millones en 2045. En México, la prevalencia de DM fue de 9.9% (12.8 millones de personas) en 2019. Las estimaciones de DM para el 2019 mostraron una prevalencia típicamente creciente por

edad. Se pronostican tendencias similares para los años 2030 y 2045. La prevalencia es más baja entre los adultos de 20-24 años (1.4% en 2019), entre los 20-75 años es de 9.3 % en 2019 mientras que entre los adultos de 75-79 años, la prevalencia de DM se estimó en 19.9% y se prevé que aumente a 20.4% y 20.5% en 2030 y 2045, respectivamente. La prevalencia DM en mujeres es ligeramente inferior que en hombres (9% frente a 9.6%). En 2019 hubo aproximadamente 17.2 millones más de hombres que mujeres que viven con esta enfermedad. Se espera que la prevalencia de DM aumente tanto en hombres como en mujeres para el 2030 y 2045. La DM2 representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un exceso en el peso corporal y a la inactividad física (Cho et al., 2019).

Hasta hace poco, la DM2 sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños. Debido al aumento de la obesidad y la inactividad física entre los niños y adolescentes en muchos países, la DM2 tiene el potencial para convertirse en un problema de salud pública global que conducirá a graves resultados adversos para la salud. En relación con la DM gestacional (DMG) gestacional, se estima que 20.4 millones o 15.8% de los nacimientos vivos en 2019 tuvieron alguna forma de hiperglucemia en el embarazo. De los cuales, el 83.6% se debió a DMG, mientras que el 7.9% fue el resultado de la diabetes detectada antes del embarazo, y el 8.5% debido a la diabetes (incluidos el tipo 1 y el tipo 2) (Dall et al., 2014; Cho et al., 2019).

Se estima que aproximadamente 4.2 millones de adultos de entre 20 y 79 años murieron como resultado de la DM y sus complicaciones en 2019. Esto equivale

a una muerte cada ocho segundos. Se estima que la DM está asociada con el 11.3% de las muertes mundiales por todas las causas entre las personas de este grupo de edad. Casi la mitad (46.2%) de las muertes asociadas con la DM entre el grupo de edad de 20 a 79 años son en personas menores de 60 años. A nivel mundial, hay más muertes asociadas con diabetes en mujeres (2.3 millones) que en hombres (1.9 millones). A pesar de su impacto caracterizado por la mortalidad prematura y la baja calidad de vida debido a complicaciones relacionadas con esta enfermedad, la DM también impone un impacto económico significativo en los países, en los sistemas de salud y, cuando la atención médica necesita ser financiada por los mismos afectados, en los mismos pacientes. En 2019, la Federación Internacional de la Diabetes (FID) estimó que el gasto total en salud relacionado con la DM alcanzó los 760 mil millones de dólares. Se espera que el impacto económico de la diabetes continuará creciendo y se proyecta que el gasto alcanzará 825 mil millones de dólares para 2030 y 845 mil millones de dólares para 2045. Esto representa un aumento de 8.6% y 11.2%, respectivamente (Magliano et al. 2019; Fazeli et al., 2013).

### **1.3.1 Fisiopatología y complicaciones de la DM2.**

Varios de los factores involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad, están asociados a la insulina. Esta hormona juega un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa y, cuando existen cambios en su secreción y/o acción, se incrementa la producción de glucosa a nivel renal y hepático. Además, en DM la sensibilidad de esta hormona en sus tejidos blanco (músculo esquelético, hígado y tejido adiposo) se encuentra disminuida, generando resistencia a la insulina (RI) e

hiperinsulinemia, que culmina en un estado hiperglucémico generalizado, una de las características principales de la DM2 (Polonsky et al., 2012).

La hiperlipidemia y el desarrollo de un estado inflamatorio, generados por un consumo excesivo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos, contribuyen también al desarrollo de la RI. El exceso de tejido adiposo es uno de los principales promotores de este estado, ya que su aumento favorece la síntesis de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Yaribeygi et al., 2019). Además, diversos estudios han demostrado que en la DM2 existe un incremento de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B), que es una enzima que desfosforila al sustrato de receptor de insulina tipo 1 (IRS-1), bloqueando la cascada de señalización de la insulina (Johnson et al., 2002). Por otra parte, esta señalización también es inhibida cuando hay un exceso de tejido adiposo y altas concentraciones de ácidos grasos (diacilglicerol y ceramidas), lo que conlleva a una reducción del transporte de la glucosa a través del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), siendo el tejido adiposo y músculo esquelético los más afectados (Arner et al., 2015).

Un incremento en la concentración de lípidos y carbohidratos conlleva a un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo cual genera productos de lipoperoxidación que finalmente desencadenan un desbalance en el estado redox del organismo. Esto a su vez provoca cambios en la señalización celular, afectando la cascada de señalización de la insulina (Newsholme et al., 2016). El incremento en la hiperglucemia provoca que a nivel pancreático se aumente la

secreción de insulina para compensar los altos niveles de glucosa. Sin embargo, en un estado avanzado, las células  $\beta$ -pancreáticas comienzan a disminuir su función (agotamiento pancreático) y el estado hiperglucémico permanece latente (Díaz et al., 2004).

Las complicaciones diabéticas son consecuencia de la hiperglucemia o la elevación crónica de la glucosa en la sangre. La exposición persistente de los tejidos a altas concentraciones de glucosa (glucotoxicidad) puede provocar daños en el endotelio y en pequeños vasos sanguíneos, dando lugar a complicaciones microvasculares en tejidos y órganos, incluido el riñón (nefropatía), ojos (retinopatía), nervios y sistema nervioso central (neuropatía periférica y autónoma). Adicionalmente la hiperglucemia conduce al daño de los vasos sanguíneos grandes y complicaciones macrovasculares o cardíacas, que están asociadas con enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis acelerada, miocardiopatía, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Yan et al., 2014).

Aunque la hiperglucemia se ha considerado como la principal causa de complicaciones diabéticas, existen otros factores que afectan su desarrollo y progresión, como la dislipidemia y la acumulación de metabolitos lipídicos (lipotoxicidad), deficiencia de óxido nítrico, hipertensión, reguladores y niveles de citocinas, estrés oxidante e inflamación (Díaz et al., 2019).

Varios mecanismos han sido propuestos en la patogénesis de las complicaciones diabéticas inducidas por hiperglucemia, dichos mecanismos incluyen:



- Estrés metabólico: causado por el aumento del flujo de glucosa en varias vías metabólicas (glucólisis, ruta de las poliol, ruta de la hexosamina y glicación no enzimática) (Manda et al., 2015).
- Estrés oxido/reductor: aumenta el flujo de metabolitos a través del ciclo de Krebs, lo cual conduce a una alta producción de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y estrés reductor, lo que provoca un incremento en el flujo de electrones y con ello la formación de EROS (Du et al., 2000).
- Estrés inflamatorio: la inflamación es un mecanismo fisiopatológico común en muchas enfermedades, incluidas DM, donde varios mediadores proinflamatorios (IL-1, IL-6) están regulados positivamente y contribuyen a complicaciones vasculares (Zakaria et al., 2017).

#### **1.4 Fármacos para el tratamiento de DM2.**

El tratamiento para la DM2 es muy complejo, ya que la fisiopatología de la enfermedad abarca muchos aspectos. Se considera necesaria la intervención simultánea sobre la hiperglucemia y todos los factores de riesgo cardiovascular: dislipidemia e hipertensión. Los cambios en el estilo de vida (modificaciones dietéticas y aumento del ejercicio físico) son muy importantes para mejorar todas las alteraciones relacionadas, como la hiperglucemia, la dislipidemia, la hipertensión y el riesgo cardiovascular. Además, es importante el uso de medicamentos que favorezcan el incremento de la secreción y acción de la insulina, buscando contrarrestar los efectos

de esta enfermedad (Ascaso et al., 2013). Algunos de los fármacos empleados para su tratamiento se enlistan a continuación:

#### **1.4.1 Sulfonilureas**

Tienen un efecto hipoglucémico agudo, actuando sobre la célula  $\beta$  del páncreas mediante un estímulo sobre la secreción de insulina y un efecto hipoglucémico crónico mediado por la potenciación de la acción de la insulina, por aumento del número de receptores para la insulina o de su unión a ellos en los tejidos sensibles (Ugwoke et al., 2017). La acción se inicia tras su unión a un receptor específico, provocando el bloqueo de los canales de potasio dependientes de adenosina trifosfato (ATP), evento que genera la apertura de los canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), promoviendo la liberación de insulina y la consecuente disminución de la glucemia (Filion et al., 2019). Se puede esperar una reducción en la glucemia basal de 50-60 mg/dl, y en 1.5-2% en la hemoglobina glicada (HbA 1c). Todas las sulfonilureas se metabolizan en hígado y sus metabolitos más o menos activos son eliminados por vía renal. La frecuencia de efectos adversos es baja (2-5%); el principal efecto secundario es la hipoglucemia, que se ha visto más frecuentemente asociada al uso de sulfonilureas de vida media larga, como la clorpropamida y la glibenclamida (Lv et al., 2020).

#### **1.4.2 Biguanidas**

Consiguen su efecto antihiper glucémico a través de acciones extrapancreáticas, sobre todo por disminución de la liberación de glucosa hepática,

junto a otras no bien conocidas (anorexígena, disminución de absorción intestinal de glucosa, aumento en el número de receptores de insulina, potenciación en la acción de la insulina). Otro de sus mecanismos de acción es el aumento de la sensibilidad a la insulina en tejido hepático mediante la disminución de la glucogenólisis (liberación hepática de glucosa) y gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de otros sustratos como aminoácidos o glicerol). También aumenta la sensibilidad a la insulina en tejido periférico (principalmente en músculo), directa e indirectamente (por disminución del efecto tóxico de la hiperglucemia) (Song et al., 2016).

La metformina reduce la glucemia basal sobre 60-70 mg/dl y la HbA 1c en 1.5 - 2%. Además de sus efectos sobre la glucemia, tienen efectos favorables sobre lípidos (reducción de triglicéridos, LDL y colesterol total), independientemente de la mejora en el control glucémico. Otros potenciales beneficios se asocian a una falta de aumento de peso, no produce hiperinsulinemia y no causa hipoglucemia. Es el único fármaco que hasta el momento ha demostrado disminuir la morbimortalidad cardiovascular (Lv et al., 2020).

### **1.4.3 Meglitinidas**

Como las sulfonilureas (SU), actúan estimulando la secreción de insulina por inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células  $\beta$ -pancreáticas, aunque difieren en las zonas de unión. En monoterapia, la repaglinida produce descensos similares a SU o metformina en las cifras de glucemia y HbA1c,

con un mejor control de las glucemias postprandiales; la hipoglucemia es su principal efecto secundario (Taneja et al., 2015; Li et al., 2017).

#### **1.4.4 Inhibidores de las $\alpha$ -glucosidasas**

Actúan inhibiendo las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las microvellosidades intestinales, que son las enzimas que actúan en el desdoblamiento de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa) (Ezebuenyi et al., 2017). El resultado es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales (Baron et al., 1998). Se ha descrito un efecto sobre la hiperglucemia menor que con las sulfonilureas y la metformina: reducción de 25-30 mg/dl en la glucemia basal, 40-50 mg/dl en la glucemia postprandial, y de 0.7- 1% en la HbA1c. Su utilidad clínica es la corrección de hiperglucemias postprandiales. Los problemas gastrointestinales son el principal efecto secundario y ocurren en el 30% de los pacientes tratados (Levetan et al., 2007).

#### **1.4.5 Inhibidores de DPP-IV (Incretinas)**

Las hormonas incretinas GLP-1 y GIP se liberan en el intestino durante todo el día; sus concentraciones aumentan en respuesta a la comida. La actividad de estas hormonas está limitada por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-4), que inactiva rápidamente las incretinas (Figueredo et al., 2016). Como inhibidor de la DPP-4, la sitagliptina actúa en los pacientes con DM2 retrasando la inactivación de las incretinas y mejorando así la función secretora de insulina de la célula  $\beta$ - pancreática (Juillerat et

al., 2014). Esta respuesta se produce de manera dependiente de los niveles de glucosa, por lo que el riesgo de hipoglucemia se encuentra significativamente disminuido. Sitagliptina mejora significativamente la HbA1c, la glucosa en ayuno y la glucosa posprandial a las 2 horas (Akoumianakis et al., 2017).

#### **1.4.6 Inhibidores de SGLT2**

La canagliflozina es un fármaco que inhibe los transportadores de Na<sup>+</sup>/glucosa, lo cual impide la reabsorción de glucosa a nivel renal (DeFronzo et al., 2017). Entre sus efectos adversos se tienen deshidratación, infecciones urinarias y pérdida de peso (Ruitenv et al., 2018).

#### **1.4.7 Tiazolidinedionas (TZD)**

Las tiazolidinedionas, también llamadas glitazonas o sensibilizadores de insulina, actúan aumentando la sensibilidad a la insulina, sin afectar la secreción de esta. Específicamente se unen al receptor activador de los proliferadores peroxisomales tipo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y afectan los factores de transcripción que influyen en la expresión de los genes responsables de la producción de proteínas reguladoras del metabolismo de carbohidratos y lipoproteínas. Esto lleva a un aumento en los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT- 4 (Nanjan et al., 2018).

Su mecanismo de acción es promover la captación de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado a través de los PPAR. A nivel celular las TZD previenen la hiperglucemia severa inducida por RI en músculo esquelético y cardiaco,

producen un incremento en la captación de glucosa y en las proteínas transportadoras GLUT-1 y GLUT-4 (Lee et al., 2017). En el hígado aumentan la sensibilidad a la insulina, por lo tanto, disminuyen la producción de glucosa hepática. Son metabolizadas por el hígado a través del citocromo P<sub>450</sub> (Davidson et al., 2017).

La RI inducida por el TNF- $\alpha$  es antagonizada por las TZD; a su vez, tienen efectos en el metabolismo sobre los lípidos, reduciendo los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres, y aumentando el colesterol total, el colesterol HDL y disminuye el LDL (Lebovitz et al., 2019). Su eficacia es ligeramente inferior a la de metformina o secretagogos, produciendo descensos de la HbA1c de 1.4–1.8% y de la glucemia basal de 39–65 mg/dL. Su uso se ha asociado con aumento del peso corporal, riesgo cardiovascular, edema, osteoporosis y cáncer de vejiga (Studies et al., 2018). La ganancia de peso podría deberse a la acumulación de triglicéridos y glucosa en el tejido adiposo. En hígado, se ha demostrado que pioglitazona y rosiglitazona incrementan el contenido hepático de triglicéridos y favorecen el desarrollo de esteatosis (Bae et al., 2019).

### **1.5 PPAR y su participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos**

Los receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPAR) son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de receptores de ubicación nuclear, que se comportan como factores que modulan la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) al unirse a elementos de respuesta específicos de ciertos genes blancos. Hasta el momento se han descrito tres tipos principales de PPAR

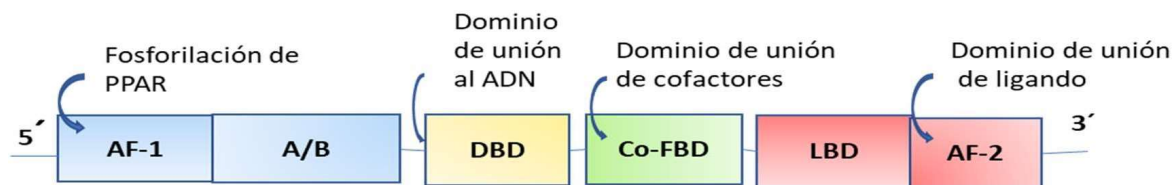
designados como  $\alpha$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ ; estos receptores se encuentran involucrados en la regulación de diferentes procesos metabólicos. La activación de este tipo de receptores por los medicamentos hipolipemiantes, las concentraciones fisiológicas de ácidos grasos, los eicosanoides y en última instancia por las TZD, incrementó enormemente el interés en su papel fisiológico tanto en el metabolismo de lípidos como en el de los carbohidratos (Han et al., 2017b).

### **1.5.1 Características estructurales y funcionales de PPAR**

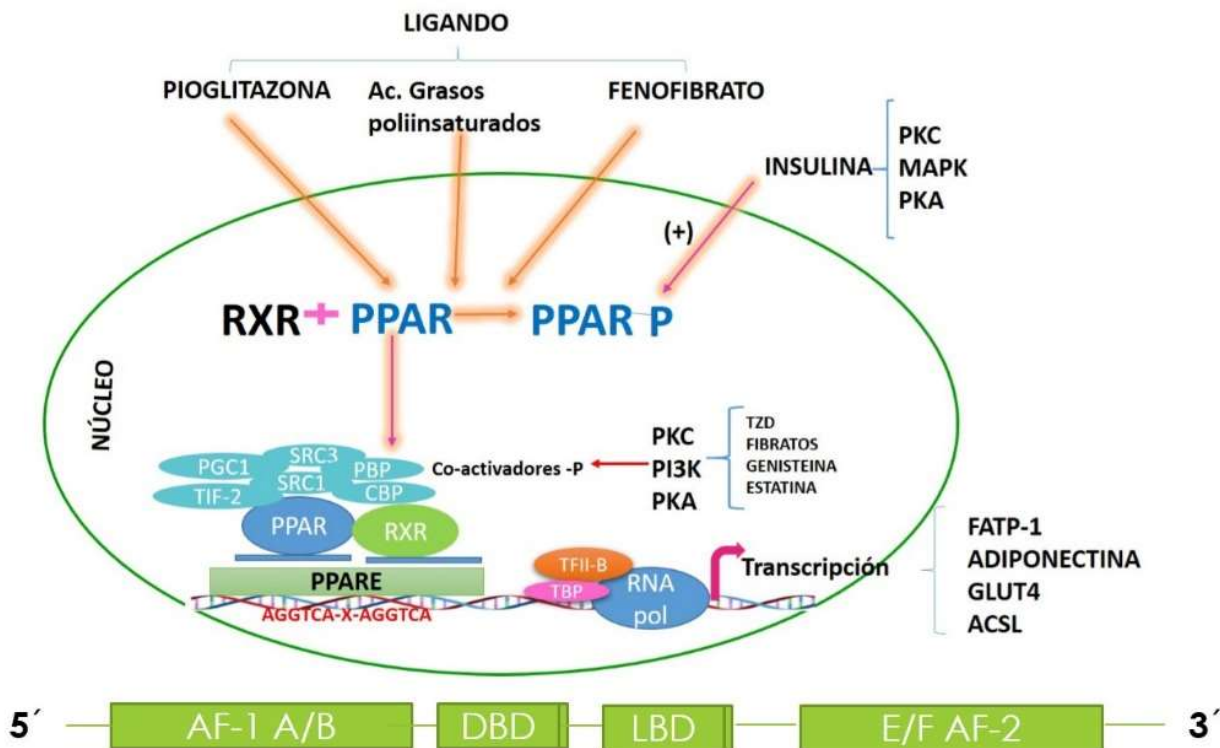
Al igual que otros miembros de la familia de receptores nucleares, los PPAR están compuestos de tres dominios principales: la región NH<sub>2</sub> terminal, el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD). El LBD sufre cambios conformacionales debido a la unión de agonistas, convirtiendo a los PPAR en formas activas que se unen al ADN, a través de una superficie en la que participan los motivos en dedo de zinc del DBD, que interactúan con secuencias específicas de ciertos genes, llamadas elementos de respuesta (PPRE). Además, el LBD también es importante en los procesos de dimerización, localización nuclear y asociación con varias proteínas a estos receptores, formándose un complejo coactivador o correpresor que cambia el estado de acetilación de las histonas y modula la transcripción génica (Willson et al., 2000).

Los PPAR forman heterodímeros con los receptores del ácido 9-cis-retinoico (RXR), luego de lo cual pueden unirse a los PPRE, que consisten en secuencias de seis nucleótidos repetidas y separadas por un nucleótido, conocidas como elementos

de respuesta DR-1 (Azhar et al., 2010). La unión de cualquiera de los 2 ligandos a los receptores que conforman los heterodímeros puede activar el complejo. Los PPAR $\alpha$  y pueden ser fosforilados en la región NH<sub>2</sub> terminal por la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK); esta fosforilación altera la actividad del receptor por comunicación intramolecular entre esta región y el LBD (Amber et al., 2016) (Figs. 2 y 3).



**Figura 2.** Elementos de unión de los PPAR.



**Figura 3.** Mecanismo de activación de PPAR. Los ligandos naturales o sintéticos se unen a los PPAR; posteriormente se forma una unión con el receptor retinoide X y PPAR es fosforilado. Luego se dirigen a secuencias específicas del DNA conocidas como PPARE que, con la ayuda de diferentes coactivadores, inician la transcripción de diferentes genes asociados al metabolismo de lípidos y carbohidratos.



## 1.5.2 Localización de PPAR y su función biológica

Actualmente los PPAR se caracterizan, estructural y farmacológicamente como alfa ( $\alpha$ ); delta o beta ( $\delta$ ) y gama ( $\gamma$ ), formando parte de la superfamilia de receptores nucleares (Tabla 2).

**Tabla 2.** Expresión de PPARs, los genes que regula y su acción metabólica.

| ISOFORMAS DE PPAR   | TEJIDO DONDE SE EXPRESA   | GENES QUE REGULA  | ACCIÓN METABÓLICA  |
|---------------------|---|---|--|
| PPAR $\alpha$       | Músculo esquelético, tejido adiposo, riñón, hígado, células endoteliales, linfocitos, macrófagos y monocitos.                         | FATP-1, ACSL, FAT/CD36, FABP, PDK4, ACoADH, 3- HAcCoAD, AcilCoAD. | <ul style="list-style-type: none"> <li>Regula la oxidación de los ácidos grasos libres.</li> <li>Incrementa: HDL, catabolismo de TG, colesterol, cetogénesis.</li> <li>Disminuye: colesterol V-LDL.</li> </ul> |
| PPAR $\gamma$       | Tejido adiposo, músculo esquelético, riñón, hígado, intestino delgado, vejiga, bazo, células del sistema inmune, retina y macrófagos. | GLUT-1, GLUT-4, adiponectina, PEPCK, LPL, FAT/CD36.               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Regula el metabolismo de la glucosa.</li> <li>Incrementa: incorporación de la glucosa, glicerol, ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina.</li> </ul>              |
| PPAR $\beta/\delta$ | Intestino, riñón y corazón.   | ACS, FATP, FABP, LPL, CPT-1, CPT-2, ACCL5, UCP-2, UCP-3           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementa: oxidación de ácidos grasos en mitocondria, transporte de lípidos, hidrólisis de triglicéridos y la termogénesis.</li> </ul>                                 |

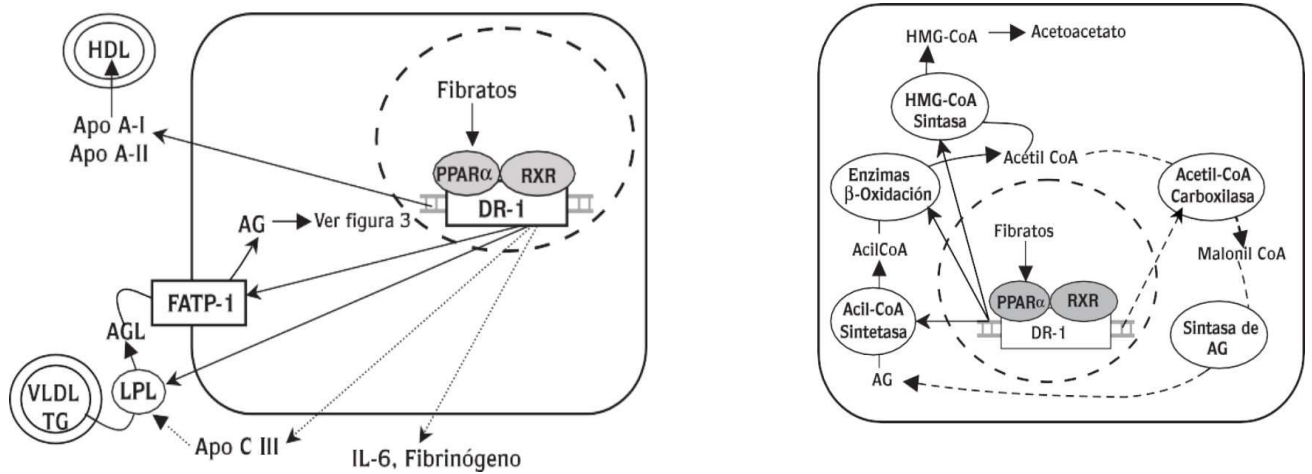
### 1.5.2.1 PPAR $\alpha$

Su gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22 (22q12-q13.1). Estos receptores se expresan en el músculo esquelético, tejido adiposo, corazón, riñón e hígado, donde la expresión del RNAm es estimulada por los glucocorticoides, tanto por estrés como por las variaciones de estas hormonas (Tan et al., 2017).

La activación de PPAR $\alpha$  media efectos tales como el catabolismo de los ácidos grasos a través de la estimulación de la oxidación lipídica mitocondrial; controla

en forma importante el metabolismo extracelular de los lípidos, alterando los niveles de lipoproteínas e inhibiendo algunos mecanismos involucrados en los procesos inflamatorios de la pared vascular (Ferre et al., 2004). Los agonistas de PPAR $\alpha$  incrementan la captación hepática y la esterificación de los ácidos grasos libres (AGL), previniendo su movimiento, mediante la estimulación de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP-1) y la expresión génica de la acil-coenzima A sintetasa (ACSL), respectivamente.

En el músculo esquelético PPAR $\alpha$  incrementa la captación mitocondrial de AGL y, por consiguiente, su oxidación para la obtención de la energía al estimular la carnitina palmitotransferasa I. El efecto de los fibratos que conduce al catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL), se debe a la estimulación de la lipoproteinlipasa dependiente de PPAR $\alpha$  (LPL), con inhibición simultánea de la apolipoproteína C-III, causada por la represión del factor nuclear hepático 4 (HNF-4); mientras que el incremento del colesterol HDL depende de la sobreexpresión de las apolipoproteínas A-I y A-II. Los AGL, el estado de ayuno prolongado y la activación de PPAR $\alpha$  incrementan la transcripción de las hidrometilglutaril-coenzima A sintetetasas (HMG-CoA) mitocondrial y citosólica, enzimas clave en el control de la cetogénesis; catalizan la condensación de acetil-CoA y acetoacetato-CoA para generar HMG-CoA, la sustancia precursora del mevalonato que, eventualmente, puede ser convertido en cuerpos cetónicos útiles como combustible metabólico (Fig. 4) (Pyper et al., 2010).



**Figura 4.** Mecanismos involucrados en los efectos benéficos de los fibratos, en el perfil lipídico y su metabolismo mediados a través de la estimulación de PPAR $\alpha$ .

Los PPAR también se expresan ampliamente en lesiones ateroscleróticas, están presentes en el endotelio y en las células musculares lisas, monocitos, macrófagos derivados de monocitos y células espumosas de las placas ateroscleróticas. Cuando estos receptores son activados, inhiben la óxido nítrico sintasa (iNOS) inducible en los macrófagos y previenen la secreción inducida por la interleucina 1 (IL-1) de la interleucina 6 (IL-6) y las prostaglandinas, así como la expresión de la ciclooxigenasa- 2 (COX-2). Además, la activación de PPAR $\alpha$  inhibe la expresión de la endotelina-1 inducida por trombina, como resultado de una regulación transcripcional negativa del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y de las rutas de señalización de la proteína activadora-1 (aP-1) (Han et al., 2017a).

La activación de PPAR $\alpha$  también induce apoptosis en los macrófagos derivados de monocitos, probablemente a través de la inhibición de NF $\kappa$ B. Estos mecanismos contribuyen a explicar por qué los fibratos no son sólo agentes reductores del colesterol y triglicéridos, sino

que también alteran las concentraciones de IL-6, fibrinógeno y proteína C reactiva. Así, los diferentes efectos de los activadores de PPAR $\alpha$  sobre el perfil lipídico plasmático y los procesos inflamatorios de la pared vascular, ciertamente participan en la inhibición del desarrollo de la placa aterosclerótica (Zhong et al., 2009). Otros mecanismos implicados en la modulación del fenotipo de lipoproteínas como consecuencia de la utilización de fibratos, incluyen: reducción en la producción de triglicéridos en los hepatocitos, aumento de la captación y catabolismo de partículas LDL, reducción del intercambio de lípidos neutros entre las VLDL y las HDL, reducción en la actividad de la acetil-CoA carboxilasa y de la sintasa de ácidos grasos, lo que aumenta la  $\beta$ -oxidación (Francis et al., 2003).

#### **1.5.2.2 PPAR $\delta$**

Su gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.1-p21.2). Se encuentra distribuido ubicuamente, pero los tejidos donde se expresa mayoritariamente son el intestino, el riñón y el corazón. Por ahora se conoce poco acerca de PPAR $\delta$ , pero se han descubierto relaciones importantes con algunos aspectos moleculares. Se ha demostrado que juega un papel importante en el catabolismo de lípidos y en la regulación del colesterol (Abbott et al., 2009; Girroir et al., 2008).

Por ejemplo, se ha observado que en monos Rhesus obesos de mediana edad resistentes a la insulina, el tratamiento con GW501516 (agonista de PPAR $\delta$ ) causó un aumento dramático dependiente de la dosis, en el colesterol HDL en plasma y una disminución en los niveles de triglicéridos, colesterol LDL e insulina en plasma (Oliver et al., 2001). Del mismo modo, el tratamiento con GW501516 aumentó el HDL en plasma y las concentraciones de apoA-I y apoA-II asociadas con HDL y aumentó el

tamaño de las partículas de HDL en los monos verdes africanos (Wallace et al., 2005). Varios estudios también demuestran que los PPAR $\beta/\delta$  regulan la transcripción de genes involucrados en el transporte de ácidos grasos, oxidación y termogénesis de tejido adiposo marrón o blanco (Mansour et al., 2014).

Los genes inducidos por la activación de PPAR $\delta$  en el tejido adiposo marrón que participan en la oxidación de ácidos grasos, incluyen: CPT1, ACOX y LCAD, así como aquellos que participan en la termogénesis y gasto de energía, como UCP1 y UCP3. En suma, PPAR $\delta$  regula la adiposidad al promover la oxidación de los ácidos grasos (Hansen et al., 2001). PPAR $\delta$  también se expresa en los hepatocitos, donde participa en la regulación de la glucosa hepática y el metabolismo de los lípidos. Además, se ha demostrado que el agonista PPAR $\delta$  GW501516 mejora la hiperglucemia al atenuar la producción de glucosa hepática (Lee et al., 2006).

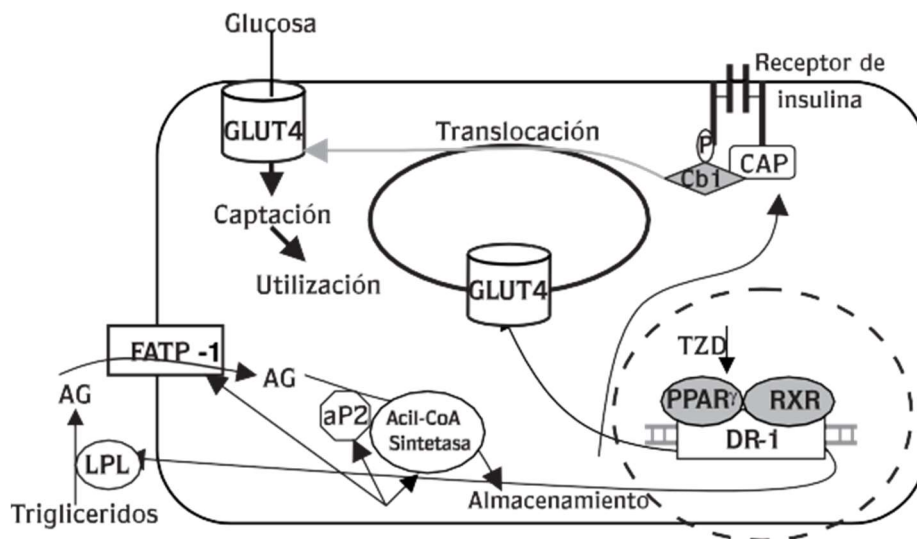
PPAR $\delta$  está involucrado en la regulación de los tipos de fibras del músculo esquelético y músculo cardíaco, el metabolismo de los lípidos, la utilización de combustible, la función mitocondrial y el rendimiento muscular. Varios genes clave implicados en la absorción de ácidos grasos, el transporte y la  $\beta$ - oxidación se han identificado como genes diana para PPAR $\delta$ . Dado esto, la modulación del metabolismo de los ácidos grasos se considera la función reguladora más importante de este PPAR (Ehrenborg et al., 2009).

### 1.5.2.3 PPAR $\gamma$

Su gen, conformado de nueve exones, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25). Existen al menos dos isoformas proteínicas distinguibles, PPAR $\gamma$ 1 con la más amplia expresión tisular y PPAR $\gamma$ 2, que se produce por empalme alternativo del ARNm, generando una proteína con 28 aminoácidos adicionales en la región NH<sub>2</sub> terminal. Los adipocitos presentan una alta expresión de este tipo de receptores, pero también se han encontrado en otros tejidos como en el músculo esquelético y cardíaco, hígado, riñón, intestino delgado, vejiga, bazo, las células del sistema inmune y la retina (Jay et al., 2007). Las TZD tienen efectos crónicos sobre la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos a través de la activación de los PPAR $\gamma$ , disminuyendo la resistencia a la insulina y restringiendo la gluconeogénesis hepática. Además, las TZD desvían la captación de ácidos grasos por el músculo esquelético hacia el tejido adiposo, donde aumenta la expresión de la LPL y FATP-1, reduciendo así los efectos dañinos de los ácidos grasos sobre las acciones de la insulina en el músculo (Rizos et al., 2016).

PPAR $\gamma$  está involucrado en el mantenimiento adecuado del nivel de expresión de las moléculas reguladoras del metabolismo de los carbohidratos y lípidos, así como de otras proteínas involucradas en los procesos de señalización desencadenados por la insulina, propiciando un estado de sensibilidad normal a esta hormona (Kintscher et al., 2005). Una de las proteínas involucradas en esta mejora es la proteína asociada a Cb1 (CAP), involucrada en la vía de señalización de la insulina, cuya expresión se aumenta por la estimulación de los PPAR $\gamma$  en los adipocitos. CAP es una proteína adaptadora con

dominios SH-3 que une Cb1 al receptor de la insulina y favorece su fosforilación. Una vez fosforilado, Cb1 inicia una vía de señalización esencial para el transporte de la glucosa. Otra de las proteínas cuya expresión se ve aumentada por la estimulación de los PPAR $\gamma$  con TZD y que está directamente involucrada en el transporte de glucosa es el GLUT-4, tanto en adipocitos como en músculo (Fig. 5) (Neels et al., 2014).



**Figura 5.** Mecanismos involucrados en el metabolismo de la glucosa mediado a través de la estimulación de PPAR $\gamma$ .

PPAR $\gamma$  se expresa altamente en adipocitos y es un regulador primario de la adipogénesis, un proceso por el cual los preadipocitos precursores se diferencian en adipocitos completamente maduros. Durante este proceso, los preadipocitos sufren una detención del crecimiento, inician la acumulación de lípidos (triglicéridos) y asumen las características morfológicas y bioquímicas de los adipocitos maduros, como procesos metabólicos sensibles a la insulina, incluida la lipogénesis, la lipólisis y el metabolismo de la glucosa (Cristancho et al., 2011).

PPAR $\gamma$  también participa en la regulación de la lipogénesis, la regulación de la sensibilidad a la insulina y la supervivencia y función de los adipocitos. La activación de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo conduce a la inducción de una serie de genes cuyos productos proteínicos median el catabolismo de triglicéridos celulares y la absorción de ácidos grasos, el transporte y el almacenamiento intracelular, la adipogénesis, la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos, así como el metabolismo de la glucosa (Lefterova et al., 2014).

## **1.6 Agonistas naturales y sintéticos para PPAR**

### **1.6.1 Agonistas para PPAR $\alpha$**

PPAR $\alpha$  es activado por ligandos naturales, que incluyen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y sus metabolitos como 8S-HETE y 8-HEPE, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), fosfolípidos oxidados y productos lipolíticos de lipoproteínas. Los agonistas sintéticos de PPAR $\alpha$ , WY-14643 y los fármacos de fibrato hipolipidémico (benzafibrato, ciprofibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo y ácido fenofíbrico) también son potentes activadores de PPAR $\alpha$ . Sin embargo, el uso de estos fármacos ha sido asociado con efectos adversos, como lesiones del páncreas, problemas cardíacos, tumor en hígado y edema (Azhar et al., 2011). La Tabla 3 enlista los agonistas naturales y sintéticos para PPAR $\alpha$ .



**Tabla 3.** Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\alpha$ .

| AGONISTAS ENDÓGENOS  | AGONISTAS SINTÉTICOS  |
|--|---|
| <p><b>Ácidos grasos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Palmítico</li> <li>• Estearico</li> <li>• Oléico</li> <li>• Petroselinico</li> <li>• Linoléico</li> <li>• <math>\alpha</math>-Linoléico</li> <li>• Ditolmo-<math>\gamma</math>-Linoléico</li> <li>• Araquidónico</li> <li>• Docohexanoico</li> <li>• Eicosapentanoico</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• GW7647</li> <li>• WY14643</li> <li>• Clofibrato</li> <li>• Fenofbrato</li> <li>• Benzafibrato</li> <li>• Ciprofibrato</li> <li>• Gemfibrocil</li> <li>• Carbaprostaciclina.</li> </ul> |
| <p><b>Eicosanoides:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• LTB4</li> <li>• 8-HEPE</li> <li>• 8-(R) HETE</li> <li>• 8-(S) HETE</li> <li>• 12-HETE</li> <li>• 9-(R/S)HODE</li> <li>• 20,8,9- HEET</li> <li>• 20,11,12 HEET</li> <li>• 20,14,15 HEET</li> <li>• 15d-PGI2</li> <li>• PGJ2</li> <li>• PGI2</li> <li>• PGB2</li> </ul>             |   |

### 1.6.2 Agonistas para PPAR $\delta$

Los agonistas a PPAR $\delta$  regulan positivamente la expresión de genes involucrados en el catabolismo de lípidos, lo que favorece la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, se han asociado 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 (Reilly et al., 2009).

A diferencia de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , que son objetivos terapéuticos para los fármacos antihiperlipidémicos (fibratos) y antidiabéticos (TZD), respectivamente,

PPAR $\beta/\delta$  no parece ser un objetivo de ningún fármaco disponible actualmente. Debido a la falta de disponibilidad de medicamentos dirigidos a PPAR $\delta$  junto con su amplia expresión en muchos tejidos y células, la función metabólica de PPAR $\beta/\delta$  es relativamente menos estudiada y entendida. Sin embargo, en los últimos años, la disponibilidad de potentes agonistas sintéticos PPAR $\delta$ , como GW0742, GW501516, L165041, GW1929 (Tabla 4), ha generado información valiosa, lo que implica que este PPAR participa en la regulación de la sensibilidad a la insulina, la adipogénesis, el metabolismo de los lípidos y la energía, la inflamación y la aterosclerosis (Wagner et al., 2010).

**Tabla 4.** Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\delta$ .

| AGONISTAS ENDÓGENOS  | AGONISTAS SINTÉTICOS   |
|--|--|
| <p><b>Ácidos grasos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Palmítico</li> <li>• Esteárico</li> <li>• Oléico</li> <li>• Linoléico</li> <li>• <math>\gamma</math>-Linoléico</li> <li>• Ditomo-<math>\gamma</math>-Linoléico.</li> <li>• Araquidónico</li> <li>• Docohexanoico</li> <li>• Eicosapentanoico</li> <li>• C6-C8</li> <li>• Palmitoleico</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• L165041</li> <li>• GW501516</li> <li>• GW0742</li> <li>• GW1929</li> <li>• CER-002</li> <li>• HPP593</li> <li>• MBX-8025</li> <li>• Carbaprostaciclina</li> </ul> |
| <p><b>Eicosanoides:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15d-PGI<sub>2</sub></li> <li>• PGJ<sub>2</sub></li> <li>• PGI<sub>2</sub></li> <li>• PGB<sub>2</sub></li> </ul>   |  |

### 1.6.3 Agonistas para PPAR $\gamma$

Las dos drogas de la clase TZD, rosiglitazona y pioglitazona, que funcionan como potentes y selectivos agonistas completos de PPAR $\gamma$ , no solamente son medicamentos antidiabéticos altamente efectivos, sino que también han ayudado enormemente a comprender los mecanismos subyacentes por los cuales los PPAR $\gamma$  contribuye a la regulación de la adipogénesis, la homeostasis de los lípidos y la glucosa y otros procesos fisiopatológicos. En humanos, la pioglitazona y la rosiglitazona funcionan como sensibilizadores de la insulina y, por lo tanto, mejoran la acción de esta hormona y la hiperglucemia en pacientes con DM2 (Kahn et al., 2000).

Del mismo modo, se ha demostrado que varios agonistas de PPAR $\gamma$  reducen eficazmente los niveles elevados de ácidos grasos libres en plasma, mejoran la acumulación excesiva de lípidos en tejidos periféricos como el hígado, el músculo esquelético y el corazón; la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina, modulan la expresión de adipocinas (leptina y adiponectina) y citocinas inflamatorias que afectan el metabolismo hepático, muscular y la sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo (Tontonoz et al., 2008). Además de atenuar la hiperglucemia y mejorar la acción de la insulina, el tratamiento con pioglitazona o rosiglitazona de pacientes con DM2 se asocia con mejoras significativas en los triglicéridos plasmáticos, HDL y la concentración de colesterol LDL (America et al., 2005). La Tabla 5 enlista los agonistas que se han identificado para esta isoforma.

**Tabla 5.** Agonistas naturales y sintéticos que activan a PPAR $\gamma$ .

| AGONISTAS ENDÓGENOS  | AGONISTAS SINTÉTICOS  |
|--|---|
| <p><b>Ácidos grasos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Palmítico</li> <li>• Euríco</li> <li>• Petroselinico</li> <li>• Oléico</li> <li>• Linoléico</li> <li>• <math>\alpha</math>-Linoléico</li> <li>• <math>\gamma</math>-Linoléico</li> <li>• Laurico</li> <li>• Araquidónico</li> <li>• Docohexanoico</li> <li>• Eicosapentanoico</li> <li>• Palmitoleico</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rosiglitazona</li> <li>• Pioglitazona</li> <li>• Troglitazona</li> <li>• CDDO</li> <li>• GW1929</li> <li>• Indometacina</li> <li>• Fenoprofeno</li> <li>• Ibuprofeno</li> <li>• Ácido flufenámico</li> </ul> |
| <p><b>Eicosanoides:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8-(R) HETE</li> <li>• 8-(S) HETE</li> <li>• 15-HETE</li> <li>• 9-(R/S)HODE</li> <li>• 13-(R/S)HODE</li> <li>• 9-OXO-HODE</li> <li>• 13-OXO-HODE</li> <li>• PGJ2</li> <li>• PGI2</li> <li>• PGB2</li> </ul>  |   |

#### 1.6.4 Agonistas duales y Pan para PPAR

La característica particular de los agonistas duales es el activar al menos 2 formas de PPAR, mientras que los agonistas Pan activan las 3 isoformas de PPAR. Sin embargo, al ser de origen sintético, estas moléculas han presentado diversos efectos secundarios, tales como fibrosarcoma en tejido adiposo, ganancia de peso, edema, entre otros. La Tabla 6 enlista los agonistas duales y Pan que se conocen hasta el momento (Wright et al., 2014).

**Tabla 6.** Agonistas duales y Pan que activan a los PPARs.

| AGONISTAS DUALES PARA PPARs  | AGONISTAS Pan PARA PPARs   |
|--|--|
| <p><b>PPAR<math>\alpha</math>/<math>\delta</math>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• GFT505</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chiglitazar</li> <li>• Netoglitazar</li> <li>• Sodeglitazar</li> <li>• Indeglitazar</li> <li>• Sipoglitazar.</li> </ul> |
| <p><b>PPAR<math>\alpha</math>/<math>\gamma</math>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muraglitazar</li> <li>• Tesaglitazar</li> <li>• Flaglitazar</li> <li>• Ragaglitazar</li> <li>• Naveglitazar</li> <li>• Imiglitazar</li> <li>• Saroglitazar</li> <li>• Aleglitazar</li> </ul> |  |

## 1.7 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR

A pesar de los numerosos fármacos sintéticos que existen en el mercado para el tratamiento de la DM2, la mayoría de ellos únicamente disminuyen la hiperglucemia de forma temporal y sus efectos secundarios pueden llegar a ocasionar graves problemas de salud, como complicaciones hepáticas, aumento de peso y, por consecuencia, obesidad, que a largo plazo generará DM2. Por tal motivo, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de moléculas de origen vegetal agonistas de PPAR que además de tener efectos sobre el metabolismo de la glucosa, ejerzan efectos sobre el metabolismo de lípidos y, sucesivamente, mejoren otras condiciones características de la enfermedad, como el daño endotelial y la inflamación.

### **1.7.1 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\alpha$**

La cianidina extraída de *Hibiscus sabdariffa* en células HepG2 y en un modelo de luciferasa incrementó la expresión y la transferencia de PPAR $\alpha$ , por lo que disminuyó la acumulación de lípidos en los hepatocitos (Jia et al., 2013). A su vez, la monacina y la anklfavina extraídas de *Monascus purpureus* en el mismo modelo celular incrementaron la expresión de PPAR $\alpha$ , CPT1, SREBP-1C, inhibiendo la adipogénesis y la esteatohepatitis en ratones con dieta alta en grasa (Hsu et al., 2014).

### **1.7.2 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\delta$**

Se ha demostrado que los ácidos grasos omega 3 (EPA, DHA) contribuyen a la disminución de triglicéridos y colesterol en un modelo de hígado graso de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en fructosa, debido al incremento en la expresión del RNAm de PPAR $\delta$  (Jean et al., 2013).

### **1.7.3 Compuestos de origen vegetal como agonistas a PPAR $\gamma$**

En el tejido adiposo visceral y músculo abdominal de ratas macho Sprague Dawley, se demostró que el ácido glicirrizico disminuye glucemia e insulinemia al incrementarse la expresión del RNAm de PPAR $\gamma$  y LPL (Yin, Ha, and Kadir, 2010). Por otra parte, el foenumosido obtenido de *Lysimachia foenum graecum* disminuyó la expresión del RNAm de PPAR $\gamma$ , aP2, CD36, C/EBP $\alpha$  y, por lo tanto, inhibió la adipogénesis y acumulación de lípidos (Kwak et al., 2016). Además, el alcohol dihidroconiferilo, la pseudoprotodiocsina, el ácido tánico y el fucosterol inhibieron la

adipogénesis, la acumulación de lípidos en un modelo de células 3T3-L1, además de disminuir los triglicéridos, el colesterol y los ácidos grasos esterificados en ratones CD1 obesos (Lee et al., 2012).

#### **1.7.4 Compuestos de origen vegetal como agonistas duales y Pan a PPAR**

El ácido sargaquinóico e hidrosargaquinóico tienen un efecto dual sobre PPAR $\alpha$ / $\gamma$  en células 3T3-L1, mostrando un efecto antihiper glucemiante y antidiabético (Kim et al., 2008). Por otra parte, el pluviatilol y epipinoresinol muestran un efecto dual sobre PPAR $\delta$ / $\gamma$ , lo que conlleva a un efecto antiinflamatorio y antidiabético en un modelo de hepatocitos HepG2 (Hong et al., 2012). Se ha demostrado que  $\gamma$ -mangostina y el vaticanol C tienen un efecto dual sobre PPAR $\alpha$ / $\delta$ , lo que contribuye a la disminución de la glucosa y los lípidos en un modelo de células COS-1 y células endoteliales arteriales de bovino transfectadas con pPPAR ( $\alpha$  y  $\delta$ ) y PPARE-luc y GS-hPPAR $\alpha$ , respectivamente (Atsuura et al., 2013; Tsukamoto et al., 2010).

Como agonistas Pan para las tres isoformas de estos factores nucleares se ha encontrado que los compuestos resveratrol, piperitol, p-ment-3-ene1, 2, 8- triol, (1'R,2'R)-4-O- metilguaiacil glicerol y el N-isobutil-2E,4E,8Z- decatrienamida tienen un incremento en la expresión de estos factores de transcripción, lo que conlleva a un efecto antidiabético en células HepG2 (Tsukamoto et al., 2010; Hong et al., 2012). En la actualidad se ha intensificado la búsqueda de moléculas más selectivas dirigidas a la activación dual de PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , que además tengan un efecto multimodal sobre los reguladores metabólicos de la glucosa y los lípidos.

## 1.8 Compuestos triterpénicos.

Aunque en los últimos años ha existido un enorme progreso en el desarrollo de nuevos fármacos, el reino vegetal continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales (10,000 de las 300,000 especies de plantas superiores identificadas) que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones, aunque hasta el momento su investigación no ha sido completa (Chappell et al., 2002).

Los isoprenoides, más comúnmente denominados terpenos, son un grupo de metabolitos funcionales con gran variedad en su estructura, además de ser considerados componentes esenciales de la dieta humana. Son sintetizados en un gran número de organismos, aunque son especialmente abundantes y diversos en plantas, con más de 25,000 compuestos reportados hasta el día de hoy, muchos de los cuales se han asociado con actividad farmacológica (Goodwin et al., 2015). Los metabolitos secundarios con un origen terpénico tienen gran importancia, ya que pueden ser los componentes activos responsables de las plantas medicinales. Sin embargo, debido a las propiedades fisicoquímicas que muchos terpenos presentan, su identificación suele ser un proceso complejo.

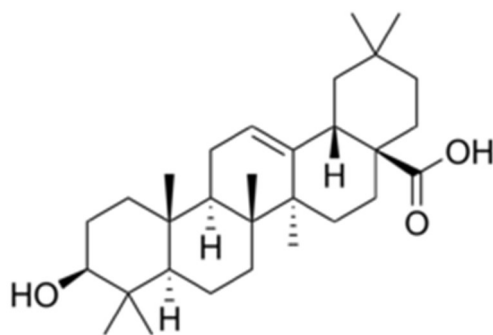
En la última década se han descubierto más de 80 compuestos triterpénicos, los cuales están distribuidos de manera ubicua a través de todo el reino vegetal, particularmente en algunas plantas medicinales. En años recientes se ha incrementado el interés de elucidar el rol biológico de los triterpenos, los cuales se han



atribuido con diversas propiedades biológicas y farmacológicas. Ejemplos de estas moléculas activas son el ácido oleanólico y el ácido ursólico.

### 1.8.1 Ácido Oleanólico

El ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ hidroxiolean-12-en-28-oico) es un compuesto biológicamente activo aislado en más de 1620 especies de plantas, incluyendo plantas de uso alimenticio y hierbas medicinales. Este compuesto es prevalente en plantas de la familia Oleaceae, como el olivo (*Olea europea*) (Shanmugam et al., 2014). El ácido oleanólico AO es un componente minoritario, pentacíclico, cuya estructura consta de 30 átomos de carbono provenientes de la condensación “cabeza-cola” de seis unidades de isopreno (Fig. 10) (Pollier et al., 2012). Puede obtenerse en grandes concentraciones del subproducto del aceite virgen. Se sabe que en el aceite virgen la concentración del AO es aproximadamente 56 mg/kg, mientras que en el aceite de orujo podemos encontrar hasta 416 mg/kg de AO (Simonsen et al., 2009).



**Figura 6.** Estructura molecular del ácido oleanólico.

### 1.8.2 Ácido Ursólico

El ácido ursólico (AU), conocido como urson, prunol, micromerol y malol (ácido (3 $\beta$ )-3-hidroxi-urs12-en-28-oico), es una saponina triterpénica pentacíclica que puede aparecer en forma de aglicona o de ácido libre (Fig.7). Ha sido aislado de numerosas especies con diversos orígenes filogenéticos, formando parte de la cera que recubre frutos y hojas. Entre las familias en las que ha sido reportada su presencia está la familia *Solanaceae*; de ella se han estudiado dos especies del género *Cestrum*: *C. parqui* L. y *C. diurnum* L. (Somova et al., 2004)

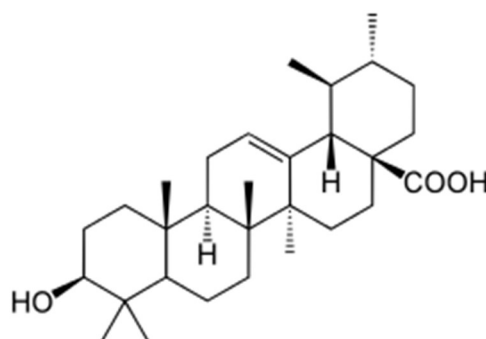


Figura 7. Estructura molecular del ácido ursólico.

### 1.9 Músculo esquelético y tejido adiposo como modelos de estudio.

El músculo esquelético es un tejido dependiente de insulina que 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. En el músculo esquelético se expresan PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , así como los genes regulados por estos factores nucleares, que en obesidad y DT2 se encuentran

disminuidos. Por lo tanto, el músculo es un tejido clave en el metabolismo y la resistencia a la insulina (Loviscach et al., 2000). En condiciones normales mantiene un equilibrio energético en la activación constante de PPAR, favoreciendo la absorción de glucosa y la oxidación de lípidos (Kintscher et al., 2005). En este contexto, la línea celular C2C12 (mioblastos) representa una herramienta esencial para comprender los efectos metabólicos del OA y del AU.

El tejido adiposo también participa en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos, es sensible a la acción de 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 $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Reyes et al., 2012). El tejido adiposo 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 (Clavijo et al., 2007). 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 (Manzur et al., 2010). Así, la línea celular 3T3-L1 (adipocitos maduros) representa un buen modelo de estudio para conocer los efectos del OA y del AU.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Propiedades Farmacológicas del AO y el AU.

El AO y el AU se han atribuido con diferentes efectos farmacológicos sobre la hiperglucemia, la funcionalidad y la integridad de la célula  $\beta$ - pancreática, la respuesta de la insulina, la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1-B (PTB-1B), la activación de las cascadas de señalización PI3K/Akt, LKB1/AMPK, inhibición de la enzima GSK3 $\beta$ ; así como efectos hipolipidémicos y activación de PPARs (Castellano et al., 2013).

En el 2007, Ortiz y colaboradores observaron que el AO inhibe la  $\alpha$ -glucosidasa, una enzima que permite la absorción de los carbohidratos en el intestino delgado. Esta inhibición permite un mejor control de la hiperglucemia posprandial y origina, a largo plazo, reducción de la hemoglobina glicada (Ortiz et al., 2007). El AO también inhibe la actividad de la  $\alpha$ -amilasa salival y pancreática, así como una disminución de glucosa en sangre (23%) después de 30 minutos de tratamiento (1 mg/kg), produciendo un efecto hipoglucémico en individuos con prediabetes (Omaki et al., 2003). Efectos similares se han observado con el AU, bloqueando a la enzima  $\alpha$ -amilasa, por lo que se ha sugerido que la inhibición de esta enzima se debe a la característica de la estructura de estos triterpenos (Ali et al., 2006).

En la DM2, las células  $\beta$ -pancreáticas fallan al liberar la cantidad suficiente de insulina para compensar la hiperglucemia. Este defecto involucra diversas alteraciones morfológicas y funcionales de la célula  $\beta$ -pancreática. Datos acumulados indican que

el AO incrementa la biosíntesis y secreción de la insulina y mejora la tolerancia a la glucosa a través de múltiples mecanismos. Por ejemplo, la inyección intraperitoneal de AO en ratas Wistar, reduce la glucemia en ayunas mientras incrementa la insulina en plasma (Hsu et al., 2006).

Por otro lado, se ha observado que el AO y el AU promueven la sobrevivencia de islotes pancreáticos trasplantados a ratones diabéticos inducidos con STZ, a través de la inhibición de la producción de citocinas por macrófagos y células presentadoras de antígeno. En el caso del AO, disminuye a IP-10 e IL-4 en suero de ratas. El AU también preserva la funcionalidad de la célula  $\beta$  en ratones diabéticos (Nataraju et al., 2009). Se han realizado diversos estudios sobre la inhibición de la enzima PTP-1B, que es una proteína que regula negativamente al receptor de insulina y a la leptina. En 2014, Ramírez y colaboradores sintetizaron algunos derivados del AO y del AU, y observaron que tienen una potente actividad inhibitoria sobre esta enzima. También observaron una disminución significativa de glucosa en sangre *in vivo* (Ramirez et al., 2014).

Los efectos hipolipidémicos del AO y del AU han sido estudiados desde la década de los 90's. En ratas Sprague-Dawley, con una dieta alta en colesterol, el AO redujo las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL en plasma. Por otra parte, regula la expresión de genes lipogénicos (ACC, SCD2, Gpam y ACAT) (Unoki et al., 2008). Además, el AO redujo significativamente los niveles de grasa visceral en ratones Swiss, junto con un incremento de leptina y una disminución de los lípidos y grelina en plasma. Los estudios histológicos del hígado indicaron que estos

triterpenos reducen marcadamente la esteatosis microvesicular y las gotas lipídicas causadas por la dieta (de Melo et al., 2010)

Diferentes rutas de señalización están involucradas en la regulación de las concentraciones de glucosa en sangre; entre ellas se encuentran PI3K/AKT y LKB1/AMPK. Ambas rutas de señalización participan en muchos procesos metabólicos, incluyendo el consumo de glucosa, la oxidación de los ácidos grasos en el músculo y tejido adiposo, así como la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis en el hígado. Se ha observado que la administración del AO y el AU pueden incrementar la actividad de estas rutas de señalización en ratones diabéticos (Zeng et al., 2012; Thi et al., 2009). La enzima GSK3 $\beta$  actúa como un regulador negativo de la señalización de la insulina. Tanto el AO como el AU inhiben a esta enzima por fosforilación (Azevedo et al., 2010).

Los PPAR son reguladores transcripcionales de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y la homeostasis de la glucosa. Evidencia acumulada indica que el AO puede modular la actividad de PPAR. Por ejemplo, se ha observado que el AO actúa como un agonista de PPAR- $\alpha$ , mejorando el metabolismo de lípidos cardíacos en ratas diabéticas ZDF (Huang et al., 2005). Así mismo, la activación de PPAR $\gamma$  por el AO produjo un efecto antihiper glucémico en ratones diabéticos KKA (Kuroda et al., 2012).

Por tal motivo, en los últimos años se ha incrementado el estudio de moléculas de origen vegetal con la finalidad de encontrar posibles fitomedicamentos que regulen

el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En este sentido los ácidos pentacíclicos como el AO y el AU, han sido objeto de estudio en diversos trabajos, reportando actividad antidiabética importante, e incluso se ha evaluado el efecto de estos ácidos sobre blancos moleculares como la PTP1B, proteína esencial en la señalización de la insulina (Castellano et al., 2013). Sin embargo, aún se desconoce el efecto de estos ácidos sobre los PPAR, los cuales han sido considerados blancos terapéuticos importantes debido a su influencia sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Así mismo, se han propuesto modificaciones estructurales en dichas moléculas, con la finalidad de generar compuestos más estables y favorecer los diversos procesos farmacocinéticos. La posible participación de estos compuestos sobre uno de los tejidos mayoritariamente afectados por la presencia de resistencia a la insulina como lo es el músculo esquelético brindaría nuevos datos sobre su intervención en la activación de moléculas clave que regulan el metabolismo de lípidos y carbohidratos como lo son PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , así como de sus genes que estos factores de transcripción regulan.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Una alimentación elevada en grasas y carbohidratos, además de una vida sedentaria y factores genéticos, pueden conducir a un desbalance entre el metabolismo de lípidos y carbohidratos, lo cual es una condición que caracteriza a la obesidad y que puede promover el desarrollo de DM2. La incidencia de DM2, tanto a nivel mundial como en nuestro país, se ha elevado drásticamente en los últimos años. Los fármacos utilizados para dicha enfermedad sólo la controlan temporalmente y los

efectos adversos son demasiados. Las plantas medicinales con propiedades antihiperglucemiantes e hipolipemiantes representan un buen campo de investigación para el desarrollo de fármacos que puedan utilizarse en el control de la DM2, con la posibilidad de producir menos efectos secundarios que los medicamentos actuales.

El descubrimiento del papel que juegan los PPAR en el restablecimiento de la sensibilidad a la insulina ha abierto una nueva perspectiva en el tratamiento de los pacientes con DM2 y otras patologías relacionadas. Aún cuando se han realizado diversos estudios tanto con el AO y el AU en donde se observan modificaciones en los niveles de glucosa en sangre, efectos antidiabéticos e hipolipidémicos, se desconoce si estos triterpenos tienen una participación directa sobre los PPAR que participan directamente en la homeostasis de la glucosa y lípidos.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados poseen actividad antidiabética debido a la activación de PPAR?

#### **5. HIPÓTESIS**

La actividad antidiabética de los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados puede estar mediada por la activación de PPAR en tejidos sensibles a la insulina, debido a la participación de estos compuestos en la regulación de los niveles de glucosa y lípidos.



## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados sobre la activación de los PPAR en tejidos sensibles a la insulina.

## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el efecto de los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados sobre la expresión del RNAm y la proteína de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en las líneas celulares C2C12 y 3T3-L1.
2. Evaluar el efecto de los ácidos ursólico, oleanólico y sus derivados metilados sobre GLUT-4 y FATP-1, sobre la translocación de GLUT-4 en mioblastos y sobre el almacenamiento de lípidos en adipocitos.
3. Evaluar el efecto de los ácidos ursólico y oleanólico sobre parámetros bioquímicos en un modelo de obesidad inducida con dieta de cafetería.

## **8. MATERIAL Y MÉTODO**

### **8.1 Compuestos químicos**

El ácido oleanólico (AO), el ácido ursólico (AU), la pioglitazona, el fenofibrato, el clorhidrato de 3-amino-7-dimetil-2 metilfenazina y el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Los derivados metilados fueron semisintetizados y caracterizados en estudios previos (Guzmán et al., 2018; Ramírez et al., 2014).

## **8.2 Cultivo de adipocitos 3T3-L1**

Los adipocitos fueron diferenciados a partir de fibroblastos precursores (preadipocitos). Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón fueron cultivados a confluencia a 37°C, con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de seis pozos con medio DMEM (Dulbecco's Modied Eagle's Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) (9 X 10<sup>4</sup> células por placa), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), aminoácidos no esenciales (0.1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), gentamicina 10µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB: fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA) (Cave et al., 2018). Después de dos días a confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos fue inducida con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), dexametasona (DX, 0.25 µM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e insulina humana (0.8 µM) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día se cambió el medio de cultivo adicionando insulina y se mantuvo por dos días más (Clavijo et al., 2007); Fève 2005). Durante toda la diferenciación se cambió el medio cada 2 días. Las células fueron usadas para experimentos posteriores al día 8 de diferenciación, al cual más del 95% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, presentando una forma circular con depósitos de grasa en forma de pequeñas esferas (Contreras et al., 2018).

## **8.3 Cultivo de mioblastos C2C12**

Los mioblastos de la línea celular C2C12 fueron cultivados a confluencia a 37°C, con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en placas de seis pozos con medio DMEM (Medio Dulbecco's Modied Eagle's, Gibco, Grand Island, NY, USA) (9 X 10<sup>4</sup> células por placa),

piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), aminoácidos no esenciales (0.1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), gentamicina 10µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), complementado con 10% de SFB (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cuando las células llegaron a confluencia fueron utilizadas en los experimentos (Ahmadipour et al., 2013); Venkatesan et al., 2015).

#### **8.4 Prueba de funcionalidad celular (Rojo neutro)**

La funcionalidad celular se llevó a cabo usando la prueba de rojo neutro. Células en cultivo fueron tratadas con los diferentes compuestos a concentraciones de 1,5, 10,20, 30 y 50 µM durante 48 h. Posterior a los tratamientos, se añadió la solución de rojo neutro en cada muestra y se incubó por 3 h a 37°C (Repetto et al., Zurita, 2008). La solución de rojo neutro fue removida y se realizaron lavados con una mezcla de CaCl<sub>2</sub> 1%/ Formaldehído al 0.05%. Posteriormente se añadió una solución de ácido acético 1%/etanol 50%. La cantidad de rojo neutro liberado por los lisosomas de las células viables se midió a una absorbancia de 540 nm (Borenfreund et al., 1985; Gomez et al., 2017).

#### **8.5 Condiciones experimentales**

Se usaron cultivos de células musculares C2C12 y adipocitos 3T3-L1. Las células control sólo recibieron medio de cultivo, el cual se reemplazó cada 2 días. La pioglitazona (5 µM, agonista de PPAR $\gamma$ ) y el fenofibrato (5 µM, agonista de PPAR $\alpha$ ) se usaron como controles positivos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, E. U.) (Giacoman et al., 2019). Los resultados de funcionalidad permitieron establecer las concentraciones

óptimas del AO y del AU para realizar los experimentos (10  $\mu$ M). El control recibió DMSO (Sigma-Aldrich), cuya concentración final fue  $\leq 0.2\%$ . Después de una cinética de expresión de PPAR $\gamma$ , el mejor tiempo de incubación para el análisis de expresión del ARN mensajero (ARNm) fue de 15 min, mientras que el mejor tiempo de incubación para el análisis de proteína fue de 2 h.

## **8.6 Extracción y cuantificación del RNAm**

Posterior a los tratamientos, se realizó la extracción del RNA total de las células C2C12 y 3T3-L1 mediante el método de TRIzol (Invitrogen, Los Angeles, CA, USA) de la siguiente manera: Se eliminó el medio de los pozos, se agregaron 500  $\mu$ L de TRIzol, basado 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. 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; se agitó vigorosamente por 20 seg y se dejó reposar 20 min a 4°C. Después del tiempo de incubación, se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C, lo que permitió la formación de 3 fases: una superior transparente que contiene el RNA, una interfase y la fase inferior roja con el ADN y proteínas; se aisló la fase superior y se colocó en un tubo nuevo. El RNAm fue precipitado con 500  $\mu$ L de isopropanol por cada mL de TRIzol; se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet. Se agregó 1 mL de etanol al 70% por cada mL de TRIzol para realizar el lavado del pellet. Se resuspendió el pellet con agitación

(vórtex) y se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C. Se retiró el etanol y se dejó evaporar los residuos a temperatura ambiente. Por último, el RNA se resuspendió en 40 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 (Thermo Scientific) (Chomczynski et al., 1993).

### 8.6.1 Retrotranscripción y q-PCR

La retrotranscripción (RT) se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa (ImProm II de Promega, Madison, WI, USA) a partir de una concentración de 2 µg de RNA (templado); se utilizaron primers al azar (random primers 0.5 µg/µL). El (cDNA) se amplificó con la tecnología SYBR Green (Thermo Scientific, Waltham, MA EE. UU.), utilizando primers para los genes PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , FATP-1, GLUT-4, ACSL y AdipoQ, con 36B4 como gen de referencia (Fig. 12). El proceso empleó el sistema rotor-gen (Qiagen, Hilden, Alemania), que mide continuamente los productos de amplificación por PCR en cada ciclo (Hidalgo et al., 2017). 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. Los cambios relativos en el nivel de expresión de un gen específico ( $\Delta\Delta^{Ct}$ ) se calcularon como muestra de  $\Delta^{Ct}$  menos la referencia de  $\Delta^{Ct}$  y luego se presentaron como  $2^{-\Delta\Delta^{Ct}}$  (Giacoman et al., 2019; Fortis et al., 2019).

**Figura 8.** Secuencias de primers utilizados para q-PCR.

| Gene                           | Primer (5'-3')               | Gene Bank  |
|--------------------------------|------------------------------|------------|
| <b>PPAR<math>\alpha</math></b> | F: ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC     | NM011144.6 |
|                                | R: GGCCTTGACCTTTGTTGATGT     |            |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | F: CCAGAGTCTGCTGATCTGCG      | NM011146.1 |
|                                | R: GCCACCTCTTTGCTCTGCCTC     |            |
| <b>FATP-1</b>                  | F: ACCAGTGTCCAGGGGTACAG      | NM011977.3 |
|                                | R: TGTCTCCCAGCTGACATGAG      |            |
| <b>GLUT-4</b>                  | F: GATTCTGCTGCCCTTCTGTC      | NM009204.2 |
|                                | R: ATTGGACGCTCTCTCCCAA       |            |
| <b>ACSL</b>                    | F: ACCAGTGTCCAGGGGTACAG      | NM007981.4 |
|                                | R: TGTCTCCCAGCTGACATGAG      |            |
| <b>AdipoQ</b>                  | F: GGCTCTGTGCTCCTCCATCT      | NM009605.4 |
|                                | R: AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG |            |
| <b>36B4</b>                    | F: AAGCGCGTCCTGGCATTGCTC     | NM007475.5 |
|                                | R: CCGCAGGGGCAGCAGTGGT       |            |

## 8.7 Extracción y cuantificación de proteína citosólica

Una vez obtenida la confluencia en las células, se aplicaron los tratamientos con cada uno de los compuestos (AO, AU, AO/M) durante 2 h de incubación. Posterior a cada uno de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 2 mL de PBS frío; al término del lavado se agregó 1.5 mL de PBS frío y se retiraron las células con gendarme. Las cuales se depositaron en un tubo Eppendorf de 2 mL. Las células se centrifugaron a 800 g por 10 min a 4°C. Después de la centrifugación, se retiró el PBS y las células se sometieron a un choque térmico mediante nitrógeno líquido, con la finalidad de lisar las células. Una vez lisadas, se agregaron 100  $\mu$ L de solución hipotónica A (H<sub>2</sub>O, HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 1

mM, PMSF y COMPLETE) y se homogenizaron por pipeteo para llevar a cabo un choque osmótico. Rotas las membranas, las células se centrifugaron a 800 g por 10 min a 4°C; transcurrido el tiempo, se retiró el sobrenadante con las proteínas citoplasmáticas y se colocó en un tubo nuevo para determinar la presencia de PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , GLUT-4 y FATP-1 en el citoplasma. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford y los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento (Ismail et al., 1976).

## 8.8 Western Blot

Para cada ensayo se utilizaron 80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de los extractos de proteínas citoplasmáticas en buffer de carga (azul de bromofenol 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% v/v), incubando a 90°C por 5 min. Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 10% con SDS durante 125 Volts/ 100 min y se transfirió a una membrana PVDF (BIO-RAD, Irvine, CA, USA) a 25 Volts/10 min en un sistema de transferencia (Transblot Turbo).

Posterior a la transferencia, la membrana fue bloqueada con 2 g de leche diluidos en 50 mL de buffer TBS durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la membrana fue incubada con anticuerpos (PPAR $\gamma$ : Cat. 81B8; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; PPAR $\alpha$ : Cat. PA1-822A Invitrogen, Los Angeles, CA, USA; GLUT4: Cat. 53566 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, o FATP-1: Cat. PA5-2 7137, Invitrogen, Los Angeles, CA, USA, IRS-1: Cat.44-816G, Invitrogen, Los Angeles, CA, USA) diluidos en TBS 1X, respectivamente, por 24 h en frío y agitación constante. Después de la incubación, la membrana fue lavada con TBS 1X/ Tween 20

(6 lavados/5 min), y nuevamente se incubó con un anticuerpo secundario (Anti-conejo: Cat. GTX213110-01; GeneTex, Irvine, CA, USA; Anti-ratón: Cat. 2005; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ambos acoplados a peroxidasa, durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la membrana fue lavada con TBS 1X/ Tween 20 (8 lavados/5 min). Al término de los lavados se agregó una mezcla de solución reveladora. La membrana se colocó en el fotodocumentador, con una exposición de 6 min para su revelado. El programa utilizado fue Image Studio Digits (Contreras et al., 2018).

### **8.9 Inmunodetección de GLUT4 por microscopia confocal**

Las células musculares C2C12 se cultivaron utilizando el sistema Chamber Slide (Lab-Tek II, Thermo-Fisher, MA, EE. UU.). Las células fueron colocadas en cajas de 8 pozos y se incubaron con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y pioglitazona (5  $\mu$ M como control positivo) durante 15, 30 y 60 min. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS-Tween 0.5%. Una vez lavadas, las células se fijaron con formaldehído al 60% durante 15 min y transcurrido el tiempo fueron nuevamente lavadas con PBS-Tween 0.5%; se colocó el anticuerpo primario para GLUT-4 (Santa Cruz Biotechnology, TX, EU) durante 24 h a 4°C. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con PBS-Tween 0.5% y se colocó el anticuerpo secundario (anti-conejo-rodamina; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó un ensamblaje de PBS/ glicerol/ DAPI (polifosfato inorgánico por 4', 6-diamidino-2-fenil-indol) (1:2000) para teñir el núcleo. Los cubreobjetos con la muestra se colocaron en una platina de microscopio y se tomaron imágenes usando



el microscopio confocal Zen-Sp1 ZEISS laser). Se seleccionaron las regiones de interés en el citoplasma y se midió la intensidad promedio de píxeles (Miranda et al., 2016).

### **8.9.1 Acumulación de lípidos por Rojo Oleoso**

Para evaluar la acumulación de lípidos se utilizaron adipocitos 3T3-L1 maduros, los cuales fueron tratados con AO, AU y AO/M (10  $\mu$ M), así como pioglitazona y fenofibrato (5  $\mu$ M, como controles positivos) por un periodo de 72 h (el medio de cultivo con el tratamiento se cambió a las 24, 48 y 72 h). 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 al 4% de Nonidet P-40 y evaluado por espectrometría a 510 nm. Los datos fueron normalizados con el control para determinar la acumulación de lípidos (Garcia et al., 2008; Yang et al., 2020).

## **9. Estudios *in vivo***

### **9.1 Modelo de estudio de obesidad**

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1, de 4 semanas de edad, con un peso aproximado de 25 g, los cuales se obtuvieron del bioterio de la UAM-I. Los

animales se mantuvieron a temperatura de cuarto (25 °C), con 45-65% humedad, bajo condiciones luz/obscuridad de 12 h de luz blanca por 12 h de obscuridad. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999 (NOM-062-ZOO1999, revisada en 2001, México).

## 9.2 Estandarización de la dieta de cafetería

Para llevar a cabo el modelo de estudio, se utilizó una dieta conocida como dieta de cafetería (DCAF), la cual consiste en una dieta hipercalórica a base de comida rica en grasa y carbohidratos. A continuación, se enlistan los productos utilizados y las cantidades para la obtención del modelo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Productos utilizados para la dieta DCAF. Contenido calórico en porcentaje de grasa y carbohidratos.

| GRUPO CONTROL  |                          | GRUPO EXPERIMENTAL  |         |         |
|--|--------------------------|---|---------|---------|
| ❖ Administración de dieta estándar, agua <i>at libitum</i> . |                          | ❖ Dieta hipercalórica por 4 meses<br>❖ Agua <i>at libitum</i> . |         |         |
| ALIMENTO PROPORCIONADO                                       | CANTIDAD (n=5 por grupo) | KCAL TOTALES  | % GRASA | % CARBO |
| Dieta estándar   | 120 gr                   | 488.4   | 13.496  | 57.996  |
| Galletas dulces  | 30 gr                    | 189   | 50      | 50      |
| Botana de queso  | 15 gr                    | 78.5  | 100     | 0       |
| Galletas saladas   | 15 gr                    | 31.5  | 50      | 50      |

### 9.3 Grupos de estudio

Todos los grupos de estudio se conformaron por cinco animales, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999. Los grupos de estudio fueron los siguientes:

#### Grupo control

Los ratones (Grupo 1) se mantuvieron con dieta estándar (DE, BDL-7100, Bio-dieta Lab, México) y agua *at libitum* durante 4 meses.

#### Grupo control positivo y experimental

Los grupos control positivo y experimental (Grupo 2-5) se mantuvieron con Dieta estándar y dieta DCAF (DE + DCAF) y agua *at libitum* durante 4 meses.

### 9.4 Tratamientos

Al concluir con la dieta DCAF y la DE (tres meses de tratamiento) se realizó la administración de los compuestos AO, AU y AO/M y de fenofibrato y pioglitazona durante 20 días bajo las siguientes concentraciones:

- **AO, AU:** Se administraron 50 mg/kg, ajustado al peso de cada uno de los ratones.
- **PIOGLITAZONA:** Se administraron 20 mg/kg, ajustado al peso de cada uno de los ratones.
- **FENOFIBRATO:** Se administraron 50 mg/kg, ajustado al peso de cada uno de los ratones.

Todos los compuestos fueron disueltos en Tween 80 al 10%. El grupo control fue administrado con solución salina y Tween 80 al 10%. Al término de la administración de los tratamientos se realizaron las siguientes curvas:

### **9.5 Prueba de tolerancia a la glucosa**

Después de 20 días de tratamiento con los compuestos, todos los grupos se dejaron en ayuno durante 12 h; posteriormente se midió la glucosa inicial (tiempo 0) y se administró dextrosa (2 g/kg) vía intragástrica; la glucemia se midió al tiempo 30, 60, 120 y 180 min.

### **9.6 Prueba de tolerancia a la insulina**

Después de 20 días de tratamiento, todos los grupos se dejaron en ayuno durante 12 h; posteriormente se midió la glucosa inicial (tiempo 0) y se administraron 2.8 unidades de insulina (UI) diluidas en solución salina a cada ratón vía intraperitoneal, la glucemia se midió a los tiempos 15, 30, 45 y 60 minutos. Una vez realizadas estas curvas, los ratones fueron sacrificados para obtener el suero, los cuales fueron almacenados a  $-90^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### **9.7 Parámetros bioquímicos y antropométricos**

Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol, triglicéridos. Además, se midió el peso y la talla de cada uno de los ratones al inicio y término de los tratamientos.

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

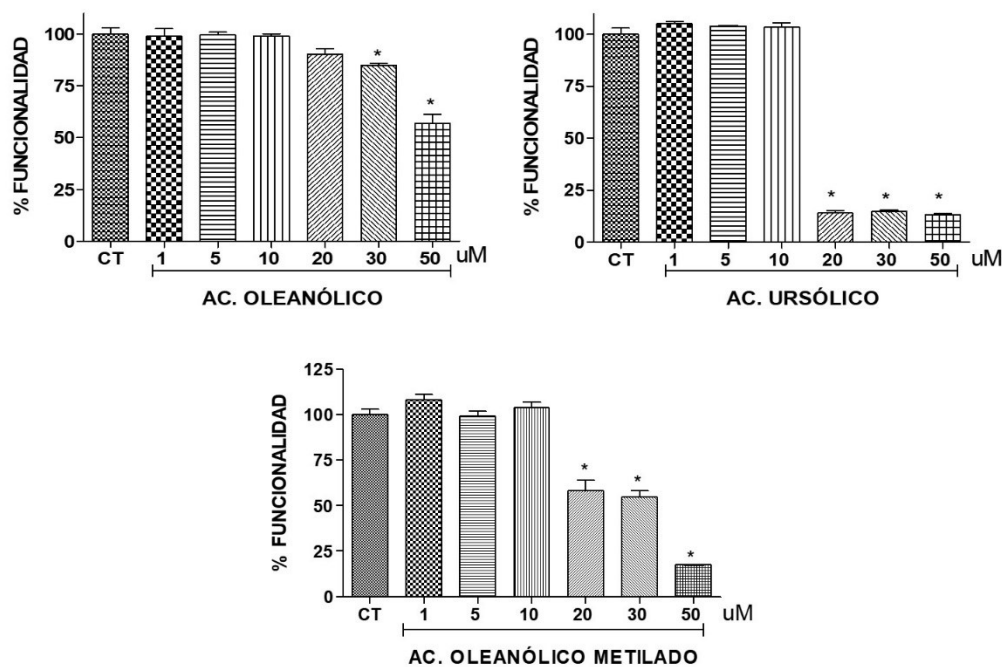
Todos los datos fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. y la significancia estadística se evaluó utilizando ANOVA, seguido de un análisis complementario por Tukey- Kramer, utilizando el programa estadístico GraphPad Prims y NCSS. Las diferencias significativas fueron consideradas con una  $p \leq 0.05$ .

## 11. RESULTADOS

### 11.1 Prueba de funcionalidad en el modelo *in vitro*

#### 11.1.1 *Mioblastos C2C12.*

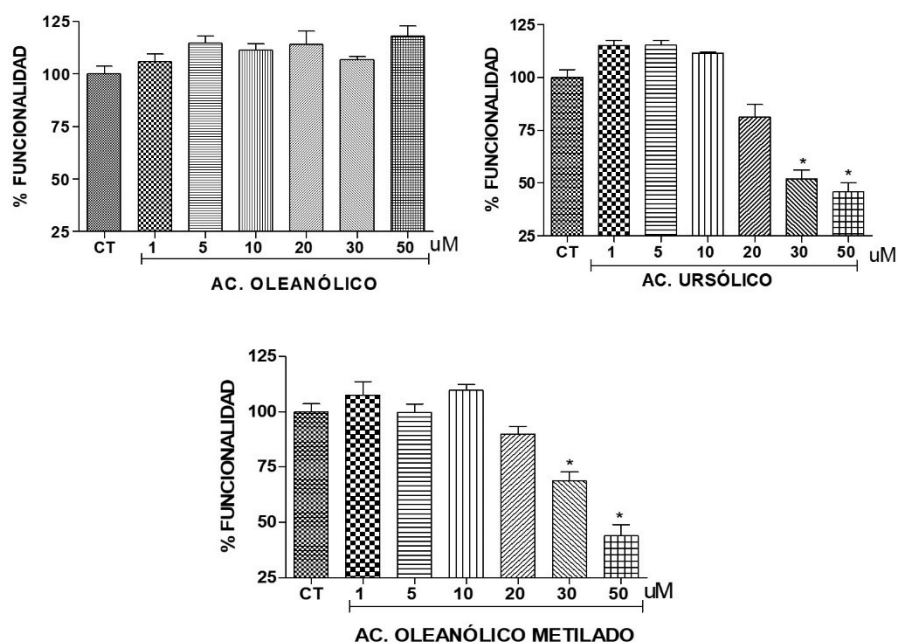
Los resultados obtenidos en la determinación de la funcionalidad en células C2C12 tratadas con distintas concentraciones de cada uno de los compuestos, muestran que, a medida que se incrementa la concentración de los ácidos pentacíclicos y después de las 48 h de tratamiento, la funcionalidad celular disminuye significativamente hasta un 75%, en relación con el control. A concentraciones menores (1-10  $\mu\text{M}$ ), la funcionalidad celular no se afectó después de las 48 h de tratamiento (Fig.9).



**Figura 9. Funcionalidad Celular en mioblastos C2C12.** Porcentaje de funcionalidad por la técnica de rojo neutro en mioblastos C2C12 tratados con diferentes concentraciones de AO, AU y AO/M. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3), \* Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

### 11.1.2 Adipocitos 3T3-L1.

Los resultados obtenidos en la determinación de la funcionalidad en adipocitos 3T3-L1 tratados con distintas concentraciones de cada uno de los compuestos, muestran que, a medida que se incrementa la concentración de los ácidos pentacíclicos y después de las 48 h de tratamiento, la funcionalidad celular disminuye significativamente hasta un 50% cuando se compara con el control ( $p \leq 0.05$ ). A concentraciones menores (1-10  $\mu\text{M}$ ), la funcionalidad no se afectó después de las 48 h de tratamiento (Fig.10). Como criterio para seleccionar la concentración se tomó en consideración estudios previamente reportados, así como la concentración en la que la funcionalidad celular resultara  $>80\%$ ; por lo tanto, se utilizó una concentración de 10  $\mu\text{M}$  para todos los experimentos.



**Figura 10. Funcionalidad Celular en adipocitos 3T3-L1.** Determinación del porcentaje de funcionalidad por la técnica de rojo neutro en adipocitos 3T3L-1 tratados con diferentes concentraciones de AO, AU y AO/M. Media  $\pm$  E.E.M. ( $n=3$ ), \*Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

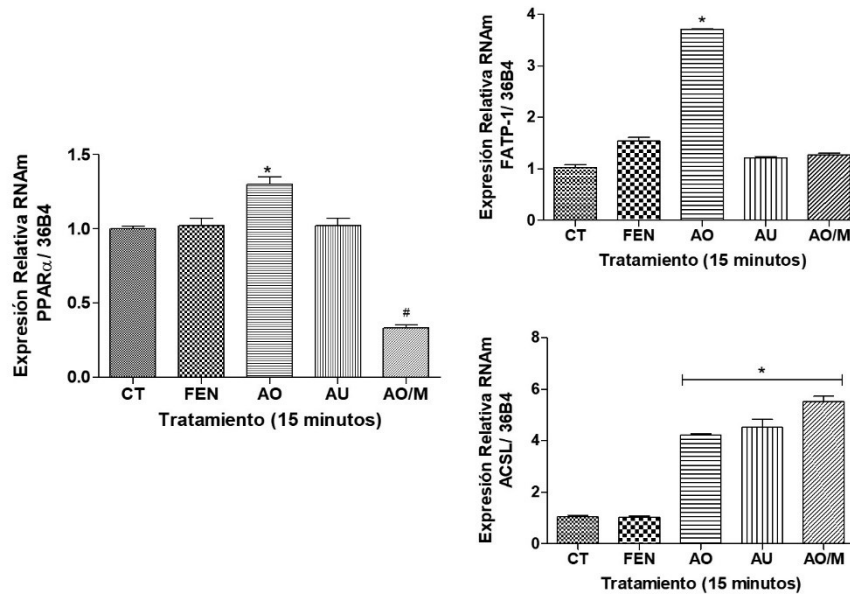
### **11.2 Efecto del AO, AU y AO/MET sobre la expresión de PPAR $\alpha$ y sus genes regulados en mioblastos.**

Los resultados que se observan en la Figura 11, describen el efecto de los compuestos pentacíclicos sobre la expresión de PPAR $\alpha$  y sus genes regulados (FATP-1 y ACSL). A los 15 min de tratamiento, el AO incrementó la expresión de PPAR $\alpha$  (0.5-veces), FATP-1 y ACSL (3-veces), de manera significativa, comparado con el control ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, el AU disminuyó de forma significativa la expresión de PPAR $\alpha$ , mientras que incrementó significativamente la expresión de FATP-1 (3-veces), comparado con el control ( $p \leq 0.05$ ). El AO/M incrementó la expresión de FATP-1 en 5-veces comparado con el control (Fig. 11).

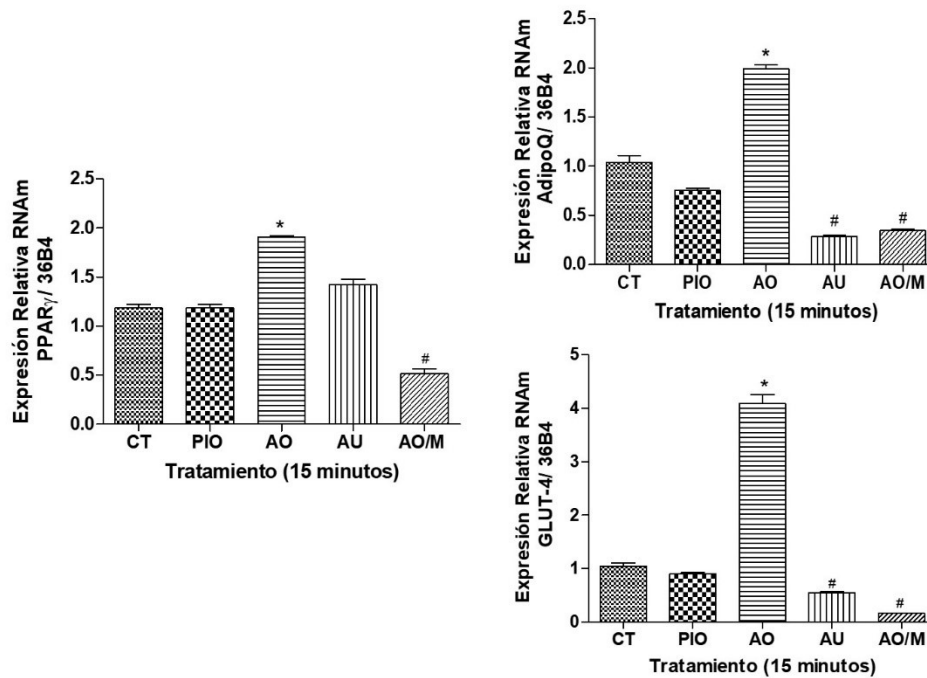
### **11.3 Efecto del AO, AU y AO/MET sobre la expresión de PPAR $\gamma$ y sus genes regulados en mioblastos.**

Se evaluó el efecto del AO sobre la expresión de PPAR $\gamma$  y sus genes regulados. Los resultados mostraron que, a los 15 minutos de tratamiento, este compuesto incrementa de forma significativa la expresión de los genes PPAR $\gamma$  y AdipoQ (2-veces), mientras que GLUT-4 incrementó significativamente (4-veces), en relación con el control ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, el AU mostró una disminución significativa en la expresión de AdipoQ y GLUT-4 comparado con el control (Fig. 12).





**Figura 11. Expresión del RNAm de PPAR $\alpha$ , FATP-1 y ACSL.** Células C2C12 tratadas con AO, AU y AO/M (10  $\mu$ M), y fenofibrato (5  $\mu$ M) por 15 min. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3), \*# Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).



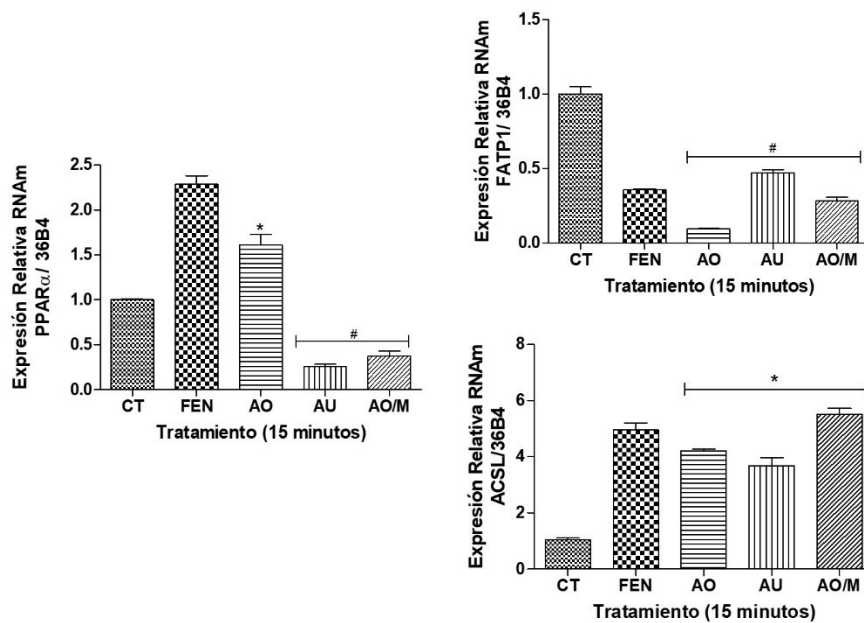
**Figura 12. Expresión del RNAm de PPAR $\gamma$ , AdipoQ y GLUT-4.** Células C2C12 tratadas con AO, AU y AO/M (10  $\mu$ M), y fenofibrato (5  $\mu$ M) por 15 min. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3), \*# Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

#### **11.4 Efecto del AO, AU y AO/MET sobre la expresión de PPAR $\alpha$ y sus genes regulados en adipocitos.**

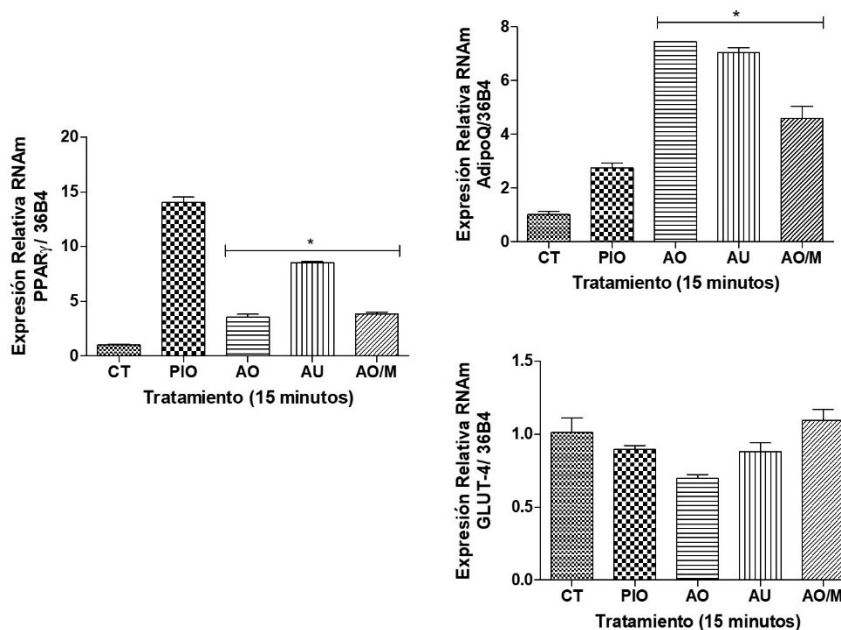
Los resultados de la Figura 13 muestran que el AO incrementó la expresión de PPAR $\alpha$  y ACSL (2 y 4 veces, respectivamente) comparado con el control ( $p \leq 0.05$ ). Así mismo, el AU y el AO/M incrementaron la expresión de ACSL (5-veces). Por otra parte, el AU disminuyó la expresión de PPAR $\alpha$  y FATP-1 en comparación con el control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 13).

#### **11.5 Efecto del AO, AU y AO/MET sobre la expresión de PPAR $\gamma$ y sus genes regulados en adipocitos.**

La Figura 14 describe los resultados obtenidos tras la administración del AO, AU y el AO/M, los cuales incrementaron significativamente la expresión de PPAR $\gamma$  y AdipoQ (5 a 7 veces) en comparación con el control ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, ninguno de los tres compuestos generó cambios en la expresión de GLUT-4 (Fig. 14).



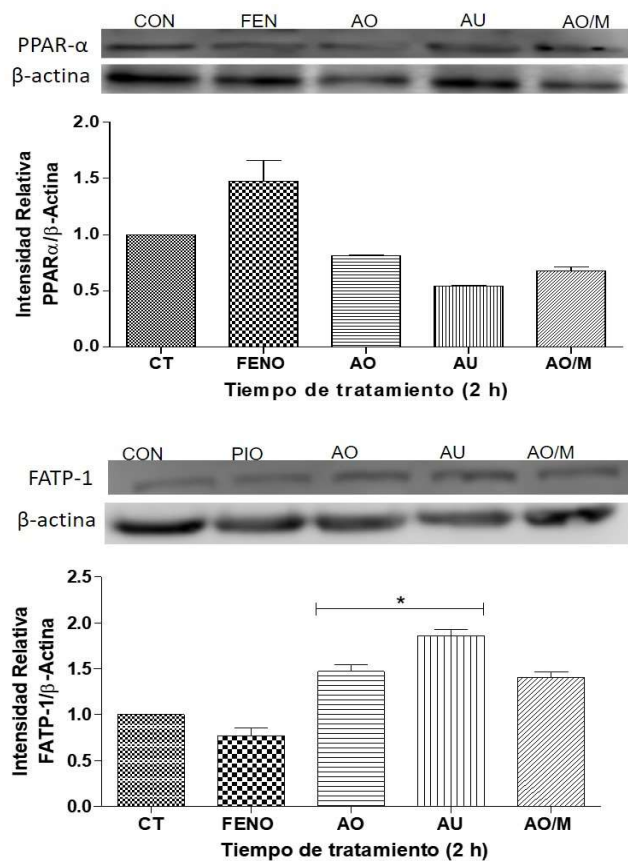
**Figura 13. Expresión del RNAm de PPAR $\alpha$ , FATP-1 y ACSL.** Células 3T3-L1 tratadas con AO, AU y AO/M (10  $\mu$ M), y fenofibrato (5  $\mu$ M) por 15 min. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3), \*\* Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).



**Figura 14. Expresión del RNAm de PPAR $\gamma$ , AdipoQ y GLUT-4.** Células 3T3-L1 tratadas con AO, AU y AO/M (10  $\mu$ M), y fenofibrato (5  $\mu$ M) por 15 min. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3), \*\* Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

### 11.6 Efecto del AO, AU y AO/M sobre las concentraciones de proteína para PPAR $\alpha$ y FATP-1 en mioblastos.

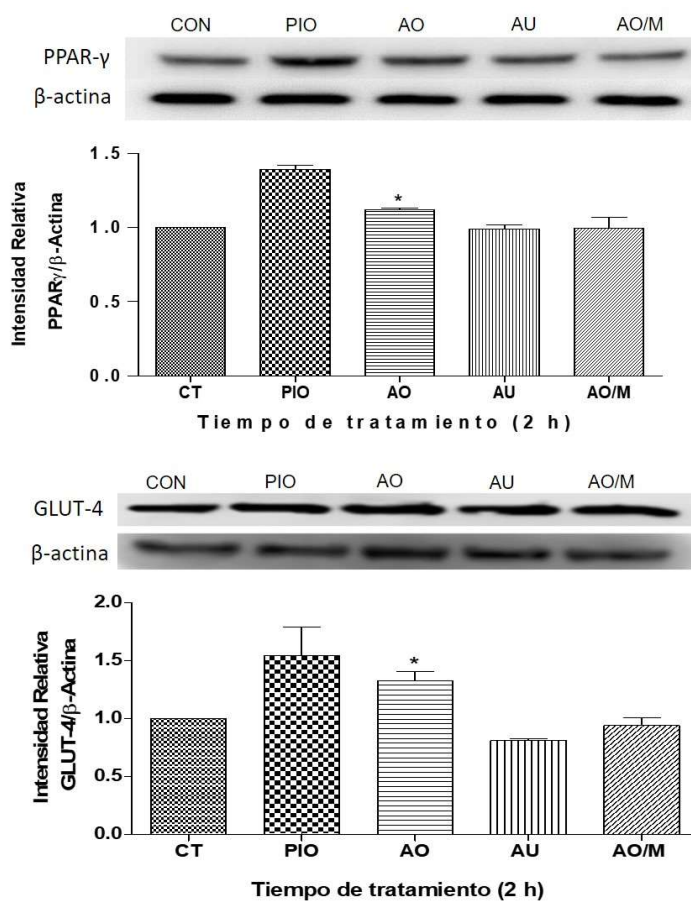
Los niveles de proteína para PPAR $\alpha$  y FATP-1 después de los tratamientos con los compuestos triterpénicos se muestran en la Figura 15. El AO y el AU incrementaron significativamente la expresión de FATP-1 después de 2 h de tratamiento en relación con el control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que el AO/M no modificó los niveles de expresión de ambas proteínas. Por otra parte, la expresión de PPAR $\alpha$  no se modificó después del tratamiento con los compuestos (Fig.15).



**Figura 15. Expresión proteínica de PPAR $\alpha$  y FATP-1.** Células C2C12 tratadas con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y fenofibrato (5  $\mu$ M) por 2 h. Media  $\pm$  E.E.M. ( $n=3$ ), \* Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

### 11.7 Efecto del AO, AU y AO/M sobre las concentraciones de proteína para PPAR $\gamma$ y GLUT-4 en mioblastos.

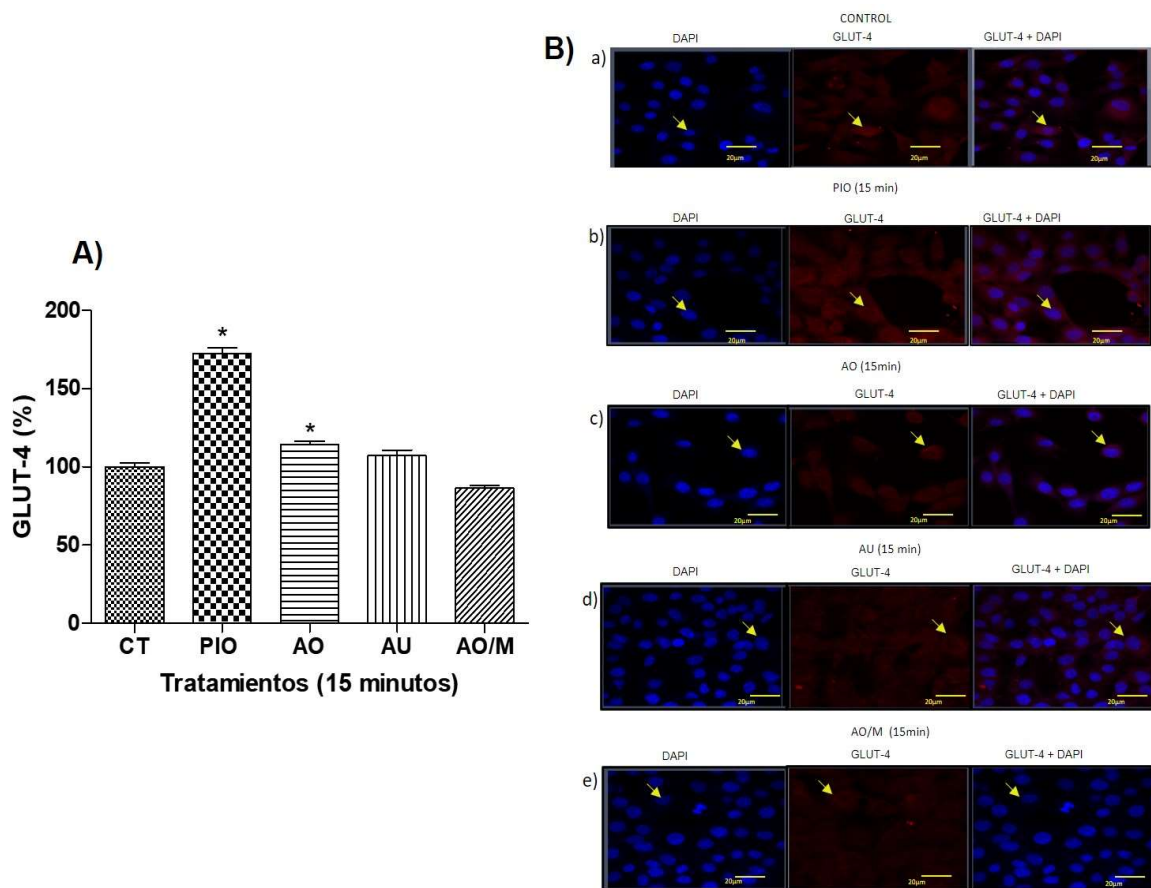
En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos tras los tratamientos con los compuestos triterpénicos. Se puede observar que el AO incrementó de forma significativa la expresión proteínica de PPAR $\gamma$  y GLUT-4 ( $p \leq 0.05$ ); mientras que el AU y el AO/M no mostraron cambios en las concentraciones de estas proteínas en relación con el control (Fig. 16).



**Figura 16. Expresión proteínica de PPAR $\gamma$  y GLUT-4.** Células C2C12 fueron tratadas con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y Pioglitazona (5  $\mu$ M) por 2 horas. Cada evaluación representa la media  $\pm$  E.E.M. ( $n=3$ ), \* Diferencia significativa comparada con el control  $p \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey's test).

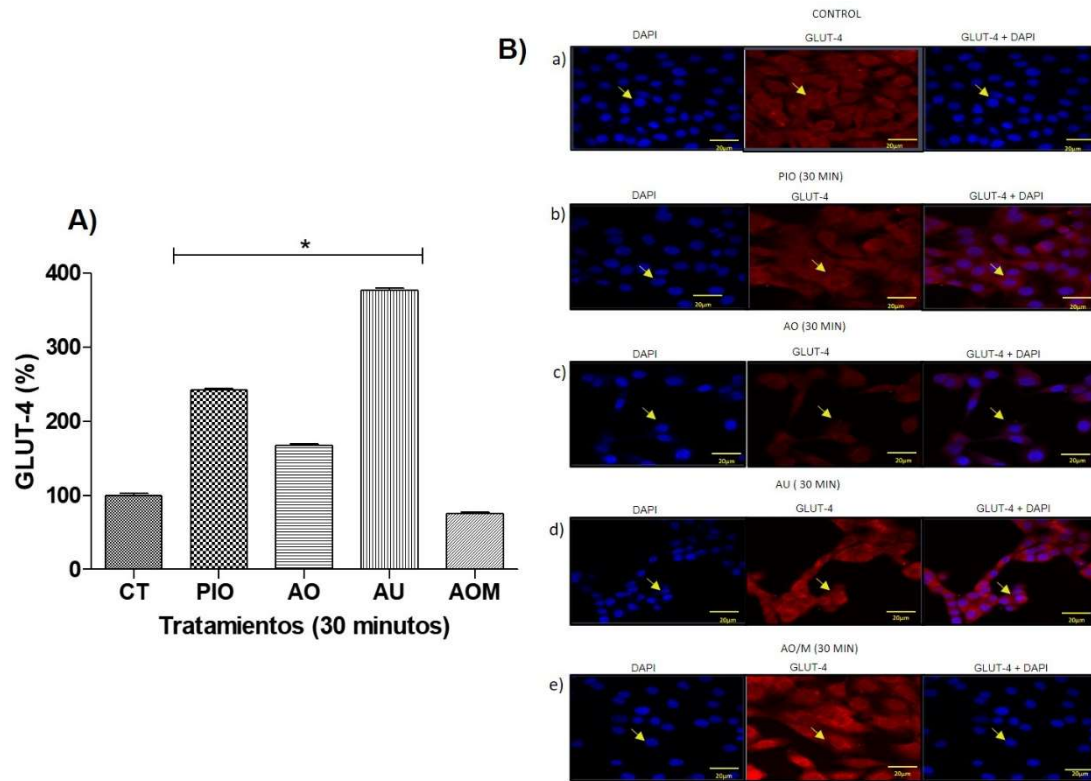
## 11.8 Translocación de GLUT-4 en mioblastos C2C12

Se evaluó el efecto del AO, AU y AO/M sobre la translocación de GLUT-4 a diferentes tiempos de incubación (15, 30 y 60 minutos). La Figura 17 muestra que a los 15 min de tratamiento el AO incrementó significativamente (0.5 veces) la translocación de GLUT-4 comparado con el control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 17).



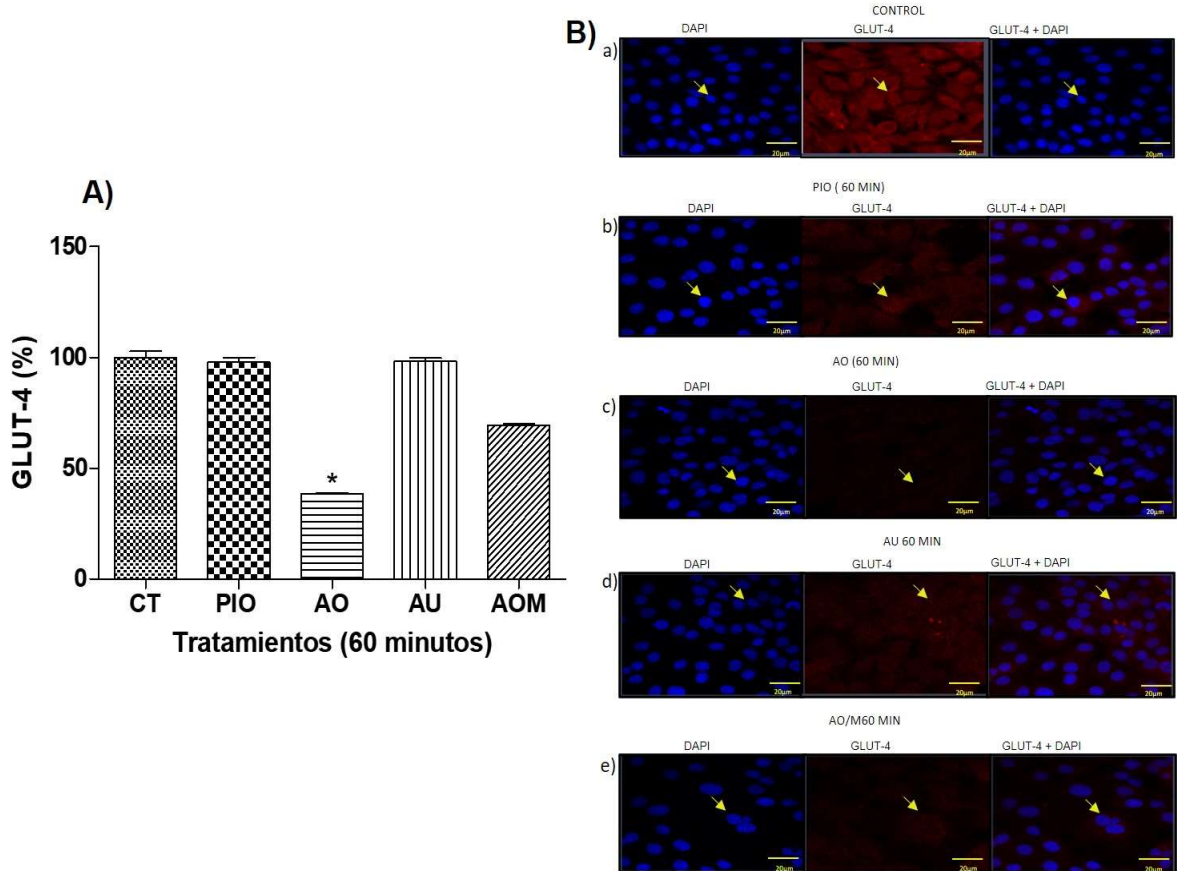
**Figura 17. Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4.** A) Translocación de GLUT-4 después del tratamiento con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y Pioglitazona (5  $\mu$ M) a los 15 min de tratamiento. El contenido de GLUT-4 fue cuantificado a una DO de 510 nm. B) Fotomicrografías de fluorescencia confocal de GLUT-4 tratadas con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) Pioglitazona (5  $\mu$ M) por 15 min (40X). DAPI: marcador de núcleos (azul), Rodamina- GLUT-4: Anticuerpo secundario contra GLUT-4 acoplado a rodamina (rojo), transposición de DAPI/GLUT-4 rodamina. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3). Diferencia significativa \* vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

A los 30 min de tratamiento se puede observar que tanto el AO como el AU incrementan la translocación de GLUT-4 de forma significativa (4 veces) cuando se compara con el control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 18).



**Figura 18. Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4.** A) Translocación de GLUT-4 después del tratamiento con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y Pioglitazona (5  $\mu$ M) a los 30 minutos de tratamiento. El contenido de GLUT-4 fue cuantificado a una DO de 510 nm. B) Fotomicrografías de fluorescencia confocal de GLUT-4 tratadas con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y Pioglitazona (5  $\mu$ M) por 30 minutos (40X). DAPI: marcador de núcleos (azul), Rodamina- GLUT-4: Anticuerpo secundario contra GLUT-4 acoplado a rodamina (rojo), transposición de DAPI/GLUT-4 rodamina. Cada evaluación representa la media  $\pm$  E.E.M. (n=3). Diferencia significativa \* vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey's).

Por último, a los 60 min de tratamiento el AO disminuyó significativamente la translocación de GLUT-4 en comparación con el control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que el AU y el AO/M no mostraron cambios comparado con el control (Fig. 19).

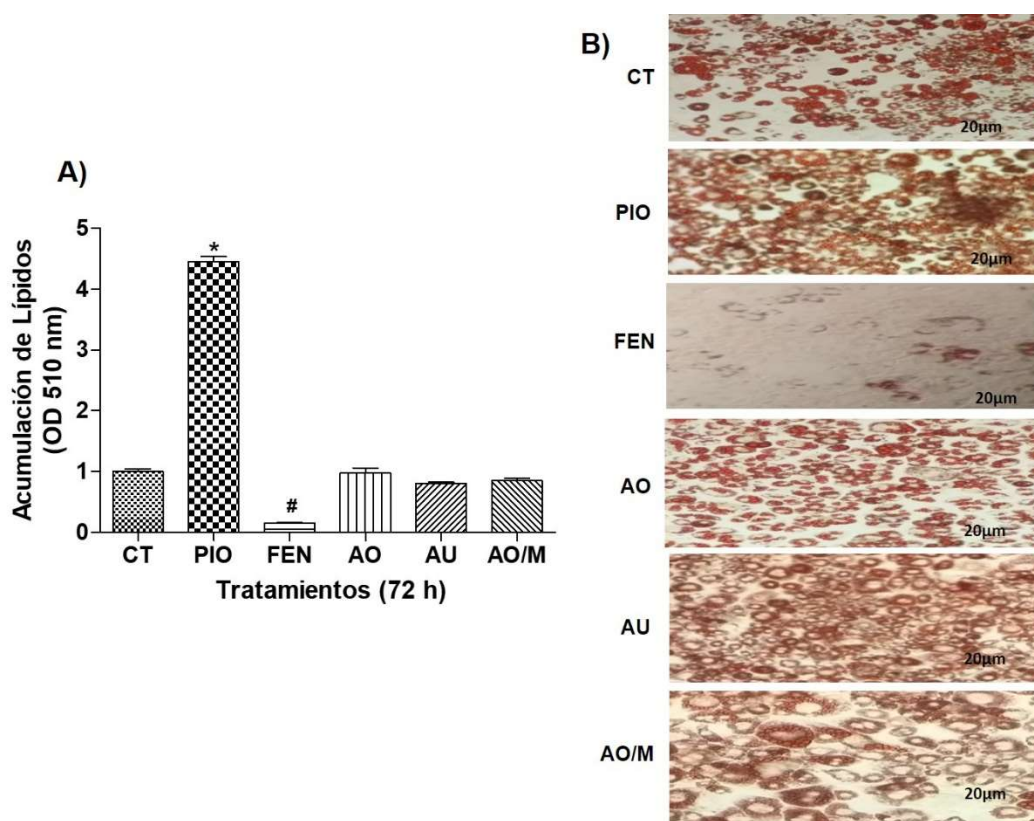


**Figura 19. Efecto del AO, AU y AO/M en la translocación de GLUT-4.** A) Translocación de GLUT-4 después del tratamiento con AO, AU, AO/M (10  $\mu\text{M}$ ) y pioglitazona (5  $\mu\text{M}$ ) a los 60 min de tratamiento. El contenido de GLUT-4 fue cuantificado a una DO de 510 nm. B) Fotomicrográficas de fluorescencia confocal de GLUT-4 tratadas con AO, AU, AO/M (10  $\mu\text{M}$ ) y pioglitazona (5  $\mu\text{M}$ ) por 60 minutos (40X). DAPI: marcador de núcleos (azul), rodamina- GLUT-4: anticuerpo secundario contra GLUT-4 acoplado a rodamina (rojo), transposición de DAPI/GLUT-4 rodamina. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3). Diferencia significativa \* vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).



### 11.9. Efecto del AO, AU y AO/M sobre la acumulación de lípidos en adipocitos

Posterior a 72 h de tratamiento con el AO, AU y el AO/M se evaluó el contenido de lípidos en adipocitos. Los resultados mostraron que no se modificó la acumulación de lípidos con ninguno de los compuestos triterpénicos, mientras que el tratamiento con pioglitazona aumentó la acumulación de lípidos; el fenofibrato disminuyó la acumulación de lípidos de manera significativa con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 20).



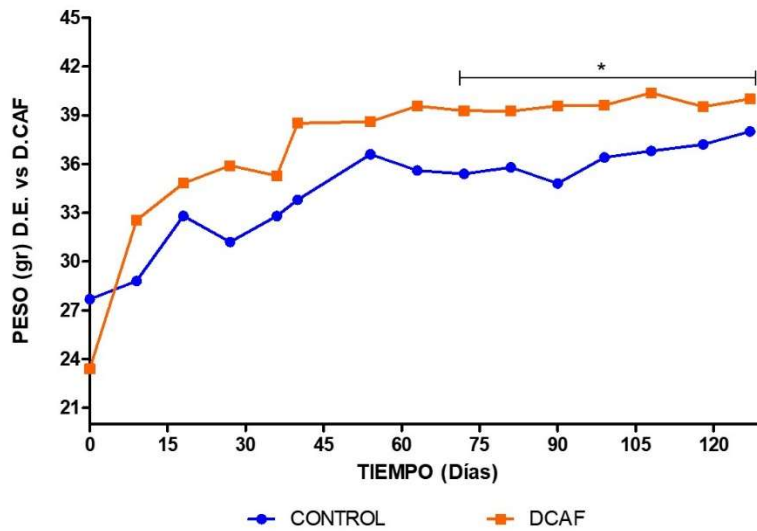
**Figura 20. Efecto del AO, AU y AO/M sobre la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. A)** Acumulación de lípidos después del tratamiento con AO, AU, AO/M (10  $\mu$ M) y pioglitazona (5  $\mu$ M) y fenofibrato (5  $\mu$ M) a las 72 h. El contenido de lípidos fue cuantificado por OD a 510 nm. **B)** Imágenes (10X) del contenido de lípidos teñidos con rojo oleoso después de las 72 h de tratamiento. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3). Diferencia significativa \* vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

## 12. Estudios *in vivo*

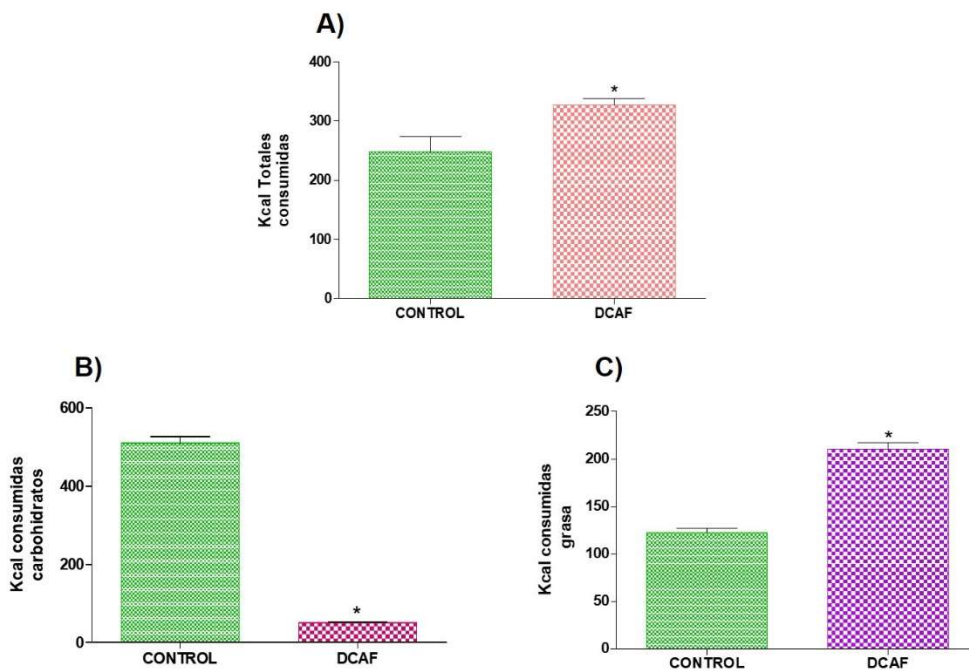
### 12.1 Estandarización de dieta de cafetería

La dieta DCAF se refiere a la alimentación basada en una variedad de alimentos comerciales. La mayor parte de los elementos seleccionados son hipercalóricos con un alto contenido de grasa y azúcar. Típicamente, este régimen conduce a hiperfagia, un aumento en la ingesta de energía y consecuentemente obesidad. Para este trabajo, nos basamos en las condiciones reportadas por Shafat y colaboradores (Shafat et al., 2009; Sampey et al., 2011).

Después de 4 meses de la administración de esta dieta se cuantificó el peso corporal en cada uno de los grupos que se estudiaron (Fig. 21), así como en el consumo de calorías y carbohidratos (Fig. 22). Después de 45 días de consumo de la dieta DCAF, los ratones aumentaron de peso significativamente con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ). Se realizó el cálculo semanal de las calorías consumidas para asegurar que la dieta DCAF fuera hipercalórica y conforme a la información nutrimental en las etiquetas del alimento estándar y la dieta DCAF (diversos productos comerciales) se calculó el consumo semanal de calorías, carbohidratos y grasa de cada uno de los grupos, se encontró diferencia significativa desde la primera semana hasta las 15 semanas en la dieta DCAF, lo que indica que esta dieta fue hipercalórica con respecto a la DE del grupo control (Fig. 22 A-C).



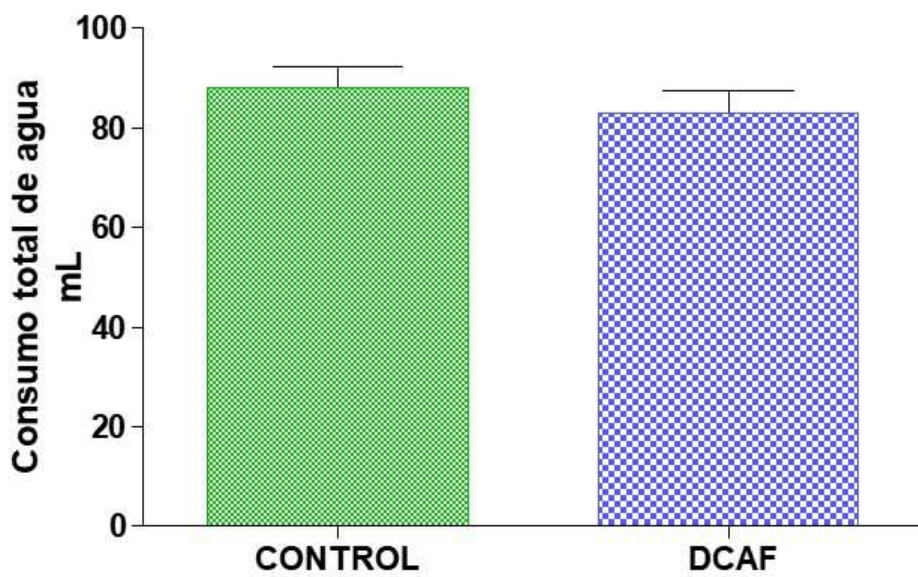
**Figura 21. Estandarización de la dieta de cafetería (DCAF).** Peso corporal de los grupos de estudio de: DE vs DCAF. Media  $\pm$  E.E.M. (n=40). Diferencia significativa\*vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey's).



**Figura 22. Peso corporal y consumo de kilocalorías.** A) Total de kilocalorías consumidas, B) Consumo de kilocalorías obtenidas de carbohidratos, C) Consumo de kilocalorías obtenidas de grasa. Datos comparados D.E. vs DCAF. Media  $\pm$  E.E.M. (n=3). \*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

## 12.2 Consumo de agua durante la dieta DCAF

Para determinar si la DCAF tuvo un efecto sobre el consumo de agua en cada uno de los grupos de tratamiento, se cuantificó la cantidad de agua consumida durante los 4 meses de la administración de la DCAF. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos de la medición del agua durante el tiempo de tratamiento; el consumo de agua no se afectó durante la dieta al comparar con el control ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 23).

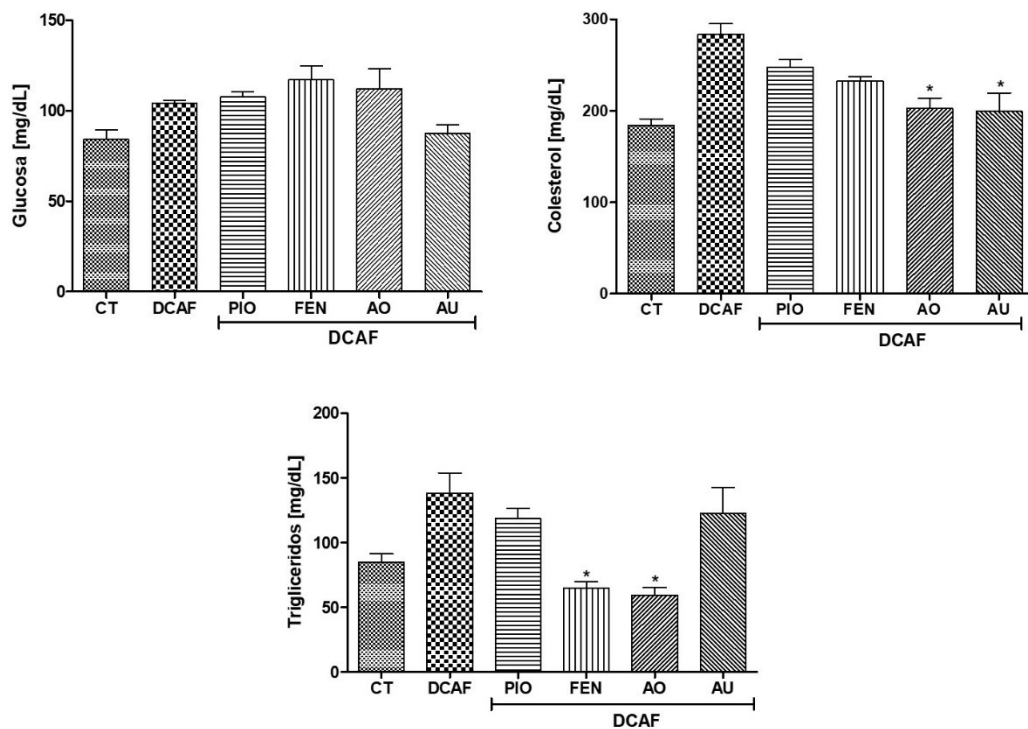


**Figura 23. Consumo de agua** durante la administración de la DCAF. Media  $\pm$ E.E.M. (n=3).

\*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

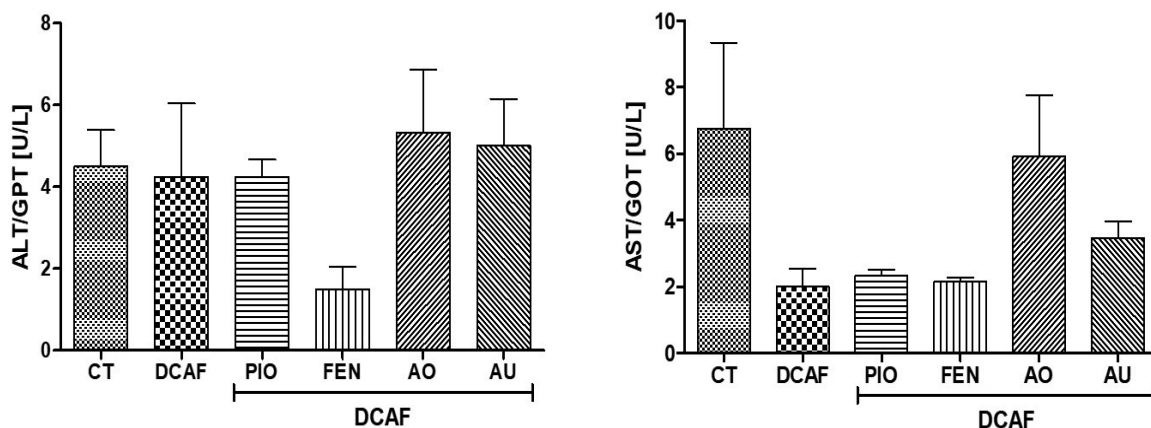
### 12.3 Parámetros bioquímicos

Al término del tratamiento se evaluaron diferentes parámetros bioquímicos, como son glucosa, colesterol, triglicéridos y transaminasas. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos en los grupos tratados con AO y AU (50 mg/Kg). Los niveles de glucosa tienden a disminuir con el tratamiento de AU, mientras que el colesterol total disminuyó significativamente tras el tratamiento con el AO y el AU ( $p \leq 0.05$ ). Por otro lado, los triglicéridos, disminuyeron significativamente posterior al tratamiento con el AO ( $p \leq 0.05$ ) (Fig.25).



**Figura 24. Parámetros bioquímicos.** Se evaluaron los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos posterior a los tratamientos con AO y AU (50 mg/Kg). Media  $\pm$ E.E.M. (n=3). \*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

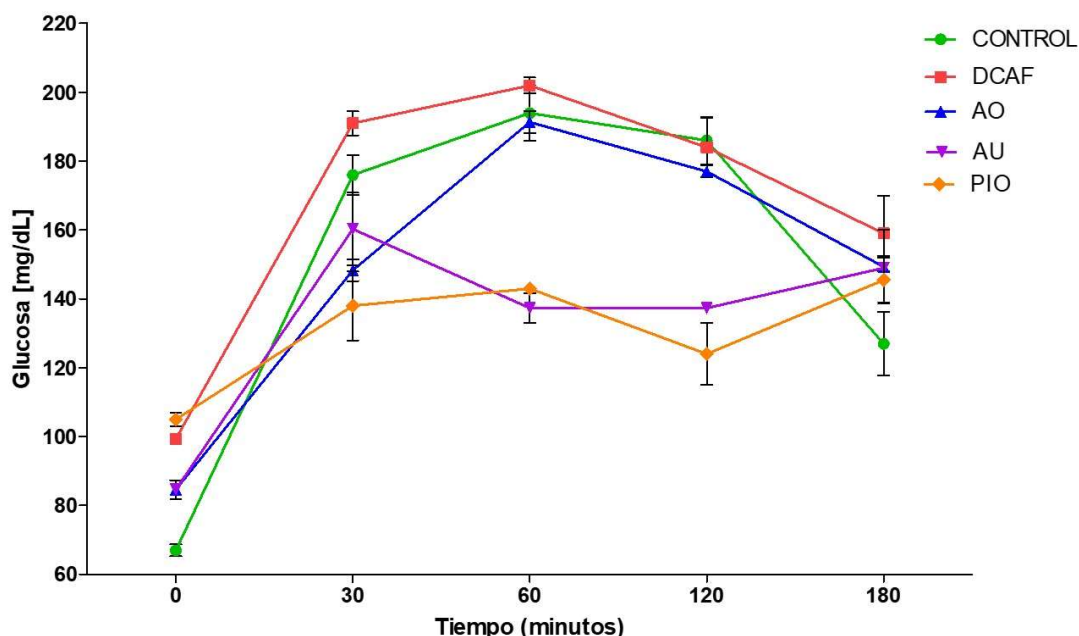
Los niveles de transaminasas (ALT/GPT, AST/GOT) no se modificaron con los tratamientos de AO y AU (50 mg/Kg) (Fig. 26).



**Figura 25. Niveles de transaminasas ALT/GPT y AST/GOT.** Se evaluaron los niveles de transaminasas (ALT/GTP y AST/TGO) con AO y AU (50 mg/Kg). Media  $\pm$ E.E.M. (n=3). \*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

#### 12.4 Prueba de tolerancia a la glucosa

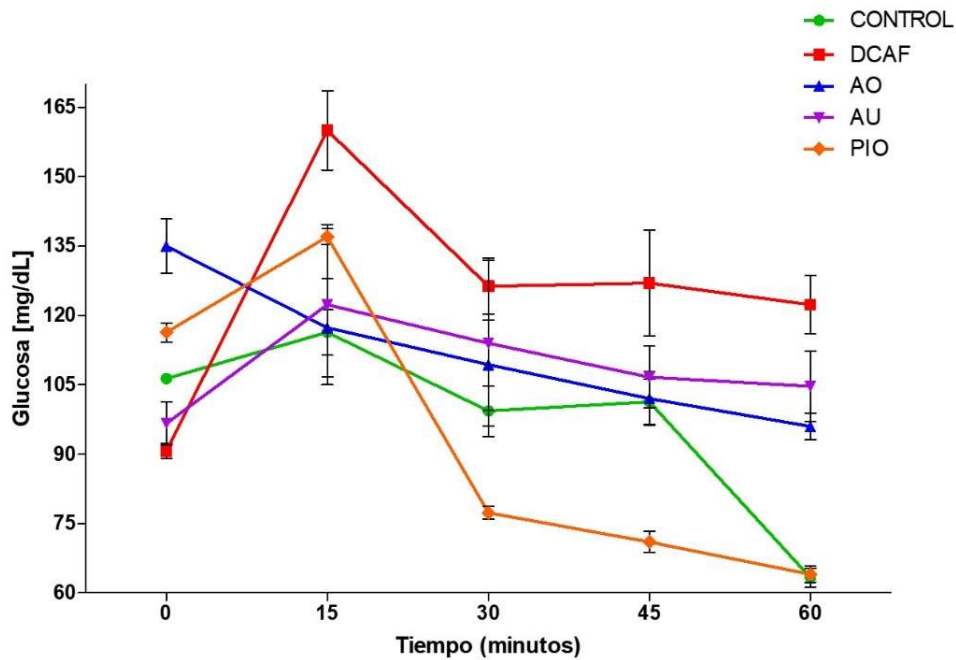
Después de cada uno de los tratamientos, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa. El AU tiende a disminuir la glucosa, posterior a los 60 minutos de la administración de la carga de glucosa, en comparación con el control DCAF ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 26).



**Figura 26. Prueba de tolerancia a la glucosa.** Posterior a los tratamientos con el AO, AU (50 mg/Kg) y pioglitazona (20 mg/Kg) se determinó la concentración de glucosa a diferentes tiempos (30, 60, 120 y 180 min. Media  $\pm$ E.E.M. (n=3). \*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

## 12.5 Prueba de resistencia a la insulina

La Figura 27 muestra la sensibilidad a la insulina en ratones con los diferentes tratamientos, AO y AU, a dosis de 50 mg/Kg y pioglitazona a dosis de 20 mg/Kg. Desde los 30 minutos posterior a la administración de la insulina, el grupo tratado con AO y el AU tiende a disminuir los niveles de glucosa cuando se compara con el grupo control. Por otra parte, el grupo DCAF, mantuvo niveles elevados de la glucemia por arriba de los 120 mg/dL durante toda la prueba de resistencia a la insulina cuando se compara con el control (Fig. 27).



**Figura 27. Prueba de resistencia a la insulina.** Posterior a los tratamientos con el AO, AU (50 mg/Kg) y pioglitazona (20 mg/Kg) se determinó la resistencia a la insulina a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min) y en los diferentes grupos de tratamiento. Media  $\pm$ E.E.M. (n=3). \*Diferencia significativa vs Control,  $p \leq 0.05$  (ANOVA, prueba de Tukey).

### 13. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la DM2 se ha convertido en una enfermedad metabólica mundial y representa un grave problema de salud pública. Su incidencia reporta en un 8.5% de la población mundial, por lo que numerosos estudios han demostrado que el control efectivo de los niveles de glucosa en sangre pueden contribuir de manera importante en la prevención y tratamiento de las complicaciones de esta enfermedad (Ozougwu et al., 2018).

Durante la última década, se ha demostrado que existe una activación farmacológica de PPAR con diferentes enfoques terapéuticos efectivos para corregir



algunos aspectos del síndrome metabólico, principalmente en la hipertrigliceridemia, que es corregida por los fibratos, y en la DM2, donde participan las tiazolidinedionas (Coll et al., 2009). En particular, PPAR $\alpha$  se ha identificado como un regulador clave de los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (Acil CoA oxidasa, carnitina palmitoil transferasa I, hidroximetilglutaril CoA sintasa mitocondrial). Al aumentar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y proporcionar energía a la célula, también rompe los ácidos grasos de cadena larga, evitando así la acumulación y toxicidad de los lípidos en las células (Polvani et al., 2016). Además, también estimula la captación celular de ácidos grasos, aumentando la expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP1) y la enzima translocasa de los ácidos grasos (FAT) (Motojima et al., 1998).

Por otro lado, PPAR $\gamma$  es fundamental para la diferenciación y acumulación de lípidos en los adipocitos. Además, su activación aumenta la sensibilidad a la insulina y esto puede estar mediado en parte por la activación directa de factores genéticos de la vía de la insulina (Castrejón et al., 2007). El primer paso por el cual la insulina aumenta el almacenamiento o la utilización de energía implica el transporte regulado de glucosa hacia la célula, mediado por el transportador facilitador de glucosa GLUT-4, aumentando así la captación de glucosa en adipocitos y células musculares, reduciendo los niveles plasmáticos de glucosa (Fröjdö et al., 2009). Además, la activación de PPAR $\gamma$  desencadena un aumento de las concentraciones plasmáticas de adiponectina, una hormona que aumenta los ácidos grasos en el músculo esquelético y el hígado. En general, la adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina

y disminuye la producción de glucosa en el hígado, lo que resulta en una disminución de los niveles de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos libres circulantes (Amauchi et al., 2001).

En este sentido, modelos de estudio para evaluar el efecto de moléculas antidiabéticas, como el de la línea celular C2C12 de mioblastos, pueden ayudar a explicar el efecto de moléculas experimentales sobre dianas moleculares que participan en la expresión de genes implicados en el metabolismo de glucosa y lípidos. Además, el tejido muscular es donde se gasta mayoritariamente energía, hay una mayor incorporación de glucosa estimulada por la insulina debido a la translocación de GLUT-4 y ocurre la mayor expresión de PPAR $\gamma$  y  $\alpha$  (Ahmadipour et al., 2013).

Por otra parte, el tejido adiposo es la principal reserva de energía y donde se almacenan los triglicéridos cuando existen períodos de exceso de energía. Los adipocitos, como la línea celular 3T3-L1, pueden diferenciarse espontáneamente durante un período de varias semanas con la aparición de células que contienen gotas lipídicas. Este proceso puede acelerarse por agentes inductores como la DX, MIX y la insulina. La expresión de PPAR $\gamma$  promueve la formación de gotas de lípidos durante el proceso de diferenciación de estas células (Serrano et al., 2016). Por tanto, ambos tipos celulares son un buen modelo de estudio para los propósitos de esta investigación.

En este estudio se evaluó el efecto del AO, AU y AO/M sobre la funcionalidad de las células C2C12 y 3T3L-1 y sobre la expresión del ARNm de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ . Además, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la expresión del ARNm de

proteínas importantes expresadas durante la activación de PPAR. Estas proteínas tienen un papel clave en la oxidación de lípidos (FATP-1 y ACSL), como sensibilizadores a la insulina (AdipoQ y GLUT-4) y la activación de la cascada de señalización de esta hormona (IRS-1). Además, se evaluó la translocación de GLUT-4 y la acumulación de lípidos en las células C2C12 y 3T3-L1, respectivamente. Por otra parte, se estableció el modelo DCAF y se determinó el efecto de estos compuestos sobre los parámetros bioquímicos en el modelo *in vivo*.

El presente estudio muestra evidencia que el tratamiento con el AO, AU y AO/M a concentraciones bajas (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) no afecta la funcionalidad de las células C2C12 y 3T3-L1, mientras que a concentraciones más altas (20, 30 y 50  $\mu\text{M}$ ) la funcionalidad de las células disminuye significativamente. Estudios similares en la línea celular HepG2 y en hepatocito primario mostraron que a bajas concentraciones de AO y AU (0.05-10  $\mu\text{M}$ ) no se afecta la viabilidad celular. Sin embargo, a concentraciones más altas (25-75  $\mu\text{M}$ ) se observó una disminución significativa en la viabilidad (Sung et al. 2010; Li et al., 2015; Chen et al., 2017).

Varias investigaciones han documentado que, a concentraciones altas, el AO y el AU conducen a un efecto apoptótico de varios tipos de células cancerosas. En este sentido, Liese et al. demostraron que a concentraciones más altas de AO (20-80  $\mu\text{M}$ ) disminuyen la viabilidad de las células Huh7, HepG2 y Hep3B (Juliane et al., 2015). Asimismo, en un estudio realizado por Lucio et al., en la línea celular de cáncer de pulmón A459, el AU también disminuyó la viabilidad (20-100  $\mu\text{M}$ ) (Fernandes and Arau, 2011). De acuerdo con nuestros resultados y con lo reportado anteriormente, se

utilizó la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de cada uno de los compuestos en los experimentos posteriores, debido a que es la concentración máxima a la cual estos compuestos no indujeron cambios en la funcionalidad de ambos tipos celulares.

Debido a que los PPAR son considerados los responsables del equilibrio energético, estudios recientes se centraron en el desarrollo de agonistas para PPAR. Los agonistas duales de PPAR $\alpha/\gamma$  son una nueva clase de fármacos desarrollados para producir efectos antidiabéticos e hipolipidémicos, como es el caso del ragaglitazar, un agonista dual de PPAR $\alpha/\gamma$  que ha demostrado tener efectos sobre estos PPAR. En otros estudios, el muraglitazar, un agonista dual similar al ragaglitazar, indujo ganancia de peso en ratones *db/db* e incluso produjo edema (Mitra et al., 2007). El tesaglitazar, otro agonista dual de PPAR $\gamma/\alpha$ , indujo fibrosarcoma en tejido adiposo de ratones (Glinghammar et al., 2011), aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual se desarrollan estos efectos adversos.

El compuesto sintético híbrido tiazolidin-2,4-dion/bifenilcarbonitrilo, mediante estudios *in vivo* e *in silico*, se demostró que aumenta la expresión de PPAR $\alpha/\gamma$  (Hidalgo et al., 2013). Otro agonista sintético es el GFT505, el cual redujo lípidos y glucosa en sangre, así como la RI por activación dual de PPAR $\alpha/\gamma$  (Cariou et al., 2011). 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 (Xu et al., 2006). 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 en pacientes que no pudieron ser controlados mediante estatinas. Sin embargo, aún no se

encuentra aprobado a nivel mundial. De ahí que se considera importante continuar con la búsqueda de nuevos agonistas duales (Bronson et al., 2014). El AO y el AU son moléculas que inducen efectos antidiabéticos e hipolipidémicos que pueden asociarse con un efecto agonista en PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  (Berger et al., 2005).

Los resultados de esta investigación muestran que el AO aumentó la expresión del ARNm de PPAR $\alpha/\gamma$ , AdipoQ, GLUT-4, FATP-1 y ACSL en mioblastos C2C12. Por otra parte, el AU y el AO/M únicamente incrementaron la expresión del RNAm de ACSL. En los adipocitos 3T3-L1, la expresión del RNAm de PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y AdipoQ también incrementaron tras el tratamiento con el AO, mientras que el AU y el AO/M incrementaron la expresión de PPAR $\gamma$  y AdipoQ. Estos datos sugieren que el AO puede tener una activación dual de PPAR $\alpha/\gamma$  en el tejido muscular y en el tejido adiposo, lo cual conduce a la activación de genes que participan en el metabolismo tanto de lípidos como de carbohidratos.

Entre los genes que se activan por estos factores de transcripción podemos encontrar a la adiponectina, una hormona secretada en tejido adiposo y músculo esquelético que se encarga de aumentar la expresión de moléculas implicadas en el transporte y oxidación de los ácidos grasos, lo cual podría contribuir a mejorar la transducción de señales del receptor de insulina (Elisondo et al., 2008). Por otra parte, GLUT-4 es el principal transportador de glucosa sensible a la insulina. Tras la estimulación por esta hormona intracelular, GLUT-4 se transloca a la membrana plasmática, donde facilita la captación de glucosa celular, especialmente en el músculo esquelético y tejido adiposo (Byers et al., 2017). FATP-1 participa en la incorporación

y transporte de ácidos grasos a las mitocondrias para la  $\beta$ -oxidación y ACSL sintetiza Acil CoA a partir de ácidos grasos de cadena larga (Wu et al., 2006; Fujimoto et al., 2007). Por lo tanto, el aumento de la expresión de estos genes contribuye a la mejora de la sensibilidad a la insulina y disminuye los niveles de lípidos en estos tipos celulares.

El análisis de expresión de proteínas de PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , así como de GLUT-4 y FATP-1, mostraron que el AO aumenta las expresiones de estas tres proteínas, mientras que el AU únicamente aumentó la expresión de FATP-1. Estos aumentos podrían estar asociados con el incremento en los niveles de expresión del ARNm en PPAR $\gamma$ , GLUT-4 y FATP-1. Algunos estudios muestran que la expresión de PPAR $\alpha$  está regulada por glucocorticoides, hormona del crecimiento, insulina e incluso ácidos grasos y fibratos. Sin embargo, en situaciones de estrés o ayuno producen un aumento de los valores plasmáticos de glucocorticoides, lo que aumenta la síntesis de PPAR $\alpha$ . De esta forma, valores altos de PPAR $\alpha$  podrían modular la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y la proliferación peroxisomal, mientras que a valores bajos se expresan genes que participan en el metabolismo lipídico, de manera que el RNAm y los valores de la proteína PPAR $\alpha$  podrían estar asociados con el ritmo circadiano de los glucocorticoides (Panadero et al., 2008).

Nuestros resultados reflejan que el AO produce un efecto dual sobre PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , además de inducir un aumento en la producción de las proteínas reguladas por los genes FATP-1 y GLUT-4, lo que podría estar asociado a una mejora en la condición metabólica en las células C2C12. Se ha demostrado que niveles altos de

ARNm y proteína de PPAR $\gamma$  se asocian con el incremento en la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo e hígado. Esto indica que PPAR $\gamma$  podría operar directamente como un importante punto de control en el músculo esquelético, regulando su capacidad para responder a un estímulo de insulina (Hevener et al., 2003). Varios estudios han demostrado que los extractos de plantas promueven un efecto agonista dual sobre PPAR $\alpha/\gamma$ . En este sentido, el extracto metanólico de las flores de *Punica granatum* (PGF) potencia la actividad del gen indicador de luciferasa PPAR $\alpha$  en las células HEK-293. Además en un estudio realizado por Huang et al., en células THP-1 humanas, se demostró que el AO proveniente de PGF es en parte responsable de la activación de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Huang et al., 2005, 2006).

Nuestros resultados muestran que el AO tiene un efecto dual en ambos PPAR en los mioblastos C2C12 a nivel de RNAm y proteína, y una activación sobre el RNAm en los adipocitos 3T3-L1, lo que conduce a una regulación simultánea del metabolismo de glucosa y lípidos. Este hecho podría estar asociado a mejorar la sensibilidad a la insulina produciendo un efecto antidiabético e hipolipidémico.

La translocación de GLUT-4 es uno de los eventos clave en la sensibilidad a la insulina. De hecho, es uno de los mecanismos de las TZD. Por esta razón, evaluamos el efecto del AO, AU y AO/M sobre la translocación de GLUT-4 mediante microscopía confocal. Los GLUT son una familia de proteínas transportadoras de glucosa que la transportan bidireccionalmente a través de las membranas celulares por medio de una difusión facilitadora. Se han descubierto diferentes isoformas de GLUT's en diferentes tejidos (hígado, adipocitos, músculo, páncreas), sin embargo, la

resistencia a la insulina está asociada con alteraciones del metabolismo de estos transportadores de glucosa (Castrejón et al., 2007). El tejido muscular tiene el mayor consumo de glucosa, además, es el principal objetivo de la insulina, donde regula el metabolismo de GLUT-4 para introducir la glucosa al interior de las células y pueda ser metabolizada (López et al., 2001).

Nuestros resultados mostraron que el AO y el AU aumentaron la translocación de GLUT-4 en los mioblastos a partir de los 15 min de tratamiento, teniendo su mayor efecto a los 30 min. En un estudio realizado por Ming et al., el AO aumentó la expresión de las proteínas IRS-1 y GLUT-4 en células HepG2, lo que indica que este triterpeno podría disminuir la resistencia a la insulina al regular la vía IRS-1/GLUT-4, a través de la vía de señalización PI3K/AKT, debido a que esta vía regula los movimientos de las vesículas que contienen el transportador de glucosa hacia la membrana (Li et al., 2015b). Por otra parte, nuestros resultados indican que a pesar de que el AU no modificó los niveles de expresión del RNAm y la proteína de GLUT-4, si se incrementó la translocación de este transportador de glucosa en los mioblastos, esto podría estar asociado con lo reportado por He et al., quien demostró que en adipocitos 3T3-L1, el AU (10  $\mu$ M) activa la cascada de señalización de PI3K/AKT con la fosforilación de cinasas importantes para la translocación de GLUT-4, como son PDK y AKT (He et al., 2014).

Hasta el momento, no se conoce evidencia sobre la participación del AO y el AU en la translocación de GLUT-4 en las células musculares, por lo que nuestros resultados podrían establecer un nuevo enfoque para el tratamiento con DT2, sin



embargo, es necesario realizar estudios sobre los efectos de estos triterpenos en la señalización de IRS-1/PI3K.

Un aumento de la acumulación de lípidos puede conducir al desarrollo de obesidad, generar así resistencia a la insulina y posteriormente DM2. Los efectos hipolipidémicos del AO son bien conocidos, en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en colesterol. El AO redujo las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL. Además, se encontró que el nivel de expresión de SREBP-1 disminuyó tras el tratamiento con el AO, lo cual está asociado con la disminución de la biosíntesis de los ácidos grasos en el hígado (Unoki et al., 2008). También se ha demostrado que el AU disminuye la acumulación de triglicéridos en el plasma y en el hígado tras la activación de PPAR $\alpha$ , la regulación de adiponectina y leptina, y la subsecuente disminución de la masa del tejido adiposo en el modelo de ratón C57BL con dieta alta en grasas, por lo que estos resultados sugieren que el AU podría ejercer efectos hipolipidémicos e hipoglucémicos (Jia et al., 2015).

La administración del AO, AU y AO/M en células 3T3L-1 no mostró diferencia significativa en el almacenamiento de lípidos con respecto al grupo control; sin embargo, se ha demostrado que el AO atenúa la acumulación de lípidos en los adipocitos al regular a la baja la inducción de PPAR $\gamma$  a niveles transcripcionales y el proceso de diferenciación de los adipocitos (Poulsen et al., 2012). Nuestros datos sugieren que el AO y el AU, al tener un efecto dual sobre PPAR $\alpha/\gamma$  en los adipocitos, impiden la acumulación de lípidos y, con ello, mantienen un equilibrio en el gasto energético y evitan la acumulación de lípidos en el tejido adiposo.

La dieta DCAF es un modelo que simula las condiciones de obesidad en los seres humanos y que es adquirida por productos superprocesados, los cuales, en su mayoría, son altos en grasa y carbohidratos, así como hipercalóricos, comparados con una dieta balanceada y saludable. Los países en vías de desarrollo han expuesto a su población al consumo de alimentos muy refinados, bebidas azucaradas, carne y productos lácteos que contienen altos niveles de grasas saturadas, y junto con una vida sedentaria, están contribuyendo al incremento en la prevalencia de la dieta DCAF. Esta dieta ha tenido éxito en la generación de la obesidad en modelos murinos, produciendo hiperfagia, aumento significativo en el peso corporal, inflamación en el hígado y aumento del tejido adiposo blanco y marrón, hiperinsulinemia grave, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa (Haslam et al., 2017). En este modelo, los animales tienen libre acceso al alimento estándar y al agua y por otra parte se les proporcionan alimentos con un alto contenido en grasa y carbohidratos, con un nivel de calorías elevado, por lo cual resulta ser un modelo adecuado para inducir obesidad (Martire et al., 2013)

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la dieta DCAF generó una ganancia significativa de peso a partir de la sexta semana del consumo de la dieta. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado por Zenni et al., quienes observaron en un modelo de ratón BALB/c que la dieta DCAF está asociada con un aumento en el peso corporal y ganancia de grasa visceral cuando se compara con el control de dieta estándar. Además, se demostró que en ratas Wistar que fueron alimentadas con DCAF se volvieron hiperfágicas, ganaron más peso y desarrollaron

hiperinsulinemia e hiperglucemia, en comparación con ratas alimentadas con manteca de cerdo (Zeeni et al., 2015; Johnson et al., 2016).

Se determinó el consumo de calorías provenientes de la dieta DCAF. Los resultados mostraron que los ratones consumieron mayor cantidad de calorías provenientes de la grasa contenida en la dieta DCAF, en comparación con dieta estándar. Esto concuerda con lo reportado por Zeeni y Jonsson, quienes reportaron que el mayor consumo de calorías proviene de la dieta DCAF que proporcionaron a su modelo de estudio. A pesar del incremento hipercalórico en nuestro modelo de estudio, el consumo de agua no incrementó. Por otra parte, se determinaron los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y transaminasas posterior a los tratamientos con el AO y AU.

Nuestros resultados mostraron que los niveles de glucosa tienden a disminuir con el AU (50 mg/Kg), lo cual concuerda con lo reportado por Jia et al. (2015), Kunkel et al. (2012), Rao et al. (2011), quienes determinaron que tras la administración de distintas dietas hipercalóricas y posterior al tratamiento con el AU (10 mg/Kg y 40 mg/Kg), los niveles de glucosa en ratones C57BL/6, C57BLKS/J y Swiss disminuyeron significativamente comparados con el control. Estos resultados sugieren que el AU podría reducir la obesidad al mejorar el metabolismo de la glucosa (Jia et al. 2015; Kunkel et al., 2012; Rao et al., 2011).

A pesar de que nuestros resultados no mostraron cambios en los niveles de glucosa tras el tratamiento con el AO (50 mg/Kg), diversos estudios han demostrado

que este triterpeno reduce significativamente la glucosa, tal es el caso de lo reportado por de Melo et al. (2010), Chen et al. (2017), Wang et al. (2013), Camer et al. (2014), que tras la administración de diversas dietas hipercalóricas en ratones Swiss, C57BL/6 y C57BLKS/J *lar-Lep*, y posterior al tratamiento con AO (10 y 20 mg/Kg), los niveles de glucosa disminuyeron significativamente en relación con ratones no tratados con AO. Estos resultados demuestran que el AO tiene un fuerte efecto hipoglucémico, el cual podría relacionarse con moléculas involucradas en la homeostasis de la glucosa (de Melo et al. 2010; Chen et al. 2017; Wang et al. 2013; Camer et al., 2014).

Por otra parte, se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos y transaminasas posterior al tratamiento con AO y AU. El colesterol disminuyó significativamente con ambos tratamientos, comparado con el control DCAF, mientras que los niveles de triglicéridos disminuyeron tras el tratamiento con AO. Los niveles de transaminasas no fueron modificados por los tratamientos. Nuestros resultados concuerdan con reportes previos en donde ambos tritérpenos disminuyeron estos parámetros bioquímicos (5-20 mg/Kg) en varios modelos murino de obesidad (*db/db*, C57BL/6J y C57BL/6), lo cual sugiere que estos compuestos pueden particularmente regular el metabolismo de los lípidos en el hígado, a través de la disminución de la actividad de enzimas lipogénicas y la oxidación de los ácidos grasos. Por su parte, en el tejido muscular se ha postulado que el incremento en la actividad de AKT puede estar asociada con el aumento en el gasto de energía, la disminución de la esteatosis hepática, la intolerancia a la glucosa y la mejora de desórdenes en el metabolismo

energético, con la posibilidad de evitar la DT2 (Gao et al. 2007; Perez, 2017; Wang et al., 2013; Jia et al., 2015; Sundaresan et al., 2014; Kunkel et al., 2012).

En cuanto a la prueba de tolerancia a la glucosa, nuestros resultados mostraron una tendencia a reducir la glucosa posterior al tratamiento con el AU comparado con el control DCAF; mientras que, en la prueba de resistencia a la insulina, nuestros resultados mostraron que el AO y el AU tienden a mantener niveles normales de glucosa. Este es un dato importante debido a que estos compuestos, como se observó *in vitro*, regulan genes que participan directamente en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, lo cual se ve representado en el modelo *in vivo*.

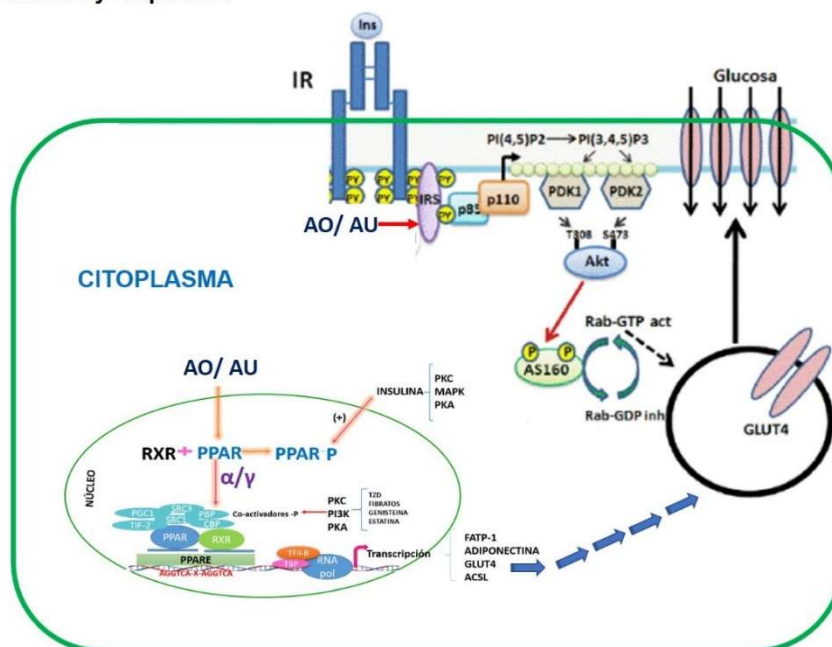
Además, se ha demostrado ampliamente que estos compuestos tienen efectos antihiper glucémicos e hipolipidémicos que, en conjunto, incrementan la sensibilidad a la insulina en diversos modelos de estudios *in vivo*. Tal es el caso de lo reportado por Gamede et al., que en ratas macho Sprague Dawley tratadas con una dieta para inducir pre-diabetes y tras la administración del AO, resultó en una homeostasis de glucosa a través de la reducción de la ingesta calórica, el peso corporal, la concentración de grelina plasmática y la hemoglobina glicada, en comparación con el control prediabético (Gamede et al., 2018). Así mismo, Gao et al. (2008) demostraron en un modelo de rata macho con diabetes inducida por alloxana que los niveles de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL disminuyeron significativamente, lo cual indica que el AO puede proteger al hígado y presentar efectos hipolipidémicos e hipoglucémicos (Gao et al., 2008). Todos estos resultados están asociados directamente con lo reportado por Djeziria et al. (2018), quienes

demonstraron que en este tipo de modelos *in vivo*, el AO incrementa la expresión del RNAm de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) y algunos genes lipogénicos (PPAR $\alpha$ , SREBP1 y G6Pasa) en hígado y tejido adiposo (Djeziri et al., 2018).

Estudios similares han demostrado que el AU en ratones y ratas con obesidad y/o diabetes experimental inducida por dieta hipercalórica, alloxana o estreptozotocina, disminuye la hiperglucemia, hiperlipidemia, los niveles de lípidos en hígado, la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, la adiposidad visceral y el peso corporal; por su parte, el AU incrementa la cascada de señalización de insulina a través de PI3K/AKT, la lipólisis en los adipocitos y la expresión de la proteína de PPAR $\alpha$ , AMPK-P y CPT-1 en el músculo esquelético, con mejoras en los parámetros bioquímicos evaluados, así como con incremento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Jayaprakasam et al., 2006; Rao et al., 2011; Lu et al., 2011; Li et al., 2014 ;Chu et al., 2015), lo cual podría estar directamente asociado con la inhibición de PTP1-B que esta mediada por ambos triterpenos. Estudios realizados por Ramírez et al., han demostrado que el AO y el AU a una dosis de 50  $\mu$ M tienen una potente actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1-B en estudios *in vitro*. En estudios de docking molecular, ambos compuestos mostraron una unión cercana al sitio catalítico de PTP1-B, mientras que en ratas diabéticas inducidas por STZ ambos compuestos presentaron una actividad antidiabética al disminuir los niveles de glucosa en plasma, lo cual sugiere que ambos triterpenos están relacionados con la mejora en la sensibilidad a la insulina (Ramírez et al., 2011).

Aunque nuestros resultados en el modelo *in vivo* no fueron del todo concluyentes, podemos destacar que a pesar de que los animales se alimentaron con dieta DCAF, parámetros importantes como glucosa y triglicéridos, se mantuvieron en niveles parecidos a los animales tratados con dieta DE debido a los tratamientos con AO y AU. Además, las curvas de glucosa y de RI arrojan datos importantes en relación con las propiedades biológicas de estos compuestos asociados con sus efectos antihiper glucémico, hipolipidémico y sensibilizante de la insulina. Es necesario realizar futuros estudios en este modelo para analizar a nivel molecular genes importantes que regulan el metabolismo de glucosa y colesterol. La Figura 17, describe el posible mecanismo de activación de estos triterpenos, lo cual podría conducir a una nueva alternativa de activación dual en los tejidos, principalmente aquellos afectados por la RI, con la finalidad de proponerlos como agonistas duales reguladores del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Fig. 17).

## Mioblastos y adipocitos



**Figura 17. Posible mecanismo de activación del AO y AU.** El AO y el AU se unen como moléculas agonistas a PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ ; una vez unidas, se forma el heterodímero con el receptor retinoide X y se lleva a cabo la fosforilación de los PPAR. Los PPAR activos se dirigen a secuencias específicas del DNA (PPARE) donde, con la ayuda de diferentes coactivadores, inician la transcripción de genes que regulan el metabolismo de lípidos (FATP-1, ACSL) y carbohidratos (AdipoQ, GLUT4). Por otra parte, ambos tritérpenos se unen a IRS-1, que posteriormente inicia la activación de la señalización de la insulina, culminando con la translocación de GLUT 4 hacia la membrana celular, permitiendo así la entrada de la glucosa a la célula para su metabolización.



## 14. CONCLUSIONES

1. El AO activa el RNAm y la proteína de PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  *in vitro* en mioblastos C2C12 y adipocitos 3T3-L1.
2. El AO activa la expresión de genes y proteínas clave en la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos en los mioblastos C2C12.
3. El AO y el AU, participan en la translocación de GLUT-4, posiblemente a través de la activación de IRS-1 y el resto de la cascada de señalización de la insulina en los mioblastos C2C12.
4. Ambos triterpenos no inducen cambios en la acumulación de lípidos en los adipocitos 3T3-L1, lo cual puede asociarse con su efecto hipolipidémico en modelos sistémicos.
5. Los triterpenos disminuyeron los niveles de colesterol y triglicéridos en el modelo de dieta de cafetería.
6. El AO y el AU mejoran respuesta en la PTGO y en la curva de RI, lo cual puede asociarse con su efecto antihiper glucémico.
7. El AO y el AU pueden ser considerados como moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos que, por un lado, participen en la homeostasis de la glucosa y, por el otro, mantengan niveles normales de lípidos, contrarrestando los efectos deletéreos debidos a DM2.

## 15. PERSPECTIVAS

- Confirmar a través de un estudio de docking molecular o mediante la técnica de TR- FRET el efecto agonista dual del AO sobre PPAR $\alpha/\gamma$ .
- Evaluar el efecto del AO sobre la expresión de IRS-1 en células C2C12.
- Evaluar el efecto del AO sobre genes y proteínas importantes que participan en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en células C2C12.
- Determinar el efecto del AO sobre la expresión de PPAR  $\alpha/\gamma$ , así como sus genes regulados en un modelo de síndrome metabólico.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B.D., 2009. **Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha , beta, and gamma in rodent and human development** *Reprod. Toxicol.* 27, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.001>
- Ahmadipour, F., Vakili, T., Absalan, A., Mohiti-ardakani, J., Hadinedoushan, H., Khalili, M., Pourrajab, F., 2013. **C2C12 cell line is a good model to explore the effects of herbal extracts on glut4 expression and translocation.** *Iran. J. Diabetes Obes.* 4, 143–151.
- Akoumianakis, I., Antoniadis, C., 2017. **Dipeptidyl peptidase IV inhibitors as novel regulators of vascular disease.** *Vascul. Pharmacol.* 96–98, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.07.001>
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006.  **$\alpha$  -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes ; with particular reference to *Phyllanthus amarus*.** *J. Ethnopharmacol.* 107, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.004>
- Amauchi, T.Y., Amon, J.K., Aki, H.W., Erauchi, Y.T., Ubota, N.K., Ara, K.H., Ori, Y.M., 2001. **The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity.** *Nat. Med.* 7, 941–946.
- Amber-vitos, O., Chaturvedi, N., Nachliel, E., Gutman, M., Tsfadia, Y., 2016. **The effect of regulating molecules on the structure of the PPAR-RXR complex.** *BBA- Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 1852–1863.
- America, P.N., Park, T., 2005. **A Comparison of Lipid and Glycemic Effects of Pioglitazone and Rosiglitazone in Patients With Type 2 Diabetes.** *Diabetes Care* 28, 1547–1554.
- Arner, P., 2015. **Fatty acids, obesity and insulin resistance.** *Obes. Rev.* 2015, 147–155.
- Ascaso, J.F., 2013. **Diabetes mellitus tipo 2 : nuevos tratamientos.** *Med. Clin.*

(Barc). 2649, 7. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.041>

- Atsuura, N.M., Amo, K.G., Iyachi, H.M., Inuma, M.I., Awada, T.K., Akahashi, N.T., Kao, Y.A., Osa, H.T., 2013.  **$\gamma$ -mangostin from garcinia mangostana pericarps as a dual agonist that activates both PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$** . Biosci. Biotechnol. Biochem. 130541, 1–6.
- Azevedo, M.F., Camsari, Ç., Sá, C.M., Lima, C.F., Fernandes-ferreira, M., Pereira-wilson, C., 2010. **Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3**. Phyther. Res. 224, 220–224.
- Azhar, S., 2011. **Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease**. Future Cardiol. 6, 657–691. <https://doi.org/10.2217/fca.10.86>. Peroxisome
- Azhar, S., 2010. **Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease**. Future Cardiol. 6, 657–691.
- Bae, J., Kim, G., Lee, Y.L.B., 2019. **Differential Effects of Thiazolidinediones and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors on Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Function in Type 2 Diabetes Mellitus: A Propensity Score-Matched Analysis**. Diabetes Ther. 10, 149–158. <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0541-y>
- Baron, A.D., 1998. **Postprandial hyperglycaemia and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors**. Diabetes Res. Clin. Pract. 8227, 51–55.
- Berger, J.P., Akiyama, T.E., Meinke, P.T., 2005. **PPARs: Therapeutic targets for metabolic disease**. Trends Pharmacol. Sci. 26, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.003>
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. **Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption**. Toxicol. Lett. 24, 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
- Bronson, J., Black, A., Dhar, M., Ellsworth, B., Robert Merritt, J., 2014. **To market, to market-2013**. 1st ed, Annual Reports in Medicinal Chemistry. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800167-7.00027-4>

- Byers, M.S., Howard, C., Wang, X., 2017. **Avian and Mammalian Facilitative Glucose Transporters**. *Microarrays* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3390/microarrays6020007>
- Camer, D., Yu, Y., Szabo, A., Huang, X.F., 2014. **The molecular mechanisms underpinning the therapeutic properties of oleanolic acid, its isomer and derivatives for type 2 diabetes and associated complications**. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1750–1759. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300861>
- Canivell, S., Gomis, R., 2014. **Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus**. *Autoimmun. Rev.* 13, 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.020>
- Cariou, B., Zair, Y., Staels, B., Bruckert, E., 2011. **Effects of the new dual PPAR $\alpha$ / $\delta$  agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism**. *Diabetes Care* 34, 2008–2014. <https://doi.org/10.2337/dc11-0093>
- Castellano, J.M., Guinda, A., Delgado, T., Rada, M., Cayuela, J.A., 2013. **Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes**. *Diabetes* 62, 1791–1799. <https://doi.org/10.2337/db12-1215>
- Cave, E., Crowther, N.J., 2018. **The Use of 3T3-L1 Murine Preadipocytes as a Model of Adipogenesis**. *Sex Brain* 1916, 263–272. <https://doi.org/10.7551/mitpress/7458.003.0036>
- Chappell, J., 2002. **The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami**. *Plant Biotechnol.* 5, 151–157.
- Chen, S., Wen, X., Zhang, W., Wang, C., Liu, J., Liu, C., 2017. **Hypolipidemic effect of oleanolic acid is mediated by the miR-98-5p/PGC-1 $\beta$  axis in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice**. *FASEB J.* 31, 1085–1096. <https://doi.org/10.1096/fj.201601022R>
- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., Malanda, B., 2019. **IDF Diabetes Atlas: Global estimates of**

- diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.** *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.02.023>
- Chomczynski, P., 1993. **A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.** *Biotechniques* 15, 532–537.
  - Chu, X., He, X., Shi, Z., Li, C., Guo, F., Li, S., Li, Y., Na, L., Sun, C., 2015. **Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and  $\beta$ -oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle.** *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 1491–1503. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400670>
  - Clavijo, M.A., Gómez, D., Gómez, C.J., 2007. **In vitro adipogenesis of 3T3-L1 cells.** *Rev. Med* 15, 170–176.
  - Coll, T., Rodríguez, R., Barroso, E., Serrano, L., Eyre, E., Palomer, X., Vázquez, M., 2009. **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): A new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome.** *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 46–55.
  - Contreras, E., Blancas, G., Cruz, M., Almanza, J.C., Gomez, J.H., Ventura, J.L., Zentella, A., Lazzarini, R., Roman, R., Alarcon, F.J., 2018. **Participation of the IKK- $\alpha/\beta$  complex in the inhibition of the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes.** *Biomed.Pharmacother.* 102, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.048>
  - Cristancho, A.G., Lazar, M.A., 2011. **Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation.** *Nat. Publ. Gr.* 12, 722–734. <https://doi.org/10.1038/nrm3198>
  - Dall, T.M., Yang, W., Halder, P., Pang, B., Massoudi, M., Wintfeld, N., Semilla, A.P., Franz, J., Hogan, P.F., 2014. **The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: Diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational diabetes mellitus, and prediabetes.** *Diabetes Care* 37, 3172–3179. <https://doi.org/10.2337/dc14-1036>

- Davidson, M.A., Mattison, D.R., Azoulay, L., Krewski, D., Davidson, M.A., Mattison, D.R., Azoulay, L., Krewski, D., 2017. **Critical reviews in toxicology thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus : past, present and future.** Crit. Rev. Toxicol. 48, 1–57. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1351420>
- de Melo, C.L., Queiroz, M.G.R., Fonseca, S.G.C., Bizerra, A.M.C., Lemos, T.L.G., Melo, T.S., Santos, F.A., Rao, V.S., 2010. **Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet.** Chem. Biol. Interact. 185, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.028>
- Defronzo, R.A., 2017. **Combination therapy with GLP-1 receptor agonist and SGLT2 inhibitor.** Diabetes, Obes. Metab. 19, 1353–1362. <https://doi.org/10.1111/dom.12982>
- Díaz, M., Baiza, L.A., 2019. **Biochemical mechanisms of vascular complications in Diabetes.** Diabetes Textb. 695–707. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11815-0>
- Díaz, M., Baiza, L.A., Ibáñez, M.Á., Pascoe, D., Guzmán, A.M., Kumate, J., 2004. **Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica.** Gac. Med. Mex. 140, 437–448.
- Djeziri, F.Z., Belarbi, M., Murtaza, B., Hichami, A., Benammar, C., Khan, N.A., 2018. **Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice.** Biochimie 152, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.025>
- Du, X., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M., 2000. **Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasmonogen activator inhibitos-1 expression by increasing Sp1 glycosylation.** PNAS 97, 12222–12226.
- Ehrenborg, E.W.A., Krook, A., 2009. **Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated**

**Receptor.** *Pharmacol. Rev.* 61, 373–393.

<https://doi.org/10.1124/pr.109.001560.373>

- Elissondo, N., Rosso, L.G., Maidana, P., Brites, F., 2008. **Adiponectina : una adipocitoquina con múltiples funciones protectoras \* protective functions.** *Acta Biochim. Clin. Latinoam.* 42, 17–33.
- Ezebuonyi, M., Jimoh, A., Ambush, E., Nguyen, A., Summers, B., Ozah, M., Obih, J., Obih, P., 2017. **Evaluation of selected medicinal herbs for antidiabetic activity via alpha-glucosidase inhibition.** *International J. Gen. Med.* 6, 59–64.
- Fazeli Farsani, S., Van Der Aa, M.P., Van Der Vorst, M.M.J., Knibbe, C.A.J., De Boer, A., 2013. **Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: A systematic review and evaluation of methodological approaches.** *Diabetologia* 56, 1471–1488. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2915-z>
- Fernandes, J., Arau, K., 2011. **Oleanolic Acid Initiates Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Reduces Metastasis of a B16F10 Melanoma Model.** *In Vivo.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028596>
- Ferre, P., 2004. **The Biology of Peroxisome Proliferator–Activated Receptors.** *Diabetes* 53, 43–50.
- Fève, B., 2005. **Adipogenesis: Cellular and molecular aspects.** *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 483–499. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.007>
- Figueredo, E.A., Andrés, F., Sanamé, R., Pérez, M.L., 2016. **Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 y una nueva estrategia farmacológica en la diabetes mellitus tipo 2 Inhibitors of dipeptidil peptidase 4 new pharmacologic strategic in the diabetes mellitus type 2.** *Rev. Cubana Med.* 55, 239–256.
- Fillion, K.B., Yu, O.H., Azoulay, L., 2019. **Sulfonylureas as initial treatment for type 2 diabetes and the risk of adverse cardiovascular events : A population - based cohort study.** *Br. Pharmacol. Soc.* 85, 2378–2389. <https://doi.org/10.1111/bcp.14056>



- Fortis, M. de los Á., Alarcón, F.J., Becerril, A., Flores, J., Almanza, J.C., García, M., Lazzarini, R., Román, R., Blancas, G., 2019. **Mechanism of the Hypoglycemic Activity and Hepatoprotective Effect of the Aqueous Extract of Cecropia obtusifolia**. *Bertol. J. Med. Food* 00, 1–10. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0126>
- Francis, G.A., Auwerx, J., Gordon, A., Au-, J., 2003. **PPAR- $\alpha$  effects on the heart and other vascular tissues**. *J. Physiology Hear. Circ* 285, H1–H9.
- Fröjdö, S., Vidal, H., Pirola, L., 2009. **Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans**. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.019>
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Kinoshita, T., Homma, K.J., Onoduka, J., Mori, M., Yamaguchi, S., Makita, M., Higashi, Y., Yamashita, A., Takano, T., 2007. **Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7**. *J. Lipid Res.* 48, 1280–1292. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700050-JLR200>
- Gamede, M., Mabuza, L., Ngubane, P., Khathi, A., 2018. **The effects of plant-derived oleanolic acid on selected parameters of glucose homeostasis in a diet-induced pre-diabetic rat model**. *Molecules* 23, 3–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23040794>
- Gan, M.J., Albanese-O'Neill, A., Haller, M.J., 2012. **Type 1 diabetes: Current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research**. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 42, 269–291. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2012.07.002>
- Gao, Dawei, Li Qingwang, Li Ying, L.Z., 2008. **Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from Ligustrum lucidum in alloxan-induced diabetic rat**. *Phyther. Res.* 22, 544–549. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Gao, D., Li, Q., Li, Y., Liu, Zhihua, Liu, Zhiwei, Fan, Y., Han, Z., Li, J., Li, K., 2007. **Antidiabetic potential of oleanolic acid from Ligustrum lucidum Ait.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85, 1076–1083. <https://doi.org/10.1139/Y07-098>

- Garcia, R., Sanchez, F., Almanza, J.C., Duran, G., Alarcon, F., Cruz, M., 2008. **Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells.** Eur. J. Pharmacol. 587, 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.051>
- Giacomán, A., Alarcón, F.J., Zamilpa, A., Hidalgo, S., Navarrete, G., García, R., Román, R., Almanza, J.C., 2019. **Triterpenoids from Hibiscus sabdariffa L. with PPAR $\delta$ / $\gamma$  dual agonist action: *In vivo*, *in vitro* and *in silico* studies.** Planta Med. 85, 412–423. <https://doi.org/10.1055/a-0824-1316>
- Girroir, E.E., Hollingshead, H.E., He, P., Zhu, B., Perdew, G.H., Peters, J.M., 2008. **Biochemical and Biophysical Research Communications Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor protein in mice.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 371, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.086>
- Glinghammar, B., Berg, A.L., Bjurström, S., Stockling, K., Blomgren, bo, Westerberg, R., Skånberg, I., Hellmold, H., Andersson, U., 2011. **Proliferative and molecular effects of the dual PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonist tesaglitazar in rat adipose tissues: relevance for induction of fibrosarcoma.** Toxicol. Pathol. 39, 325–336. <https://doi.org/10.1177/0192623310394210>
- Gomez, M., Fourcade, L., Mateescu, M.A., Paquin, J., 2017. **Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds.** Anal. Biochem. 535, 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.027>
- Goodwin, T.W., 2015. **Of terpenoids.** Annu. Rev. Plant Physiology 30, 369–404.
- Han, L., Shen, W., Bittner, S., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2017a. **PPARs : regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease . Part II : PPAR-  $\beta$ / $\delta$  and PPAR-  $\gamma$ .** Future Cardiol. 13, 19.
- Han, L., Shen, W., Bittner, S., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2017b. **PPARs : regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease . Part I : PPAR-  $\alpha$ .** Future Cardiol. 13, 259–278.
- Hansen, J.B., Zhang, H., Rasmussen, T.H., Petersen, R.K., Flindt, E.N., Kristiansen, K., M, D.-O., 2001. **Peroxisome Proliferator-activated Receptor**

**$\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) -mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling \***. J. Biol. Chem. 276, 3175–3182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005567200>

- Haslam, D., 2017. **Gender-specific aspects of obesity**. Lancet 2, 179–185.
- He, Y., Li, W., Li, Y., Zhang, S., Wang, Y., Sun, C., 2014. **Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes**. PLoS One 9, e110711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110711>
- Hevener, A.L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R.M., Olefsky, J., 2003. **Muscle-specific PPAR $\gamma$  deletion causes insulin resistance**. Nat. Med. 9, 1491–1497. <https://doi.org/10.1038/nm956>
- Hidalgo, S., Navarrete, G., Estrada, S., Giles, D., Alarcón, F.J., León, I., Giacomán, A., Miranda, E., Almanza, J.C., 2017. **Discovery of new dual PPAR $\gamma$ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: Design, synthesis and in combo drug evaluation**. Biomed. Pharmacother. 90. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.033>
- Hidalgo, S., Ramírez, J.J., Estrada, S., Almanza, J.C., Román, R., Alarcón, F.J., Hernández, J. V., Moreno, H., Díaz, D., Navarrete, G., 2013. **Discovery of thiazolidine-2,4-Dione/Biphenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR  $\alpha/\gamma$  modulator with antidiabetic effect: *In vitro*, *In silico* and *In vivo* approaches**. Chem. Biol. Drug Des. 81, 474–483. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12102>
- Hong, T., Thi, N., Ngan, T., Minh, C. Van, Kiem, P. Van, Huu, B., 2012. **Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of *Asarum sieboldii***. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 2527–2533. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.136>
- Hsu, J.H., Wu, Y.C., Liu, I.M., Cheng, J.T., 2006. **Release of acetylcholine to raise insulin secretion in Wistar rats by oleanolic acid, one of the active principles contained in *Cornus officinalis***. Neurosci. Lett. 404, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.05.025>
- Hsu, W., Chen, T., Lee, B., Hsu, Y., Pan, T., 2014. **Monascin and ankaflavin**

**act as natural AMPK activators with PPAR a agonist activity to down-regulate nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed C57BL / 6 mice.**

FOOD Chem. Toxicol. 64, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.015>

- Huang, Tom H W, Hons, B.P., Yang, Q., Harada, M., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. **Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in zucker diabetic fatty rats.** J. Cardiovasc. Pharmacol 46, 856–862.
- Huang, Tom H.W., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, B.D., Li, Y., 2005. **Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: Activation of PPAR-γ and identification of an active component.** Toxicol. Appl. Pharmacol. 207, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.009>
- Ismail, A.M., 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Jackson, W., Hofman, P.L., Robinson, E.M., Elliot, R.B., Pilcher, C.C., Cutfield, W.S., 2001. **The changing presentation of children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus.** Pediatr. Diabetes 2, 154–159. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5448.2001.20403.x>
- Jay, M.A., Ren, J., 2007. **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus ( PPAR ) in Metabolic.** Curr. Diabetes Rev. 3, 33–39.
- Jayaprakasam, B., Olson, L.K., Schutzki, R.E., Tai, M.H., Nair, M.G., 2006. **Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherry (Cornus mas).** J. Agric. Food Chem. 54, 243–248. <https://doi.org/10.1021/jf0520342>
- Jean-franc, J.K., Alain, V.R., Paule, M., Paulette, D., Grynberg, A., Lairon, D., Planells, R., Gastaldi, M., 2013. **Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha.** Eur. J. Nutr. 52, 1865–1874. <https://doi.org/10.1007/s00394-012->

0488-0

- Jia, Y., Kim, J., Jun, H., Kim, S., Lee, J., Hien, M., Sook, H., Ihl, H., Hwang, K., Um, S., Lee, S., 2013. **Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid**. BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1831, 698–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.11.012>
- Jia, Y., Kim, S., Kim, J., Kim, B., Wu, C., Lee, J.H., Jun, H. jin, Kim, N., Lee, D., Lee, S.J., 2015. **Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy**. Mol. Nutr. Food Res. 59, 344–354. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400399>
- Johnson, A.R., Wilkerson, M.D., Sampey, B.P., Troester, M.A., Hayes, D.N., Makowski, L., 2016. **Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 473, 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.113>
- Johnson, T.O., Ermolieff, J., Jirousek, M.R., 2002. **Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes**. Nat. Rev. Drug Discov. 1, 696–709. <https://doi.org/10.1038/nrd895>
- Juillerat-jeanneret, L., 2014. **Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors : therapeutics for type 2 diabetes and what else** Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors : therapeutics for type 2 diabetes and what else. J. Med. Chem. 57, 2197–2212. <https://doi.org/10.1021/jm400658e>
- Juliane, Q., Ahangarian, B., Fulda, S., 2015. **Smac mimetic and oleanolic acid synergize to induce cell death in human hepatocellular carcinoma cells**. Cancer Lett. 15, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.018>
- Kahn, C.R., Chen, L., Cohen, S.E., 2000. **Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones**. J. Clin. Invest. 106, 1305–1307.
- Kim, S., Young, H., Lee, W., Man, G., Seob, W., Kee, Y., 2008. **Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from Sargassum yezoense stimulate adipocyte differentiation through PPAR  $\alpha$  /  $\gamma$  activation in 3T3-L1 cells**. FEBS Lett. 582, 3465–3472. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.011>

- Kintscher, U., Law, R.E., 2005. **PPAR  $\gamma$  -mediated insulin sensitization : the importance of fat versus muscle.** Am. J. Endocrinol. Metab. 288, 287–291. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00440.2004>.
- Kluth, O., Mirhashemi, F., Scherneck, S., Kaiser, D., Kluge, R., Neschen, S., Joost, H.G., Schürmann, A., 2011. **Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: Role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure.** Diabetologia 54, 605–616. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1973-8>
- Kooptiwut, S., Kebede, M., Zraika, S., Visinoni, S., Aston-Mourney, K., Favaloro, J., Tikellis, C., Thomas, M.C., Forbes, J.M., Cooper, M.E., Dunlop, M., Proietto, J., Andrikopoulos, S., 2005. **High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction.** J. Mol. Endocrinol. 35, 39–48. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01720>
- Kunkel, S.D., Elmore, C.J., Bongers, K.S., Ebert, S.M., Fox, D.K., Dyle, M.C., Bullard, S.A., Adams, C.M., 2012. **Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease.** PLoS One 7, e39332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039332>
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Ohtomo, T., Yamada, J., Nishiyama, T., Mae, T., Kishida, H., Kawada, T., 2012. **Hypoglycemic effects of clove (Syzygium aromaticum flower buds) on genetically diabetic KK-A y mice and identification of the active ingredients.** J. Nat. Med. 66, 394–399. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0593-z>
- Kwak, H.J., Choi, H., Jang, J., Park, S.K., 2016. **Suppression of Adipocyte Differentiation by foenumoside B from Lysimachia foenum- graecum is mediated by PPAR  $\gamma$  antagonism.** PLoS One 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155432>
- Lebovitz, H.E., 2019. **Thiazolidinediones : the Forgotten Diabetes Medications.** Curr. Diabetes Rev. 19, 1–13.

- Lee, A.J., Cho, Y., Lee, M., Eun, B.L., Kang, S., 2017. **Clinical efficacy of the novel thiazolidinedione lobeglitazone in patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Metab.* 44, 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.11.005>
- Lee, C., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., Evans, R.M., 2006. **PPAR $\delta$  regulates glucose metabolism and insulin sensitivity.** *PNAS* 28, 3444–3449.
- Lee, J., Kim, D., Choi, J., Choi, H., Ryu, J., Jeong, J., Park, E., Kim, Seon-hee, Kim, Sunyoung, 2012. **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.* 287, 8839–8851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263434>
- Lefterova, M.I., Haakonsson, A.K., Lazar, M.A., Mandrup, S., 2014. **PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond.** *Trends Endocrinol. Metabolism* 25, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.04.001>
- Leslie, R.D., Palmer, J., Schloot, N.C., Lernmark, A., 2016. **Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment.** *Diabetologia* 59, 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3789-z>
- Levetan, C., 2007. **Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes.** *Curr. Med. Res. OPINION* 23, 945–952. <https://doi.org/10.1185/030079907X178766>
- Li, M., Han, Z., Bei, W., Rong, X., Guo, J., Hu, X., 2015a. **Oleanolic Acid Attenuates Insulin Resistance via NF- $\kappa$ B to Regulate the IRS1-GLUT4 Pathway in HepG2 Cells.** *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/643102>
- Li, M., Han, Z., Bei, W., Rong, X., Guo, J., Hu, X., 2015b. **Oleanolic acid attenuates insulin resistance via NF- $\kappa$ B to regulate the IRS1-GLUT4 pathway in HepG2 Cells.** *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/643102>
- Li, S., Meng, F., Liao, X., Wang, Y., Sun, Z., Guo, F., Li, X., Meng, M., Li, Y., Sun, C., 2014. **Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-**

- alcoholic fatty liver disease rats.** PLoS One 9, 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086724>
- Li, X., Liu, Z.Q., 2017. **Pharmacogenetic factors that affect drug metabolism and efficacy in Type 2 Diabetes Mellitus.** Drug Metab. Dis. 157–179.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802949-7.00007-9>
  - López, M.C., Velasco, E., Kumate, J., 2001. **Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa.** Gac. Med. Mex. 137, 135–146.
  - Loviscach, M., Rehman, N., Carter, L., Mudaliar, S., Mohadeen, P., Ciaraldi, T.P., Veerkamp, J.H., Henry, R.R., 2000. **Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: Relation to insulin action.** Diabetologia 43, 304–311.  
<https://doi.org/10.1007/s001250050048>
  - Lu, J., Wu, D. mei, Zheng, Y. lin, Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. feng, Shan, Q., 2011. **Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and IκB kinase β/nuclear factor-κB-mediated inflammatory pathways in mice.** Brain. Behav. Immun. 25, 1658–1667. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.009>
  - Lv, W., Wang, X., Xu, Q., Lu, W., 2020. **Mechanisms and characteristics of sulfonylureas and glinides.** Curr. Top. Med. Chem. 20, 37–56.  
<https://doi.org/10.2174/1568026620666191224141617>
  - Madrigal-bujaidar, N.G.E., 2012. **Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus.** Bioquímica 28, 113–117.
  - Maedler, K., 2008. **Beta cells in type 2 diabetes - A crucial contribution to pathogenesis.** Diabetes, Obes. Metab. 10, 408–420.  
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00718.x>
  - Magliano, D.J., Islam, R.M., Barr, E.L.M., Gregg, E.W., Pavkov, M.E., Harding, J.L., Tabesh, M., Koye, D.N., Shaw, J.E., 2019. **Trends in incidence of total or type 2 diabetes: Systematic review.** BMJ 366, 1–12.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.l5003>
  - Manda, G., Checherita, A., Comanescu, M.V., Hinescu, M.E., 2015. **Redox**



**signaling in diabetic nephropathy : hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes.** Mediators Inflamm. 2015, 13 pages. <https://doi.org/604208>

- Mansour, M., 2014. **The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome, 1st ed, glucose homeostatis and the pathogenesis of diabetes mellitus.** Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800101-1.00007-7>
- Manzur, F., Alvear, C., Alayón, A.N., 2010. **Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease [Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular].** Rev. Colomb. Cardiol. 17, 207–213.
- Martire, S.I., Holmes, N., Westbrook, R.F., Morris, M.J., 2013. **Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity.** PLoS One 8, e60407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060407>
- Mateos, N., Cruz, S., Zacarías, R., Rogelio, C., Castillo, Z., Castillo, R.Z., 2002. **Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus.** Rev Hosp Gral Dr. M Gea González 5, 33–41.
- Miranda, M.E., Ortega, C., Del Carmen, M., Blancas, G., Alarcon, F.J., 2016. **Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum.** J. Ethnopharmacol. 188, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.061>
- Mitra, S., Sangle, G., Tandon, R., Sharma, S., Roy, S., Khanna, V., Gupta, A., Sattigeri, J., Sharma, L., Priyadarsiny, P., Khattar, S.K., Bora, R.S., Saini, K.S., Bansal, V.S., 2007. **Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonist, in db/db mice: Adipogenesis/or oedema.** Br. J. Pharmacol. 150, 480–487. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707000>
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Latruffe, N., 1998. **Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor and activators in a tissue- and**

**inducer-specific manner** \*. J. Biol. Chem. 273, 16710–16714.

- Nanjan, M.J., Mohammed, M., Kumar, B.R.P., Chandrasekar, M.J.N., 2018. **Bioorganic chemistry thiazolidinediones as antidiabetic agents : A critical review**. Bioorg. Chem. 77, 548–567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>
- Nataraju, A., Saini, D., Ramachandran, S., Benshoff, N., Liu, W., Chapman, W., Mohanakumar, T., 2009. **Oleanolic acid, a plant triterpenoid, significantly improves survival and function of islet allograft**. Transplantation 88, 987–994. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b9cbc4>
- Neels, J.G., Grimaldi, P.A., 2014. **Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor**. Physiol. Rev. 6, 795–858. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2013>
- Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R., Ivo, P., Bittencourt, H. De, 2016. **Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes**. Biochem. J. 4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- Oliver, W.R., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C., Willson, T.M., 2001. **A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport**. PNAS 98, 5306–5311.
- Omaki, E.K., Amaguchi, S.Y., Aru, I.M., Inoshita, M.K., Akehi, K.K., Hta, Y.O., Sukada, Y.T., 2003. **Identification of anti-  $\alpha$ -amylase components from olive leaf extracts**. Food Sci. Technol. Rev. 9, 35–39.
- Ortiz, R.R., García, S., Castillo, P., Ramírez, G., Villalobos, R., Estrada, S., 2007.  **$\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent**. J. Ethnopharmacol. 109, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.002>
- Ozougwu, O., 2018. **The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus**. J. Physiol. Pathophysiol. 4, 46–57. <https://doi.org/10.5897/jpap2013.0001>
- Panadero, M.I., González, C., Herrera, E., 2008. **Modulación del PPAR por**

**agentes farmacológicos y naturales y sus implicaciones metabólicas.** Clin. Investig. Atherosclerotic 20, 259–289.

- Perez, R.M., 2017. **Hypolipidemic and hypoglycemic activities of a oleanolic acid derivative from Malva parviflora on streptozotocin-induced diabetic mice.** Pharmacol Res. 40, 550–562. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0873-y>
- Pollier, J., Goossens, A., 2012. **Oleanolic acid.** Phytochemistry 77, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.022>
- Polonsky, K.S., 2012. **The past 200 years in diabetes.** N. Engl. J. Med. 367, 1332–1340. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110560>
- Polvani, S., Tarocchi, M., Tempesti, S., Bencini, L., Galli, A., 2016. **Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer.** World J. Gastroenterol. 22, 2441–2459. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i8.2441>
- Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., Mandrup, S., 2012. **PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism.** Semin. Cell Dev. Biol. 23, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>
- Pyper, S.R., Viswakarma, N., Yu, S., Reddy, J.K., 2010. **PPAR  $\alpha$ : energy combustion , hypolipidemia, inflammation and cancer.** J. Nucl. Recept. Signal. Atlas 8, 21. <https://doi.org/10.1621/nrs.08002>
- Ramírez, J., Rios Y., Paoli, P., Jos, J., Flores, V., Camici, G., Rosa, V., Estrada, S., Hidalgo, S., Navarrete, G., 2014. **Synthesis of oleanolic acid derivatives : In vitro , in vivo and in silico studies for PTP-1B inhibition.** Eur. J. Med. Chem. 87, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.036>
- Ramírez, J., Rios Y., Paoli, P., Jos, J., Flores, V., Camici, G., Rosa, V., Estrada, S. 2011. **Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches.** Eur. J. Med. Chem. 46: 2243-2251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.005>
- Rao, V.S., De Melo, C.L., Queiroz, M.G.R., Lemos, T.L.G., Menezes, D.B., Melo, T.S., Santos, F.A., 2011. **Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from**

**sambucus australis, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet.** *J. Med. Food* 14, 1375–1382. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0267>

- Reilly, S.M., Lee, C., 2009. **PPAR $\delta$  as a therapeutic target in metabolic disease.** *FEBS Lett* 582, 26–31.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. **Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity.** *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Reyes. M, 2012. **Características biológicas del tejido adiposo.** *Rev. Med Clin.CONDES* 23, 23(2).
- Rizos, C. V, Kei, A., Elisaf, M.S., 2016. **The current role of thiazolidinediones in diabetes management.** *Arch. Toxicol.* 90, 1861–1881. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1737-4>
- Ruiten, C.C. Van, Muskiet, M.H.A., Bloemendaal, L. Van, 2018. **SGLT2 inhibitors in combination therapy: from mechanisms to clinical considerations in type 2 diabetes management.** *Diabetes Care* 41, 1543–1556. <https://doi.org/10.2337/dc18-0588>
- Sampey, B.P., Vanhoose, A.M., Winfield, H.M., Freerman, A.J., Muehlbauer, M.J., Fueger, P.T., Newgard, C.B., Makowski, L., 2011. **Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet.** *Obesity* 19, 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
- Serrano, M., Cascales, M., Larrad, T., 2016. **The obesity pandemic. The pathophysiological links: endocrine adipose cell dysfunction, inflammation and insulin resistance.** *An Real Acad Farm* 82, 182–194.
- Shafat, A., Murray, B., Rumsey, D., 2009. **Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat.** *Appetite* 52, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.07.004>
- Shanmugam, M.K., Dai, X., Prem, A., Tan, B.K.H., Sethi, G., Bishayee, A., 2014. **Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence.** *Cancer Lett.* 346, 206–216.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.016>

- Sharabi, Y., 2012. **Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabesotension)**. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 1–14. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2371>
- Simonsen, U., Rodriguez-rodriguez, R., Dalsgaard, T., Buus, N.H., Stankevicius, E., 2009. **Novel approaches to improving vasodilatation**. *Pharmacol. Reports* 61, 105–115. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70012-X](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70012-X)
- Somova, L.I., Shode, F.O., Mipando, M., 2004. **Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol**. *Phytomedicine* 11, 121–129.
- Song, R., 2016. **Mechanism of Metformin : A Tale of Two Sites**. *Diabetes Care* 39, 187–189. <https://doi.org/10.2337/dci15-0013>
- Studies, P., Health, P., 2018. **A pharmacovigilance approach for assessing cardiovascular , osteological , and carcinogenic risk associated with thiazolidinedione drugs used in the treatment of type 2 diabetes mellitus** Melissa Anne Davidson , MSc. *Popul. Heal.*
- Sundaresan, A., Radhiga, T., Pugalendi, K.V., 2014. **Effect of ursolic acid and Rosiglitazone combination on hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed C57BL/6J mice**. *Eur. J. Pharmacol.* 741, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.032>
- Sung, H.Y., Kang, S.W., Kim, J.L., Li, J., Lee, E.S., Gong, J.H., Han, S.J., Kang, Y.H., 2010. **Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes**. *Nutr. Res.* 30, 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.10.001>
- Tan, C.K., Zhuang, Y., Wahli, W., 2017. **Synthetic and natural Peroxisome Proliferator- Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome**. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 333–348. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1280467>
- Taneja, N., Kukal, S., Biology, I., Mani, S., 2015. **Current treatments for type**

**2 diabetes , their side effects and possible.** Int. J. Pharm. Pharmaceutical Sci. 7, 13.

- Thi, D., Trong, D., Bich, N., Xuan, N., Minh, T., Yim, N., 2009. Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex ( *Paeonia suffruticosa* , Paeoniaceae ) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 5556–5559. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.048>
- Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., 2008. **Fat and Beyond : The diverse biology of PPAR  $\gamma$ .** Annu. Rev. Biochem. 77, 289–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829>
- Tsukamoto, T., Nakata, R., Tamura, E., Kosuge, Y., Kariya, A., Katsukawa, M., 2010. **Vaticanol C , a resveratrol tetramer, activates PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  /  $\delta$  in vitro and in vivo.** Nutr. Metab. (Lond). 46, 1–8.
- Ugwoke, C., Slokar, U., Umek, N., 2017. **Sulfonylureas in type 2 diabetes mellitus: current evidence, conflicts and clinical implications.** Niger. J. Med. 26, 68–75. <https://doi.org/10.4103/1115-2613.278836>
- Unoki, K.E.Y., Asaki, G.A.K.U.S., Okuji, Y.O.T., Inoshita, M.I.K., Aito, A.K.N., Ida, K.A.A., Hnishi, M.A.O., 2008. **Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis.** J. Agric. Food Chem. 56, 12052–12058. <https://doi.org/doi:10.1021/jf8026217>
- Venkatesan, N., Boggs, K., Liu, H.-X., Koliakos, G., 2015. **A microplate assay for measuring cell death in C2C12 cells.** Tissue Eng. Part C Methods 22, 1–18. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0377>
- Castrejón, V., Roxana Carbó, M.M., 2007. **Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa.** Reb 26, 49–57.
- Wagner, K., Wagner, N., 2010. **Pharmacology & Therapeutics Peroxisome proliferator-activated receptor beta / delta ( PPAR  $\beta$  /  $\delta$  ) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions.** Pharmacol. Ther. 125, 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.12.001>

- Wallace, J.M., Schwarz, M., Coward, P., Houze, J., Sawyer, J.K., Kelley, K.L., Chai, Anne, Rudel, L.L., Chai, A, Effects, L.L.R., 2005. **Effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists on HDL-cholesterol in vervet monkeys**. *J. Lipid Res.* 46, 1009–1016. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500002-JLR200>
- Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., Hai, C., 2013. **Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant , hypolipidemic and anti-inflammatory effects**. *Mol. Cell. Endocrinol.* 376, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.014>
- Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Henke, B.R., 2000. **The PPARs : From orphan receptors to drug discovery**. *J. Med. Chem.* 43, 527–550.
- Wright, M.B., Bortolini, M., Tadayyon, M., Bopst, M., 2014. **Minireview : Challenges and opportunities in development of PPAR agonists**. *Mol. Endocrinol.* 28, 1756–1768. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1427>
- Wu, Q., Ortegon, A.M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K.R., Stahl, A., Iol, M.O.L.C.E.L.L.B., 2006. **FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity**. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3455–3467. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3455>
- Xu, C., Wang, L.L., Liu, H.Y., Zhou, X.B., Cao, T.L., Li, S., 2006. **C333H, a novel PPAR $\alpha$ / $\gamma$  dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism**. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00263.x>
- Yan, L., 2014. **Pathogenesis of chronic hyperglycemia : From reductive stress to oxidative stress**. *J. Diabetes Res.* 2014, 11 pages. <https://doi.org/137919>
- Yang, X., Zhang, P., Zhang, F., Ke, Z., Chen, Q., Liu, C., 2020. **Protective effect of hypoglycemic granule against diabetes-induced liver injury by alleviating glycolipid metabolic disorder and oxidative stress**. *J. Cell. Biochem.* <https://doi.org/10.1002/jcb.29588>
- Yaribeygi, H., Butler, A.E., 2019. Insulin resistance : **Review of the underlying**

**molecular mechanisms.** J. Cell. Physiology 8152–8161.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.27603>

- Yin, C.Y., Ha, T.S., Kadir, K.A., 2010. **Effects of glycyrrhizic acid on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR  $\gamma$ ), lipoprotein lipase (LPL), serum lipid and HOMA-IR in rats.** PPAR Res. 2010, 6.  
<https://doi.org/10.1155/2010/530265>
- Zakaria, E.M., El-maraghy, N.N., Ahmed, A.F., Ali, A.A., Ahmed, A.F., 2017. **PARP inhibition ameliorates nephropathy in an animal model of type 2 diabetes : focus on oxidative stress , inflammation , and fibrosis.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 390, 621–631.  
<https://doi.org/10.1007/s00210-017-1360-9>
- Zeeni, N., Dagher-Hamalian, C., Dimassi, H., Faour, W.H., 2015. **Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation.** Inflamm. Res. 64, 501–512.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-015-0831-z>
- Zeng, X.Y., Wang, Y.P., Cantley, J., Iseli, T.J., Molero, J.C., Hegarty, B.D., Kraegen, E.W., Ye, Y., Ye, J.M., 2012. **Oleanolic acid reduces hyperglycemia beyond treatment period with Akt/FoxO1-induced suppression of hepatic gluconeogenesis in type-2 diabetic mice.** PLoS One 7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042115>
- Zhong, S., Usher, M.G., Mortensen, R.M., 2009. **PPARs : the vasculature , inflammation and hypertension.** Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 18, 128–133. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328325803b>
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M., Shaw, J., 2001. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** Nature 414, 782–787.  
<https://doi.org/10.1038/414782a>





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

Full length article

## Oleanolic acid induces a dual agonist action on PPAR $\gamma$ / $\alpha$ and GLUT4 translocation: A pentacyclic triterpene for dyslipidemia and type 2 diabetes

Hilda Loza-Rodríguez<sup>a</sup>, Samuel Estrada-Soto<sup>b</sup>, Francisco J. Alarcón-Aguilar<sup>c</sup>, Fengyang Huang<sup>d</sup>, Guillermo Aquino-Jarquín<sup>c</sup>, Ángeles Fortis-Barrera<sup>c</sup>, Abraham Giacoman-Martínez<sup>c</sup>, Julio C. Almanza-Pérez<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, México

<sup>b</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Ciudad de México, México

<sup>d</sup> Laboratorio de Investigación en Farmacología, Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Ciudad de México, México

<sup>e</sup> Laboratorio de Investigación en Genómica, Genética y Bioinformática, Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Ciudad de México, México

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Oleanolic acid  
Diabetes mellitus  
PPAR $\gamma$   
PPAR $\alpha$   
Dual agonists  
Myoblasts

## ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disease characterized by defects in glycemia regulation. This disease is associated with alterations in insulin action and lipid metabolism, generating hyperglycemia and dyslipidemias. Currently, it is necessary to develop new or known drugs that promote the sensitization of insulin action. Thus, activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) is probably the key to doing this. PPARs participate in maintaining an energetic balance between storage and the expenditure of energy. The activation of PPAR $\gamma$  produces the storage of energy, mainly as glycogen and fat. Meanwhile, PPAR $\alpha$  activation promotes lipid degradation. Oleanolic acid (OA), a pentacyclic triterpenoid of numerous edible and medicinal plants, decreases hyperglycemia and lipid accumulation. However, the effects on PPARs and their regulated genes are unknown. Our aim was to determine the effects of OA on PPAR $\gamma$ / $\alpha$  expression and their regulated genes (adiponectin, type 4 glucose transporter, fatty acid transport protein, and long-chain acyl-CoA synthetase) in C2C12 myoblasts by RT-PCR, Western blot, GLUT-4 translocation, and lipid storage in 3T3-L1 adipocytes. In C2C12 myoblasts, OA increased the expression of mRNA in both PPAR $\gamma$ / $\alpha$  and their regulated genes; also, PPAR $\gamma$ , GLUT-4, and FATP-1 protein expression increased, as well as GLUT-4 translocation. In 3T3-L1, OA increased the expression of mRNA in both PPAR $\gamma$ / $\alpha$  and maintained lipid storage unchanged. In conclusion, OA exhibited a dual action on PPAR $\gamma$ / $\alpha$ , which might explain in part its antihyperglycemic effect. This compound represents an alternative for designing novel therapeutic strategies in the control of T2D.

## 1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disease characterized by defects in glycemia regulation due to a deficit in insulin secretion or action. Insulin resistance in target tissues (muscle, liver, and adipose tissue) is a main feature of T2D (Canivell and Gomís, 2010). The prevalence of diabetes worldwide was 463 million in 2019, with projections of 578.4 million in 2030 and of 700.2 million in 2045. In Mexico, the prevalence of diabetes was 9.9% (12.8 million people) in 2019 (Cho et al., 2019). Long-term multiple vascular complications associated with T2D are the causes of disability and mortality (Ozougwu, 2014), hence the importance of seeking treatments that not only reduces

glycemia but also delay the development of complications.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) regulate the lipid and carbohydrate metabolism (Monsalve et al., 2013). These factors are considered mediators of the energetic balance between storage and the expenditure of energy (Chiarelli and Di Marzio, 2008). PPAR comprise a family of nuclear transcription factors that belong to the steroid receptor superfamily, are mainly expressed in skeletal muscle, adipose tissue, and macrophages (Berger et al., 2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is involved in adipocyte differentiation, glucose metabolism, and lipid uptake. PPAR $\gamma$  regulates the expression of type 4 glucose transporter (GLUT-4) and adiponectin (AdipoQ), a marker of insulin sensitivity (Xu et al., 2006).

\* Corresponding author. San Rafael Atlxco 186, Col. Vicentina. Iztapalapa, C.P. 09340, Ciudad de México, Mexico.  
E-mail address: [jcap@xanum.uam.mx](mailto:jcap@xanum.uam.mx) (J.C. Almanza-Pérez).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173252>

Received 22 April 2020; Received in revised form 21 May 2020; Accepted 5 June 2020

Available online 10 June 2020

0014-2999/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) regulates the gene expression of lipid metabolism through the fatty acid transport protein 1 (FATP-1) and the long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) (Gross et al., 2017). Thus, PPAR are relevant therapeutic targets for drug design. Thiazolidinediones (TZD) and fibrates are PPAR agonists for the treatment of T2D and dyslipidemia, respectively (Bajaj et al., 2007). However, despite their actions as insulin sensitizers, TZD induce fatty liver. Therefore, the search for new insulin-sensitizer drugs, without actions on lipid storage is mandatory. An alternative for this is through PPAR $\gamma$ / $\alpha$  dual agonists.

Oleanolic acid (OA), a pentacyclic triterpene acid, exhibited antihyperglycemic and hypolipidemic effects in several diabetic animal models (streptozocin- and alloxan-induced diabetic rats, as well as *db/db* obese mice) (Jung et al., 2007; de Melo et al., 2010). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) inhibition (Ramírez-Espinosa et al., 2011, 2014), PI3K/Akt activation (Chen et al., 2019), and effects on PPAR $\gamma$  (Christensen et al., 2010; Georgiadis et al., 2014) have been described due to OA. Some actions implicated in the regulation of carbohydrate metabolism by OA might explain in part its antihyperglycemic effect. However, actions on the metabolism of lipids by OA are poorly understood. In particular, actions of OA on PPAR in tissues that are highly sensitive to insulin, such as muscle and adipose tissue, are unknown. One possibility is that OA exerts effects on PPAR $\alpha$ , which might mean that OA is a dual agonist of PPARs. Nevertheless, the potential PPAR  $\gamma$ / $\alpha$  dual agonist of OA is unknown. This research aimed to determine the OA effects on the PPAR $\gamma$ / $\alpha$  expression and their regulated genes, as well as on GLUT-4 translocation in C2C12 myoblasts and on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Oleanolic acid (99% OA), pioglitazone, fenofibrate, 3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride and dimethylsulfoxide were purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Cell cultures

#### 2.2.1. C2C12 cells

C2C12 muscle cells (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) were cultured in 75-cm<sup>2</sup> bottles Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 25 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1% gentamicin, and 10% fetal bovine serum (FBS). The culture was maintained under standard growing conditions (Ahmadipour et al., 2013; Venkatesan et al., 2015).

#### 2.2.2. 3T3-L1 cells

3T3-L1 Murine fibroblasts (ATCC) were cultured in 75-cm<sup>2</sup> bottles with growth medium containing DMEM supplemented with 25 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1% gentamicin, and 10% bovine calf serum (BCS) (Cave and Crowther, 2018). The growth medium was changed every 2 days. Days after reaching confluence (day 0), cells were incubated with differentiation medium: methyl-isobutyl-xanthine (MIX) 0.5 mM, dexamethasone (DX) 0.25  $\mu$ M, and human insulin 0.8  $\mu$ M in DMEM supplemented with FBS 10% (Clavijo et al., 2007; Gregoire et al., 1998). Culture and differentiation conditions were carried out as reported (Contreras-Núñez et al., 2018).

### 2.3. Cell functionality

Cell functionality, following treatment with OA, was measured using the 3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride (NR, Sigma- Aldrich, MO, USA) assay (Repetto et al., 2008). C2C12 muscle

cells or 3T3-L1 fibroblast cells were cultured in 96-well microplates with medium containing OA at different concentrations, ranging from 1  $\mu$ M to 50  $\mu$ M. Fresh medium with 40  $\mu$ g/ml Neutral Red (NR) dye was added. The data were expressed as the percentage of viable cells following treatment with OA, compared with control cells (Borenfreund and Puerner, 1985; Gomez Perez et al., 2017).

### 2.4. Experimental conditions

One culture of C2C12 muscle cells was used as control and maintained by changing the medium every 2 days. Pioglitazone (5  $\mu$ M, PPAR $\gamma$  agonist) and fenofibrate (5  $\mu$ M, PPAR $\alpha$  agonist) were used as positive controls (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Giacoman-Martínez et al., 2019). Functionality results allowed to establish the OA concentrations to perform the experiments (10  $\mu$ M). The control was DMSO (Sigma-Aldrich), whose final concentration was  $\leq$  0.2%. After a PPAR $\gamma$  expression kinetic, best incubation time for messenger RNA (mRNA) expression analysis was 15 min, while best incubation time for protein expression analysis was 2 h (data not shown).

### 2.5. Isolation of RNA and quantification by RT-PCR

The RNA was isolated from the C2C12 muscle cells and 3T3-L1 adipocyte cells utilizing Trizol (Invitrogen, Los Angeles, CA, USA) isolation reagent (Chomczynski, 1993). Total RNA (2  $\mu$ g) was reverse-transcribed catalyzed (RT) employing the ImProm II kit (Promega, Madison, WI, USA) (Giacoman-Martínez et al., 2019; Hidalgo-Figueroa et al., 2013).

The complementary DNA (cDNA) was amplified with SYBR Green technology (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) using primers for the genes PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , FATP-1, GLUT-4, ACSL, and AdipoQ, with 36B4 as the reference gene (Table 1). The process employed a rotor-gene system (Qiagen, Hilden, Germany), which continuously measures the products of PCR amplification in each cycle (Hidalgo-Figueroa, 2017). Relative changes in the expression level of one specific gene ( $\Delta\Delta^{\text{Ct}}$ ) were calculated as  $\Delta^{\text{Ct}}$  sample minus the  $\Delta^{\text{Ct}}$  reference and was then presented as  $2^{-\Delta\Delta^{\text{Ct}}}$  (Giacoman-Martínez et al., 2019; Fortis-Barrera et al., 2019).

### 2.6. Total protein extraction

Cells were washed with PBS at 4 °C and scraped in 500  $\mu$ l of PBS with a rubber spatula, lysis of the cell pellets by thermal shock and liquid nitrogen was conducted (10 mM HEPES at pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM dithiothreitol). The supernatant was removed to determine the presence of PPAR, GLUT-4, and FATP-1 in the cytoplasm. Protein concentration was quantified using the Bradford method and the experiments were performed in triplicate for each treatment

**Table 1**  
Gene sequences used as forward (F) and reverse (R) primers for real-time qPCR.

| Gene          | Primer sequence (5'-3')     | Gene Bank  |
|---------------|-----------------------------|------------|
| PPAR $\alpha$ | F: ATGCCAGTACTGCCGTTTTC     | NM011144.6 |
|               | R: GGCCCTGACCTTTGTTGATGT    |            |
| PPAR $\gamma$ | F: CCAGAGTCTGCTGATCTGGG     | NM011146.1 |
|               | R: GCCACCTCTTTGCTCTGCCTC    |            |
| FATP-1        | F: ACCAGTGTCCAGGGGTACAG     | NM011977.3 |
|               | R: TGTCTCCCAGCTGACATGAG     |            |
| GLUT-4        | F: GATTCTGCTGCCCTCTCTGTC    | NM009204.2 |
|               | R: ATTTGGAGCTCTCTCCCAA      |            |
| ACSL          | F: ACCAGTGTCCAGGGGTACAG     | NM007981.4 |
|               | R: TGTCTCCCAGCTGACATGAG     |            |
| AdipoQ        | F: GGCTCTGTGCTCTCCATCT      | NM009605.4 |
|               | R: AGAGTCTGTGAGTTATCTGCATAG |            |
| 36B4          | F: AAGCGCTCTGGCATTGGCTC     | NM007475.5 |
|               | R: CCGCAGGGGACAGCTGGT       |            |

(Ismail, 1976).

### 2.7. Western blot

The samples were separated in 10% polyacrylamide gels with SDS and a PVDF (BIO-RAD, Irvine, CA, USA) membrane and transferred into a Transblot Turbo transference system (BIO-RAD, Irvine, CA, USA). The membranes were incubated with any of the primary antibodies (PPAR $\gamma$ : Cat. 81B8; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; PPAR $\alpha$ : Cat. PA1-822A Invitrogen, Los Angeles, CA, USA; GLUT-4: Cat. 53566 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, or FATP-1: Cat. PA5-2 7137, Invitrogen, Los Angeles, CA, USA). After, the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated to peroxidase (Anti-rabbit: Cat. GTX213110-01; GeneTex, Irvine, CA, USA; Anti-mouse: Cat. 2005; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Chemiluminescence was generated using Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (BIO-RAD). Spots were quantified by densitometry (Contreras-Núñez et al., 2018).

### 2.8. Confocal microscopy

C2C12 muscle cells were cultured using the Chamber Slide System (Lab-Tek II, Thermo-Fisher, MA USA). The cells were treated with OA 10 mM for 15, 30, and 60 min. The treatment substituted for the primary antibody for GLUT-4 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) for 24 h at 4 °C and for the secondary antibody (anti-rabbit-rhodamine; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) during 2 h at room temperature, with repeated washing (PBS-Tween 0.5%) applied after each incubation. Subsequently, an assembly of PBS/glycerol/DAPI (Inorganic Polyphosphate Stores by 4',6-diamidino-2-phenyl-indole) was utilized to stain the nucleus. Coverslips with the sample was placed on a microscope stage and imaged using the confocal microscope Zen-Sp1 ZEISS laser scanning GLUT-4 (rhodamine). Regions-of-interest were selected in the cytoplasm and average pixel intensity was measured (Miranda-Pérez et al., 2016).

### 2.9. Oil red staining

For lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes, the cells were washed twice with PBS and fixed with 3.7% formaldehyde for 30 min at room temperature. The cells were stained with 1.2 mg/ml oil red O dye/60% isopropanol solution (Sigma-Aldrich) for 10 min. Oil red O dye was removed with ethanol and PBS. Finally, the oil red dye was extracted with isopropanol containing 4% Nonidet P-40 and evaluated by spectrometry at 510 nm. Afterward, lipid accumulation was determined with the control of normalized data (García-Macedo et al., 2008; Yang et al., 2020).

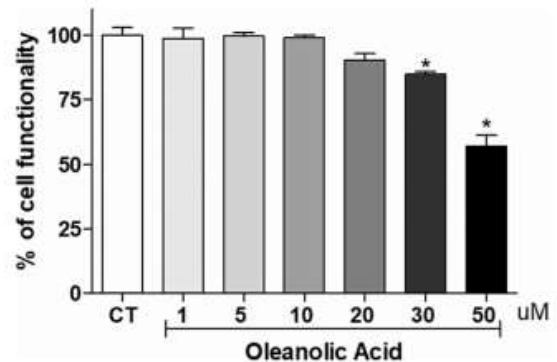
### 2.10. Statistical analysis

Data were expressed as Mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.). An ANOVA and a Tukey–Kramer post-hoc test determine significant differences between treatments. Statistical analysis was performed with NCSS software. A value of  $P < 0.05$  was accepted as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Effect of OA on C2C12 muscle cell functionality

To determine the OA concentration at which cell viability is not affected and thereby decreases cytotoxicity, we performed an analysis of cellular functionality at different OA concentrations. OA treatment (30  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) reduced cell viability in 20% and 45%, respectively. Cell functionality did not exert an effect at 1, 5, 10, and 20  $\mu$ M of OA (Fig. 1). Therefore, OA 10  $\mu$ M was chosen for the next experiments.



**Fig. 1.** Effect of OA on cell functionality (%). C2C12 cells were treated with OA (10  $\mu$ M) for 48 h in the determination of functionality using the neutral red method. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) ( $n = 3$ ). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).

### 3.2. OA affects PPAR $\gamma$ mRNA expression and increases AdipoQ and GLUT-4 in C2C12 muscle cells

PPAR are transcriptional factors that promote the expression of target genes. Thus, we evaluated the effect of OA on the expression of their regulated genes. In addition, we determined the possible effect of OA on the expression of PPAR. OA treatment produced a slight increase (0.9-fold) in the expression of PPAR $\gamma$  mRNA (Fig. 2A). We subsequently evaluated two genes regulated by PPAR $\gamma$ . OA treatment increased the expression of AdipoQ mRNA expression (1-fold) and the expression of GLUT-4 mRNA (3-fold) (Fig. 2B and C). On the other hand, treatment with pioglitazone did not increase the mRNA expression levels of PPAR $\gamma$ , AdipoQ, and GLUT-4. The expression kinetics that we conducted previously allowed us to determine the best time at which to observe the OA effect (15 min). However, this latter time is not ideal to observe the effects of pioglitazone on mRNA expression.

### 3.3. OA affects PPAR $\alpha$ mRNA expression and increases FATP-1 and ACSL mRNA in C2C12 muscle cells

Treatment with OA increased the expression of PPAR $\alpha$  mRNA (0.4-fold) (Fig. 3A). In addition, OA treatment produced an increase in the RNA expression of FATP-1 (2.7-fold) and ACSL (3-fold) (Fig. 3B and C), even higher than the positive control (fenofibrate). On the other hand, treatment with fenofibrate only increased the mRNA expression of FATP-1 (0.5-fold).

### 3.4. OA Increased the expression of PPAR $\alpha$ and PPAR $\gamma$ , FATP-1, and ACSL in C2C12 muscle cells

Agonist action on PPAR promotes the expression of target genes. This includes protein translation; therefore, we evaluated the protein expression levels of PPAR and regulated genes. OA treatment produced increased PPAR $\gamma$  protein expression, but the OA treatment did not produce any change in PPAR $\alpha$  expression protein. However, both positive-control treatments (pioglitazone and fenofibrate) produced an increase in PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  (Fig. 4A and C). On the other hand, the treatment with OA produced a significant increase in GLUT-4 (3-fold) and FATP-1 (4-fold). These genes are regulated by both PPAR, and the increase in their protein levels may be the product of agonist actions on PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$ , respectively. Treatment with pioglitazone and fenofibrate also produced increases in the expression of both proteins (Fig. 4C and D).

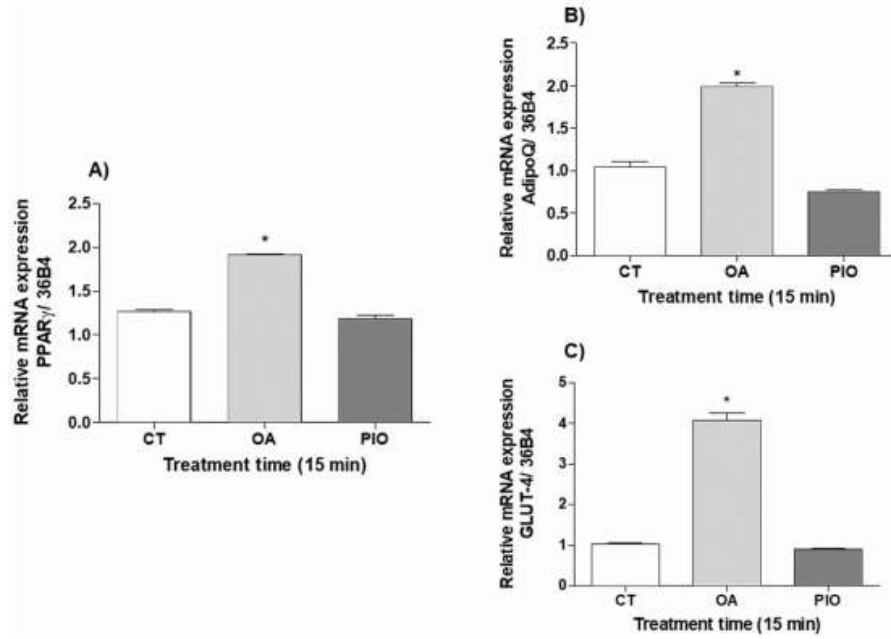


Fig. 2. OA effect on the mRNA expression of the PPAR $\gamma$  receptor (A), AdipoQ (B), and GLUT-4 (C). C2C12 cells were treated with OA (10  $\mu$ M) and pioglitazone (PIO 5  $\mu$ M) for 15 min. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) ( $n = 3$ ). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).

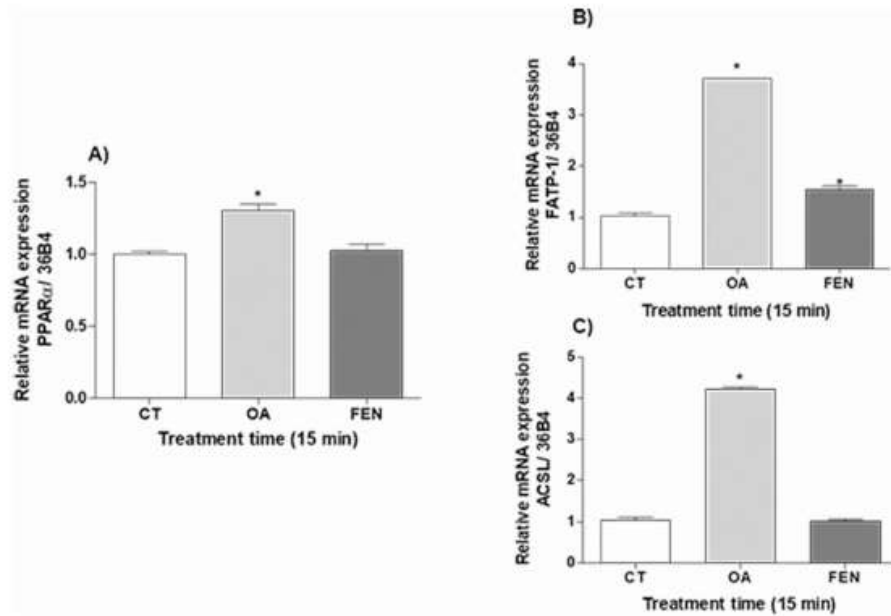
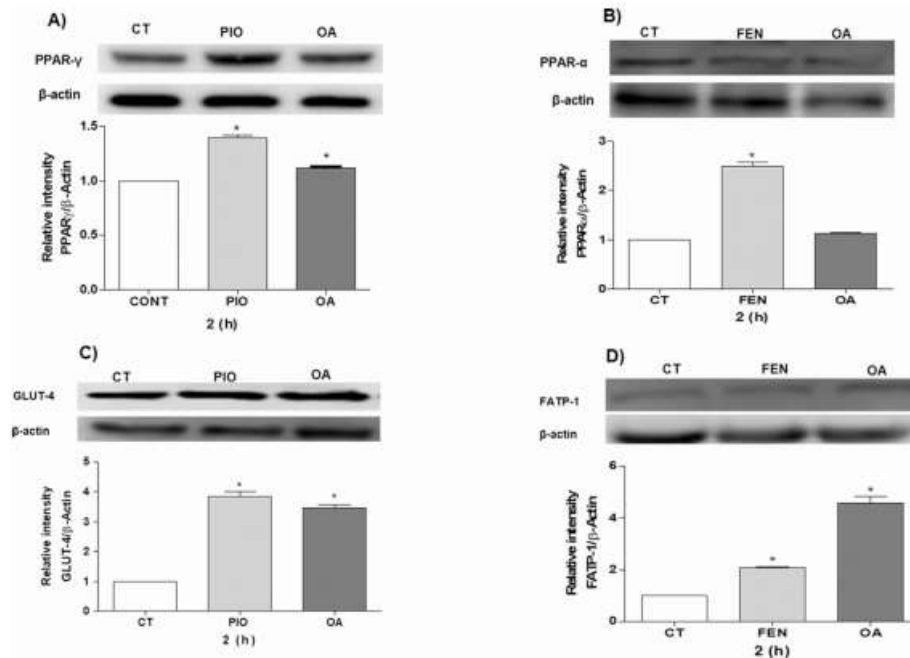


Fig. 3. OA effect on the mRNA expression of the PPAR $\alpha$  receptor (A), FATP-1 (B), and ACSL (C). C2C12 cells were treated with OA (10  $\mu$ M) and fenofibrate (FEN 5  $\mu$ M) for 15 min. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).



**Fig. 4.** OA effect on the expression of proteins PPAR $\gamma$  receptor (A), PPAR $\alpha$  receptor (B), GLUT-4 (C), and FATP-1 (D). C2C12 cells were treated with OA (10  $\mu$ M), pioglitazone (PIO 5  $\mu$ M), and fenofibrate (FEN 5  $\mu$ M) for 2 h. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) ( $n = 3$ ). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).

### 3.5. OA produces GLUT-4 translocation

One of the target proteins in PPAR $\gamma$  activation is GLUT-4. This molecule promotes the incorporation of glucose, thereby increasing insulin sensitivity. We evaluated the effect of OA on GLUT-4 by confocal microscopy. The confocal microscopy analysis revealed changes in GLUT-4 translocation in C2C12 myoblasts treated with OA at 15, 30, and 60 min (Fig. 5). The analysis demonstrated OA and pioglitazone significantly increased GLUT-4 translocation at 15 min, compared with the control. However, the highest increase in GLUT-4 translocation was observed at 30 min with OA and pioglitazone (Fig. 5B). After 60 min, OA significantly decreased GLUT-4 translocation, while the control agonist (pioglitazone) did not exhibit significant changes after 60 min (Fig. 5C).

### 3.6. OA increased PPAR $\alpha/\gamma$ mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes

In order to evaluate the OA effects on another cell type important in metabolism, we decided to know its effects on 3T3-L1 adipocytes. Treatment with OA increased PPAR $\alpha/\gamma$  mRNA expression (0.5-fold and 4-fold, respectively). Pioglitazone and fenofibrate treatment increased PPAR $\alpha/\gamma$  mRNA expression (Fig. 6A and B).

### 3.7. OA inhibits lipid storage in 3T3-L1 adipocytes

PPAR $\gamma$  activation produces an increase in lipid accumulation, but PPAR $\alpha$  activation produce less lipid accumulation. To know the OA effects on lipid accumulation, we employed 3T3-L1 adipocytes. OA treatment did not reveal significant changes in lipid accumulation, but the pioglitazone treatment increased lipid accumulation and treatment with fenofibrate decreased lipid accumulation (Fig. 6A). Fig. 6B features images (10X) of lipid droplets on adipocytes measured by oil red

staining after treatment at 72 h.

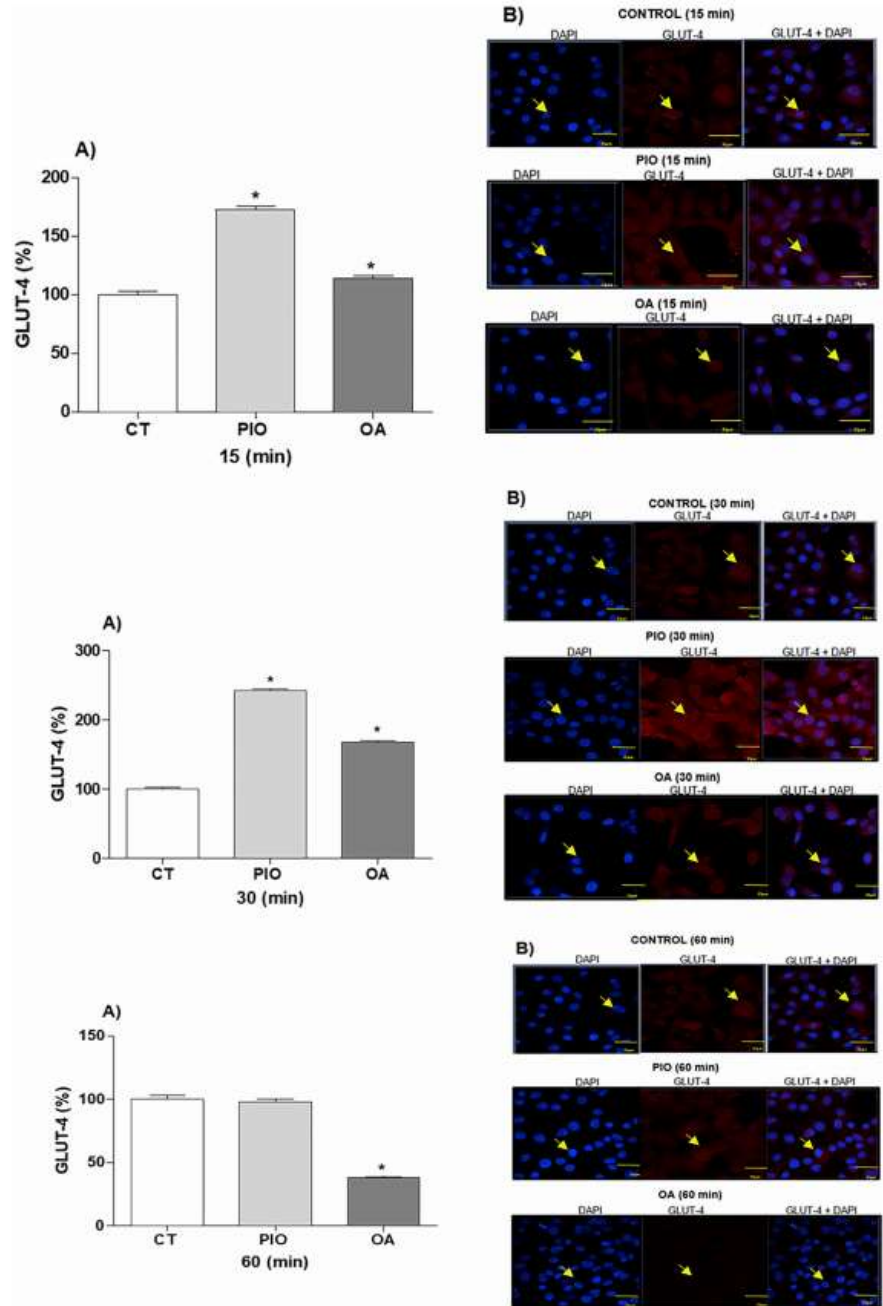
## 4. Discussion

PPARs are expressed in different tissues, including muscle, fatty tissue, and liver. The therapeutic plan offered to patients includes diet, exercise, and drugs. Physical exercise will demand more energy in muscle tissue, focusing on the myocyte as one of the key cells in the pharmacological action. For this reason, we decided to evaluate the effects of OA on muscle cells, although we also explored some key effects of OA on cultured adipocytes.

The muscle is a key tissue in metabolism and insulin resistance. It maintains an energetic balance on constantly activating PPAR, favoring glucose uptake or lipid oxidation. In this context, the C2C12 cell line (myoblasts) represents an essential tool for understanding the metabolic effects of the OA (Loviscach et al., 2000).

The present study provides evidence that OA at low concentrations (1, 5, 10, and 20  $\mu$ M) did not affect C2C12-cell functionality. However, at higher concentrations (30 and 50  $\mu$ M), cell functionality decreased significantly (Fig. 1). In this respect, it was demonstrated that OA (20–1000  $\mu$ M) decreases the viability of other cell types, such as Huh7, HepG2, Hep3B and A459 cells (Juliane et al., 2015; Fernandes and Arau, 2011). These data, in conjunction with those obtained in the present research, support that the concentration of OA at 10  $\mu$ M was suitable for performing the subsequent experiments.

PPAR $\alpha/\gamma$  dual agonists are drugs designed with antidiabetic and hypolipidemic potential. However, current dual agonists are synthetic and have multiple adverse effects, such as weight gain, edema, and heart failure (Xu et al., 2006; Cariou et al., 2011; Hidalgo-Figueroa et al., 2013). Molecular docking studies between a therapeutic target and its ligands may interact with distinct amino-acid residues, differences resulting in both affinity and intrinsic activity (Mitra et al.,



**Fig. 5. Effect on the translocation of GLUT-4.** A) GLUT-4 Translocation was detected after OA treatment (10  $\mu$ M) and pioglitazone (PIO, 5  $\mu$ M) at 15, 30, and 60 min. GLUT-4 content was then quantified at an optical density (OD) of 510 nm. B) GLUT-4 confocal fluorescence photomicrographs were obtained of C2C12 cells treated with OA (10  $\mu$ M) for 15, 30, and 60 min (magnification, 40X). Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) ( $n = 3$ ). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).

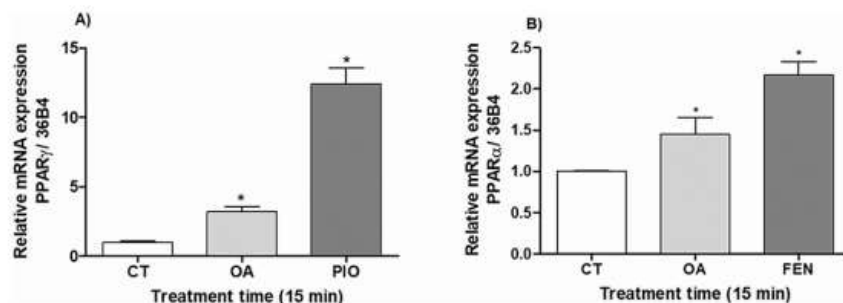


Fig. 6. Effect of OA on the mRNA expression of PPAR $\gamma$  receptor (A), PPAR $\alpha$  (B). 3T3L-1 Cells were treated with OA (10  $\mu$ M), pioglitazone (PIO 5  $\mu$ M), and fenofibrate (FEN 5  $\mu$ M) for 15 min. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) (n = 3). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test).

2007). These differences often explain the pharmacological potency of the ligands, their potential toxicity, and differential therapeutic usefulness. The dual agonists represent a strategy to achieve a broad spectrum of metabolic effects and reduce mortality rates associated with T2D by improving insulin resistance and hyperglycemia (Quang et al., 2011). In this context, it has been observed that molecules-of-natural-origin might exhibit lower affinity with PPAR $\gamma$  than pioglitazone, resulting in fewer adverse effects (Giacoman-Martínez et al., 2019).

OA is present in many edible and medicinal plants, and several pharmacological properties have been attributed to it (Pollier and Goossens, 2012), especially in terms of hyperglycemia, improving insulin sensitivity and glucose and lipid metabolism in several diabetic models (streptozocin- and alloxan-induced diabetic rats, as well as *db/db* obese mice) (Wang et al., 2013). These effects probably occur through the inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTB-1B) and activation of the PI3K/Akt signaling pathway, including the activation of PPAR $\gamma$  (Castellano et al., 2013). Additionally, OA exerted a hypolipidemic effect in diabetic models (Pérez, 2017; Unoki et al., 2008).

In the present research, OA treatment increased AdipoQ and GLUT-4 mRNA expression in C2C12 cells. These proteins are regulated by the activation of PPAR $\gamma$ , which would reflect a potential activation of this receptor by OA. In addition, AdipoQ is considered a marker of insulin sensitization (Fang and Judd, 2018); therefore, increases in its expression levels by means of OA could be associated with its antidiabetic effect. Furthermore, OA treatment increased FATP-1 and ACSL mRNA expression. These proteins are regulated by PPAR $\alpha$  activation, with a key role in fatty acid oxidation (Pawlak and Lefebvre, 2015; Poulsen et al., 2012); thus, the increase in their expression levels reflects the potential PPAR $\alpha$  agonist effect by OA. In addition, OA treatment produced an increase in the expression levels of both PPAR (Figs. 2 and 3). The protein expression analysis showed that OA increases PPAR $\gamma$ , GLUT-4, and FATP-1 (Fig. 4), which may be associated with mRNA expression levels. Both the gene and the protein expression analyses demonstrated possible dual PPAR $\gamma/\alpha$  activation since, in both analyses, important effects are observed on their proteins regulated by both PPAR. Therefore, these data support the idea that OA can have multi-target actions for the treatment of T2D and other metabolic diseases, which should be explored in further studies.

Some studies revealed that PPAR $\alpha$  expression is regulated by glucocorticoids, growth hormones, insulin, and even fatty acids and fibrates; PPAR $\alpha$  protein values are associated with the circadian rhythm of glucocorticoids. Stress or fasting situations produce an increase in glucocorticoid plasma values, which augments the synthesis of PPAR $\alpha$ . In this manner, high values of PPAR $\alpha$  could modulate the expression of genes involved in lipid metabolism and peroxisomal proliferation; at low values, only genes that participate in lipid metabolism are

expressed (Panadero et al., 2008). It has been shown that low levels of PPAR $\gamma$  mRNA and protein are associated with insulin resistance in muscle, adipose tissue, and liver. Henever et al. demonstrated that the absence of PPAR $\gamma$  in muscle leads to a profound state of insulin resistance, indicating that PPAR $\gamma$  operates directly as an essential control point in skeletal muscle, regulating its capacity to respond to an insulin stimulus (Henever et al., 2003). Our results support that OA produces a dual effect on genes regulated by PPAR $\alpha/\gamma$ , inducing an increase in the production of these proteins, which might be associated with an improvement in the metabolic condition.

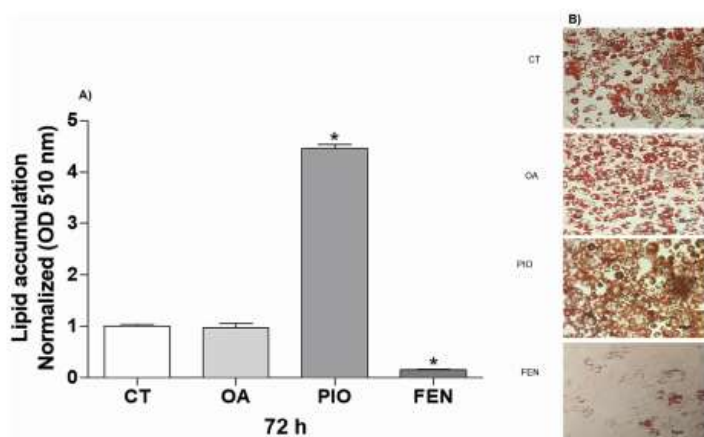
The activation of PPAR $\gamma$  produces changes in GLUT-4 molecular dynamics, affecting expression and translocation, improving the incorporation of glucose. Insulin resistance, the leading cause of DT2, is associated with disturbed GLUT (Stringer et al., 2015). Muscular tissue is the main target of insulin, where it regulates GLUT-4 metabolism, gene induction, cell trafficking, and movement (Luo et al., 2019). GLUT-4 translocation comprises one of the critical events in insulin sensitivity and is considered the main effect of the action of TZD. In this research, OA increased GLUT-4 translocation in myoblasts from 15 min, registering its most significant effect at 30 min (Fig. 5). This could be associated with the increase in the levels of gene and protein expression of GLUT-4 induced by OA, reflecting the PPAR $\gamma$  agonist activity of this compound.

In a study conducted by Li et al., OA increased IRS-1 and GLUT-4 protein expression in HepG2 cells, indicating that this triterpene might decrease insulin resistance by means of regulating the IRS1-GLUT-4 pathway (Li et al., 2015). Our results could be associated with IRS1 activation through the PI3K/AKT signaling pathway, due to that this pathway regulates the movements of vesicles containing transporter glucose to the membrane of muscle cells. Further studies on the effects of OA on IRS/PI3K signaling are necessary.

An increase in lipid accumulation can lead to obesity, thereby insulin resistance and DT2. The hypolipidemic ability of OA is well-known (de Melo et al., 2010; Chen et al., 2019). In the present research, the OA treatment in 3T3L-1 adipocytes did not modify lipid storage, despite increasing the expression of PPAR $\gamma$  mRNA, which could be associated with the increase in the expression of PPAR $\alpha$  mRNA, an essential factor for  $\beta$ -oxidation (Figs. 6 and 7). In this context, in previous studies, Sung et al. suggested that OA improves insulin sensitivity through a reduction in lipid accumulation and the size of the adipocytes (Sung et al., 2010). Therefore, these data support the idea of the benefits of the dual effect in reducing lipid accumulation.

## 5. Conclusions

OA exerts a dual effect on PPAR $\gamma/\alpha$ , promotes GLUT-4 translocation in C2C12 myoblasts, and inhibits lipid accumulation in 3T3L-1



**Fig. 7.** Effect on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. A) Lipid accumulation was quantified after OA treatment (10  $\mu$ M), pioglitazone (PIO 5  $\mu$ M), and fenofibrate (FEN 5  $\mu$ M) at 72 h. Lipid storage was then quantified at an optical density (OD) of 510 nm. Values were normalized with the control group. B) Images (10X) of lipid droplets on adipocytes measured by oil red staining after treatment at 72 h. PIO and FEN were used as the positive controls. Each evaluation represents the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (S.E.M.) ( $n = 3$ ). \*Significant differences compared with the control (CT),  $P \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

adipocytes, despite the increased expression of PPAR $\gamma$ . These results might explain, at least in part, its antihyperglycemic effect. With its potential to improve insulin sensitivity, OA can be proposed as a multitarget molecule for the treatment of T2D, which must be explored in further studies.

#### Author agreement

All authors have seen, revised and approved the final version of the manuscript being submitted.

We warrant that the manuscript is the authors' original work. This manuscript has not been published previously and isn't under consideration for publication elsewhere.

#### CRediT authorship contribution statement

**Hilda Loza-Rodríguez:** Formal analysis, Methodology, Investigation, Writing - original draft. **Samuel Estrada-Soto:** Conceptualization, Resources, Writing - review & editing. **Francisco J. Alarcón-Aguilar:** Conceptualization, Resources, Writing - review & editing. **Fengyang Huang:** Validation. **Guillermo Aquino-Jarquín:** Validation. **Ángeles Fortis-Barrera:** Methodology. **Abraham Giacomán-Martínez:** Methodology. **Julio C. Almanza-Pérez:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

#### Acknowledgment

The present study was supported by a grant from CONACyT to Hilda Loza Rodríguez (with scholarship registration CVU: 229804) as part of his Ph.D. in Experimental Biology in the DCBS at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. We would like to thank you for the Divisional Laboratory of Molecular Biology and the Confocal Microscopy Core Unit of the DCBS at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México for technical assistance. This research was partially supported by PRODEP-SEP, the Special Program Support to the Investigation; UAM-2019 and CONACyT Ciencia Básica (A1-S-13540).

#### References

- Ahmadipour, F., Vakili, T., Absalan, A., Mohiti-ardakani, J., Hadinedoushan, H., Khalili, M., Pourrajab, F., 2013. C2C12 cell line is a good model to explore the effects of herbal extracts on GLUT4 expression and translocation. *Ir J. Diab. Ob. 4*, 143–151. [http://jido.ssu.ac.ir/browse.php?a\\_code=A-10-30-27&slc\\_lang=en&sid=1](http://jido.ssu.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-30-27&slc_lang=en&sid=1) accessed 15 October 2019.
- Bajaj, M., Suramornkul, S., Hardies, L.J., Glass, L., Musi, N., DeFronzo, R.A., 2007. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  agonists on glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 50, 1723–1731. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0698-9>.
- Berger, J.P., Akjyama, T.E., Meinke, P.T., 2005. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.003>.
- Borenfreund, E., Puerner, J., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).
- Canivell, S., Gomis, R., 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, S62–S69. <https://doi.org/10.2337/dc10-S011>.
- Cariou, B., Zair, Y., Staels, B., Bruckert, E., 2011. Effects of the new dual PPAR $\alpha$ / $\delta$  agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 34(https://doi.org/10.2337/dci11-0093). 2008–2014.
- Castellano, J.M., Guinda, A., Delgado, T., Rada, M., Cayuela, J.A., 2013. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes* 62, 1791–1799. <https://doi.org/10.2337/db12-1215>.
- Cave, E., Crowther, N.J., 2018. The use of 3T3-L1 murine preadipocytes as a model of adipogenesis. *Sex Brain* 1916, 263–272. <https://doi.org/10.7551/mitpress/7458.003.0036>.
- Chen, S., Wen, X., Zhang, W., Wang, C., Liu, J., Liu, C., 2019. Hypolipidemic effect of oleanolic acid is mediated by the miR-98-5p/PGC-1 $\beta$  axis in high-fat diet - induced hyperlipidemic mice. <https://doi.org/10.1096/fj.201601022R>.
- Chiarelli, F., Di Marzio, D., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 297–304. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s993>.
- Cho, N., Shaw, J., E-Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha, J., Ohlrogge, A., Malanda, B., 2019. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–537. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692896> accessed 25 March 2018.
- Christensen, K.B., Jørgensen, M., Kotowska, D., Petersen, R.K., Kristiansen, K., Christensen, L.P., 2010. Activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.* 132, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.054>.
- Clavijo, M.A., Gómez Camargo, D., Gómez Alegría, C.J., 2007. In vitro adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Rev. Med.* 15, 170–176. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91015204> accessed 12 August 2018.
- Contreras-Núñez, E., Blancas-Flores, G., Cruz, M., Almanza-Pérez, J.C., Gomez-Zamudio, J.H., Ventura-Gallegos, J.L., Zentella-Dehesa, A., Roberto-Lazzarini, Roman-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J., 2018. Participation of the IKK- $\alpha$ / $\beta$  complex in the inhibition of the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway by glycine: possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. *Biomed. Pharmacother.* 102, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.048>.
- de Melo, C.L., Queiroz, M.G.R., Fonseca, S.G.C., Bizerra, A.M.C., Lemos, T.L.G., Melo,



- T.S., Santos, F.A., Rao, V.S., 2010. Oleonic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem. Biol. Interact.* 185, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.028>.
- Fang, H., Judd, R.L., 2018. Adiponectin regulation and function. *Comp. Physiol.* 8, 1031–1062. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>.
- Fernandes, J., Arau, K., 2011. Oleonic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model *in vivo*. *PLoS One* 6, e28596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028596>.
- Fortis-Barrera, M.A., Alarcón-Aguilar, F.J., Becerril-García, A., Flores-Sáenz, J.L.E., Almanza-Pérez, J.C., García-Lorenzana, M., Lazzarini-Lechuga, R.C., Román-Ramos, R., Blancas-Flores, G., 2019. Mechanism of the hypoglycemic activity and hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* bertol. *J. Med. Food* 00 1–10. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0126>.
- García-Macedo, R., Sanchez-Muñoz, F., Almanza-Pérez, J.C., Duran-Reyes, G., Alarcón-Aguilar, F., Cruz, M., 2008. Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.05>.
- Georgiadis, I., Karatzas, T., Korou, L.M., Katsilambros, N., Perrea, D., 2014. Beneficial health effects of chios gum mastic and peroxisome proliferator-activated receptors: indications of common mechanisms. *J. Med. Food* 18, 1–10. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0021>.
- Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., García-Macedo, R., Román-Ramos, R., Almanza-Pérez, J.C., 2019. Triterpenoids from *Hibiscus sabdariffa* L. with PPAR  $\delta/\gamma$  dual agonist action: *in vivo*, *in vitro* and *in silico* studies. *Planta Med.* 85, 412–423. <https://doi.org/10.1055/a-0824-1316>.
- Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M.A., Paquin, J., 2017. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal. Biochem.* 535, 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.027>.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.E.I.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>.
- Gross, B., Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2017. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016>.
- Hevener, A.L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R.M., Olefsky, J., 2003. Muscle-specific PPAR $\gamma$  deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* 9, 1491–1497. <https://doi.org/10.1038/nm956>.
- Hidalgo-Figueroa, S., Ramírez-Espinosa, J.J., Estrada-Soto, S., Almanza-Pérez, J.C., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J., Hernández-Rosado, J.V., Moreno-Díaz, H., Díaz-Coutiño, D., Navarrete-Vázquez, G., 2013. Discovery of thiazolidine-2,4-Dione/biphenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR  $\alpha/\gamma$  modulator with antidiabetic effect: *in vitro*, *in silico* and *in vivo* approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 474–483. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12102>.
- Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., Giles, D., Alarcón-Aguilar, F.J., León, I., Giacoman-Martínez, A., Miranda-Pérez, M.E., Almanza-Pérez, J.C., 2017. Discovery of new dual PPAR $\gamma$ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: design, synthesis and *in vivo* drug evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 90, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.033>.
- Ismail, A.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Juliane, Q., Ahangarian, B., Pulda, S., 2015. Smae mimetic and oleonic acid synergize to induce cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Canc. Lett.* 365, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.018>.
- Jung, S.H., Ha, Y.J., Shim, E.K., Choi, S.Y., Jin, J.L., Yun-Choi, H.S., Lee, J.R., 2007. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. *Biochem. J.* 403, 243–250. <https://doi.org/10.1042/bj20061123>.
- Li, M., Han, Z., Bei, W., Rong, X., Guo, J., Hu, X., 2015. Oleonic acid attenuates insulin resistance via NF- $\kappa$ B to regulate the IRS1-GLUT4 pathway in HepG2. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 9. <https://doi.org/10.1155/2015/643102>.
- Loviscach, M., Rehman, N., Carter, L., Mudaliar, S., Mohadeen, P., Ciaraldi, T.P., Veerkamp, J.H., Henry, R.R., 2000. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* 43, 304–311. <https://doi.org/10.1007/s001250050048>.
- Luo, W., Ai, L., Wang, B. fa, Zhou, Y., 2019. High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling. *Biomed. Pharmacother.* 120. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109498>.
- Miranda-Pérez, M.E., Ortega-Camarillo, C., Del Carmen Escobar-Villanueva, M., Blancas-Flores, G., Alarcón-Aguilar, F.J., 2016. Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. *J. Ethnopharmacol.* 188, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.061>.
- Mitra, S., Sangle, G., Tandon, R., Sharma, S., Roy, S., Khanna, V., Gupta, A., Sattigeri, J., Sharma, L., 2007. Increase in weight induced by muraglitazar, a dual PPAR  $\alpha/\gamma$  agonist, in db/db mice: adipogenesis/or edema. *Br. J. Pharmacol.* 150, 480–487. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707000>.
- Monsalve, F., Pyarasani, R., Delgado, F., Moore, R., 2013. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediat. Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2013/549627>.
- Ozougwu, O., 2014. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* 4, 46–57. <https://doi.org/10.5897/jpap2013.0001>.
- Panadero, M.L., González, C., Herrera, E., 2008. Modulación del PPAR $\alpha$  por agentes farmacológicos y naturales y sus implicaciones metabólicas. *Clin. Invest. Arterioscler.* 20, 259–289. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(08\)75789-9](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(08)75789-9).
- Pawlak, Michal, Lefebvre Philippe, S.B., 2015. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol. (Amst.)* 62, 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>.
- Pérez, R.M., 2017. Hypolipidemic and hypoglycemic activities of a oleonic acid derivative from *Malva parviflora* on streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharm. Res.* 40, 550–562. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0873-y>.
- Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleonic acid. *Phytochemistry* 77, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.022>.
- Poulsen, L. la C., Siersbak, M., Mandrup, S., 2012. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003>.
- Quang, T.H., Ngan, N.T.T., Minh, C. Van, Kiem, P. Van, Thao, N.P., Tai, B.H., Nhiem, N.X., Song, S.B., Kim, Y.H., 2011. Effect of triterpenes and triterpene saponins from the stem bark of *Kalopanax pictum* on the transactivational activities of three PPAR subtypes. *Carbohydr. Res.* 346, 2567–2575. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.08.029>.
- Ramírez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., Paoli, P., Flores-Morales, V., Camici, G., Rosa-Lugo, V.D. La, Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., 2014. Synthesis of oleonic acid derivatives: *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies for PTP-1B inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* 87, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.036>.
- Ramírez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Paoli, P., Camici, G., Navarrete-Vázquez, G., Ortiz-Andrade, R., Estrada-Soto, S., 2011. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* approaches. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 2243–2251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.005>.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- Stringer, D.M., Zahradka, P., Taylor, C.G., 2015. Glucose transporters: cellular links to hyperglycemia in insulin resistance and diabetes. *Nutr. Rev.* 73, 140–154. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu012>.
- Sung, H.Y., Kang, S.W., Kim, J.L., Li, J., Lee, E.S., Gong, J.H., Han, S.J., Kang, Y.H., 2010. Oleonic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res.* 30, 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.10.001>.
- Unoki, K.E.Y., Assaki, G.A.K.U.S., Okuji, Y.O.T., Inoshita, M.I.K., Aito, A.K.N., Ida, K.A.A., Hnishi, M.A.O., 2008. Effect of dietary wine pomace extract and oleonic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56, 12052–12058. <https://doi.org/10.1021/jf8026217>.
- Venkatesan, N., Boggs, K., Liu, H.-X., Koliakos, G., 2015. A microplate assay for measuring cell death in C2C12 cells. *Tissue Eng. C Methods* 22, 1–18. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0377>.
- Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., Hai, C., 2013. Oleonic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 376, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.014>.
- Xu, C., Wang, L., Liu, H., Zhou, X., Cao, T., Li, S., 2006. C333H, a novel PPAR $\alpha/\gamma$  dual agonist, has beneficial effects on insulin resistance and lipid metabolism. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00263>.
- Yang, X., Zhang, P., Zhang, F., Ke, Z., Chen, Q., Liu, C., 2020. Protective effect of hypoglycemic granule against diabetes-induced liver injury by alleviating glycolipid metabolic disorder and oxidative stress. *J. Cell. Biochem.* <https://doi.org/10.1002/jcb.29588>.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00124  
Matrícula: 207381857

ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS  
OLEANÓLICO, URSÓLICO Y SUS  
DERIVADOS METILADOS COMO  
AGONISTAS DE PPAR



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 1 del mes de febrero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR  
DRA MARGARITA CANALES MARTINEZ  
DRA. FENGYANG HUANG  
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

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:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: HILDA LOZA RODRIGUEZ

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

Aprobar

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

HILDA LOZA RODRIGUEZ  
ALUMNA

REVISO

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICARDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DRA MARGARITA CANALES MARTINEZ

VOCAL

DRA. FENGYANG HUANG

SECRETARIO

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c. c. profesores mencionados en ella