



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**“MECANISMOS MOLECULARES DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE
PLANTAS USADAS TRADICIONALMENTE COMO ANTIDIABÉTICOS”**

Tesis que presenta

Q.F.B. Rocio Zapata Bustos

Para obtener el título de

Maestra en Ciencias

en la especialidad de Biología Molecular

Director

Dr. Luis A. Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P.

Julio de 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **“Mecanismos moleculares del efecto hipoglucemiante de plantas usadas tradicionalmente como antidiabéticos”** presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Rocio Zapata Bustos** y aprobada el **13 de Julio de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dr. Rubén López Revilla
Asesor de la tesis

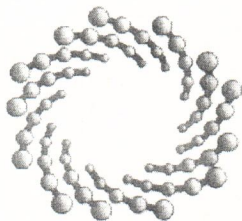
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de la tesis



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo. Y fue financiada parcialmente con fondos aportados por el Sistema Integral de las Fundaciones PRODUCE (Proyecto 39-2007-1493).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (211445).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 062 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Rocio Zapata Bustos

sobre la Tesis intitulada:

Mecanismos moleculares del efecto hipoglucemiante de plantas usadas tradicionalmente como antidiabéticos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Mapín
Secretario Académico



AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana

A Abraham por todo su apoyo

Al Dr. Luis Salazar Olivo por su asesoramiento

A Angel Josabad Alonso Castro por todas sus enseñanzas, asesoramiento y gran amistad.

ÍNDICE

	Pág.
Constancia de aprobación de tesis	2
Créditos institucionales	3
Agradecimientos	5
Índice	6
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
1.1 Epidemiología de la diabetes mellitus	11
1.2 Impacto socioeconómico de la diabetes mellitus en México	12
1.3 Los hipoglucemiantes orales: tratamiento ineficaz de la diabetes mellitus tipo 2	13
1.4 La vía de señalización de la insulina como un blanco terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	14
1.5 La herbolaria mexicana como terapia alternativa	16
1.6 El cultivo de adipocitos es un modelo óptimo para el estudio de nuevos agentes promisorios para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2	18
II. Materiales y Métodos	20
2.1 Material vegetal	20

2.2 Estimación del contenido de fenoles totales, alcaloides y flavonoides en los extractos vegetales	20
2.3 Determinación de las concentraciones inocuas de los extractos vegetales en preadipocitos 3T3-F442A	22
2.4 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-F442A	22
2.5 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-L1	23
2.6 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de preadipocitos humanos	23
2.7 Incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3 y humanos	24
2.8 Efecto de inhibidores de la vía de señalización de la insulina sobre la incorporación de glucosa	25
2.9 Evaluación del efecto antidiabético de muestras comerciales de <i>I. sonorae</i>	25
2.10 Análisis estadístico	26
III. Resultados y Discusión	27
3.1 Obtención de los extractos acuosos de raíz de <i>I. sonorae</i> (EAls) y de hojas (EAPah) y flores (EAPaf) de <i>P. aculeata</i>	27
3.2 Determinación de concentraciones inocuas de los extractos para las células 3T3-F442A	28
3.3 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la adipogénesis múrida y humana	29

3.4 EAls, EAPah y EAPaf estimulan la incorporación de 2-NBDG en adipocitos 3T3 y humanos sensibles y resistentes a insulina	30
3.5 EAls estimula la incorporación de glucosa a través de una vía de señalización parcialmente diferente a la de la insulina en adipocitos humanos	33
3.6 Las preparaciones comerciales de <i>I. sonorae</i> tienen un marcado efecto anti-adipogénico y un modesto efecto estimulador de la incorporación de glucosa	35
IV. Conclusiones	37
V. Referencias	38
VI. Pies de las figuras	45
VII. Figuras	50

RESUMEN

Ibervillea sonorae S. Watson (Cucurbitaceae) y *Parkinsonia aculeata* L. (Fabaceae) son plantas utilizadas para el tratamiento empírico de la diabetes mellitus, aunque se desconocen sus principios activos y mecanismos de acción. Nosotros evaluamos los efectos de extractos acuosos de tubérculos de *I. sonorae* (EAls) y de hojas (EAPah) y flores (EAPaf) de *P. aculeata* sobre la incorporación de 2-NBDGlcucosa y la adipogénesis de adipocitos 3T3 de ratón y humanos subcutáneos normales. Los tres extractos estimularon la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos, en función de la concentración y con potencia similar o mayor a la insulina. La incorporación fue bloqueada por inhibidores de la vía de señalización de la insulina, salvo la inducida por EAls en adipocitos humanos que no fue bloqueada por wortmanina, un inhibidor de la fosfatidilinositol 3 cinasa. EAls y EAPah indujeron en diverso grado la adipogénesis murina pero no la humana. En contraste seis de siete preparaciones comerciales de *I. sonorae* tuvieron un marcado efecto anti-adipogénico sobre las células 3T3-F442A y modesta estimulación de la incorporación de 2-NBDG. Nuestros resultados muestran que *I. sonorae* y *P. aculeata* contienen compuestos hidrosolubles que estimulan la incorporación de glucosa por el tejido adiposo y que la actividad antidiabética de *I. sonorae* parecen utilizar una vía de señalización parcialmente distinta a la de la insulina. Los potentes efectos de los extractos ensayados sobre la incorporación de 2-NBDG, aunados a su carencia de efectos adipogénicos en células humanas, sugieren que *I. sonorae* y *P. aculeata* representan una fuente promisoría de compuestos antidiabéticos. Las preparaciones comerciales de *I. sonorae* tienen un leve efecto de estimulación de incorporación de 2-NBDG y sugieren la necesidad de evaluar la actividad de los productos naturales de venta en el mercado.

ABSTRACT

Ibervillea sonora S. Watson (Cucurbitaceae) and *Parkinsonia aculeata* L. (Fabaceae) are plants used for the empirical treatment of diabetes mellitus but their active principles and mechanisms of action remain unknown. We evaluated the effects of aqueous extracts of *I. sonora* tubers (EAls) and *P. aculeata* leaves (EAPah) and flowers (EAPaf) on the 2-NBDglucose uptake and the adipogenesis of murine 3T3 and subcutaneous human normal adipocytes. All three extracts stimulated the 2-NBDG uptake in 3T3-F442A, 3T3-L1 and human adipocytes in a concentration-dependent manner and with similar or even higher potency than insulin. The 2-NBDG uptake was blocked by inhibitors of the insulin signaling pathway, save for the 2-NBDG uptake induced by EAls which was not repressed by wortmannin, a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor. EAls and EAPah stimulated murine adipogenesis in diverse degrees, but none of the extracts induced human adipogenesis. In contrast, six of seven commercial formulations of *I. sonora* had a marked anti-adipogenic effect on 3T3-F442A cells and modest stimulatory effect on the 2-NBDG uptake. Our results show that *I. sonora* and *P. aculeata* have hydrosoluble compounds that stimulate glucose uptake by adipose tissue and that the anti-diabetic activity of *I. sonora* seem to use a partially different insulin signaling pathway. The strong effects of the extracts assayed on the 2-NBDG uptake and their lack of adipogenic effects in human cells suggest that *I. sonora* and *P. aculeata* are promissory sources of anti-diabetic compounds. The commercial formulations of *I. sonora* have a small stimulatory effect of 2-NBDG uptake and suggest the necessity of evaluation of the natural products available on the market.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad metabólica con mayor prevalencia en el mundo (Aguilar-Salinas y cols., 2003). Este padecimiento es un síndrome orgánico, multisistémico y crónico que se caracteriza por el aumento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Se divide en dos grupos principales conocidos como DM tipo 1 (DM-1) y DM tipo 2 (DM-2). La DM-1 es causada por la baja o nula producción de insulina y la DM-2 se caracteriza por la incapacidad de las células para responder a esta hormona (resistencia a insulina). La DM-2 es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales como la dieta y la inactividad física, que inducen obesidad. Este tipo de diabetes es el más común, constituye entre el 85-95% de los casos de DM en países desarrollados y un porcentaje aún mayor en países en desarrollo. Esta enfermedad se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida, y es muy frecuente su asociación con la obesidad. En el año 2000, la prevalencia de la DM-2 a escala mundial se estimó en alrededor de 180 millones de casos y se prevé que esta cifra se duplique para el año 2030 (OMS, 2008). En México, cerca de 2.2 millones de adultos padecían DM-2 en el año 2000 y se estima que esta cifra se incrementará a 6.1 millones para el año 2030 (OMS, 2008). La DM-2, la principal causa de muerte en la población adulta en México, ocasionó 55,000 defunciones en el año 2002 y se prevé que entre 2006 y 2015 las muertes por diabetes aumenten en más de un 80% en los países de ingresos medios altos (OMS, 2008). En San Luis Potosí, la DM-2 es la segunda causa de muerte en hombres y la tercera en mujeres (Anónimo,

2001), con una tasa de mortalidad de 28 defunciones por 100,000 habitantes (Ekoé y cols., 2001).

1.2 Impacto socioeconómico de la diabetes mellitus en México

La DM-2 se ha convertido en una pandemia desde hace dos décadas, lo que ha repercutido en la salud y la economía de todos los países, entre ellos México (Bustos Saldaña y cols., 2007). Los gastos directos de la atención hospitalaria y ambulatoria a pacientes diabéticos se estimaron en 131 millones de dólares en 2004 y se predice que esta cifra se incrementará en un 14% para 2006 (Arredondo y cols., 2005). Por otro lado, la mayor prevalencia de la DM-2 se presenta en la población con menores recursos económicos (Aguilar-Salinas y cols., 2003) la cual en su mayoría no tiene acceso a servicios de atención a la salud (aproximadamente el 40% de los mexicanos). Es por ello que estos pacientes deben absorber los gastos del tratamiento farmacológico (Arredondo y Zúñiga, 2004) u optar por terapias alternativas (Pagán y Tanguma, 2007). Además, el nivel socioeconómico de los pacientes de DM-2 influye en la prevención y el tratamiento de complicaciones de la diabetes, lo que aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad independientemente del conocimiento adecuado sobre la enfermedad (Bustos Saldaña y cols., 2007).

1.3 Los hipoglucemiantes orales: tratamiento ineficaz de la diabetes mellitus tipo 2

Los hipoglucemiantes orales representan el tratamiento más común de la DM-2, pero no restauran de manera eficiente los niveles normales de glucemia, además de que ocasionan diversos efectos adversos. Entre estos fármacos se encuentran las sulfonilureas, las meglitinidas, las biguanidas, los inhibidores de alfa-glucosidasas y las tiazolidinedionas (Inzucchi, 2002). Las sulfonilureas estimulan la liberación de la insulina de las células beta del páncreas y pueden mejorar ligeramente la resistencia a insulina en los tejidos periféricos blanco de esta hormona, como el músculo y el tejido adiposo. Desafortunadamente, las sulfonilureas también inducen hipoglucemia y aumento de peso corporal. Las meglitinidas, al igual que las sulfonilureas, funcionan como secretagogos de insulina pero actúan muy rápidamente, lo que induce un mayor descenso de la glucosa y aumenta el riesgo de hipoglucemia (Luna y cols., 2001). Las biguanidas (como la metformina) reducen la liberación de glucosa hepática y en menor medida incrementan la sensibilidad a insulina en hígado y tejidos periféricos. Los efectos secundarios de las biguanidas son problemas gastrointestinales y náuseas al inicio del tratamiento, además en algunas ocasiones pueden provocar acidosis láctica e insuficiencia renal (Luna y cols., 2001; Spiller y Sawyer, 2006). Las tiazolidinedionas (como la rosiglitazona y la pioglitazona) estimulan la sensibilidad a insulina en los tejidos muscular y adiposo y en menor medida inhiben la producción de glucosa hepática. Además, estos agentes mejoran notablemente la sensibilidad a insulina al ser utilizados en combinación con otros fármacos antidiabéticos. Ya que estos agentes no incrementan la secreción de insulina, no causan hipoglucemia al ser utilizados como monoterapia (Luna y cols., 2001). No obstante, estos fármacos tienen diversos efectos secundarios: inducen esteatosis hepática en sujetos no

alcohólicos (Caldwell y cols., 2007), inhiben la regeneración hepática (Turmelle y cols., 2006) e inducen obesidad (de Souza y cols., 2001) y osteoporosis (Rzonca y cols., 2004). Los inhibidores de la alfa-glucosidasa, por su parte, disminuyen la absorción intestinal de glucosa al inhibir la hidrólisis de carbohidratos complejos por la alfa-glucosidasa, teniendo mayor impacto en la hiperglucemia postprandial (Luna y cols., 2001). Estos agentes al igual que las biguanidas ocasionan trastornos gastrointestinales y fallas renales y cardiovasculares (Spiller y Sawyer, 2006).

Cuando no se logra un adecuado control de la glucemia utilizando un solo agente, el uso de terapias combinadas es otra opción (Luna y cols., 2001). Sin embargo, los hipoglucemiantes orales revierten insuficientemente la hiperglucemia y fallan a medida que la severidad de la enfermedad progresa, lo que hace necesario la administración de insulina exógena. Por eso es deseable buscar nuevas terapias antidiabéticas que restauren de manera eficiente los niveles de glucemia sin los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

1.4 La vía de señalización de la insulina como un blanco terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

Aunque las bases moleculares de la DM-2 son aún incompletamente conocidas, un evento central de la afección es la disfunción en la vía de señalización de la insulina. Esta hormona anabólica promueve el almacenamiento y síntesis de lípidos, proteínas y carbohidratos e inhibe su degradación y liberación a la circulación. Un proceso mediante el cual la insulina incrementa el almacenamiento de energía involucra la incorporación de glucosa en el músculo y en el tejido

adiposo, actuando de esta manera como principal regulador de la concentración de glucosa en la sangre (Chang y cols., 2004). Este proceso involucra una secuencia de eventos complejamente regulados, es iniciado por una cascada de señales moleculares que son activadas en respuesta a la insulina hasta lograr la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde sus pozas intracelulares a la membrana plasmática (Thong y cols., 2005).

La acción de la insulina en los adipocitos se inicia cuando esta hormona se une a su receptor, el cual consiste en un heterotetrámero en una configuración β - α - α - β . Las subunidades α son completamente extracelulares, mientras que las subunidades β poseen un dominio citosólico con actividad de tirosina cinasa (Watson y cols., 2004). La unión de la insulina a sitios específicos de las subunidades α induce cambios conformacionales en el receptor y promueve su autofosforilación en residuos de tirosina específicos en la región intracelular de las subunidades β (Thong y cols., 2005). Entonces, el receptor activado fosforila residuos de tirosina en sustratos intracelulares del receptor de insulina (IRS-1, IRS-2) para iniciar la transducción de la señal (Chang y cols., 2004). La fosforilación en sitios específicos del IRS conduce a la activación de dos diferentes vías de señalización en cascada incluyendo la vía de la fosfoinositol-3 cinasa (PI-3K) y la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Watson y cols., 2004). Se ha sugerido que la vía MAPK está involucrada en la regulación del crecimiento celular mientras que la vía de PI-3K está relacionada con el metabolismo celular y el sistema cardiovascular (Watson y cols., 2004). Una vez que las proteínas p85/p110 (subunidades catalítica y reguladora de PI-3K, respectivamente) se asocian con el IRS, PI-3K se activa y estimula la producción del lípido denominado fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3) (Watson y cols., 2004), que regula la localización y actividad de numerosas proteínas (Chang y cols., 2004). La acumulación de PIP3

resulta en la fosforilación y activación de la proteína cinasa Akt, la cual favorece la translocación de GLUT4, un transportador de glucosa sensible a insulina (Watson y cols., 2004), desde sus depósitos intracitoplásmicos hasta la membrana plasmática. Tras su translocación GLUT4 favorece el movimiento de glucosa desde la sangre al interior de los tejidos. Se ha descrito que además de Akt, las isoformas de la proteína cinasa C (PKC): PKC δ y PKC λ , activadas también por PI-3K, intervienen en la regulación de la translocación de GLUT4 a la superficie de la célula (Standaert y cols., 1997).

El metabolismo de los carbohidratos es de gran importancia en el control de la DM-2, por lo cual uno de los blancos terapéuticos más promisorios es la vía de señalización de la insulina. Desarrollar nuevos agentes antidiabéticos y determinar su mecanismo de acción hipoglucemiante, permitirá ofrecer terapias y nuevas oportunidades para el control de la DM-2 y sus complicaciones.

1.5 La herbolaria mexicana como terapia alternativa en el tratamiento de la DM-2

La extensa tradición en el empleo terapéutico de las plantas por muchas culturas en el mundo, aunada a los altos costos de los tratamientos farmacológicos y al fracaso de éstos, ha impulsado a los pacientes a usar tratamientos alternativos como la herbolaria (Pagán y Tanguma, 2007). Más de 1,200 especies de plantas se utilizan alrededor del mundo para el tratamiento empírico de la DM-2. Sin embargo, sólo unas 350 han sido ensayadas experimentalmente para confirmar o descartar sus propiedades antidiabéticas (Alarcón-Aguilar y cols., 2002), y en muy pocas se ha estudiado el mecanismo de acción. Por ejemplo, Liu y cols. (2004) sugieren que el ácido tánico,

uno de los mayores componentes de las hojas de *Lagerstroemia speciosa*, estimula el transporte de glucosa utilizando la vía de señalización de la insulina mediante la activación del receptor de la insulina en adipocitos múridos.

Ibervillea sonora S. Watson (Cucurbitaceae) y *Parkinsonia aculeata* L. (Fabaceae), comúnmente conocidas como wereke y retama, son dos plantas ampliamente utilizadas para el tratamiento empírico de la DM-2 en nuestro país. De la primera de ellas, *I. sonora*, existen numerosas presentaciones comerciales industrializadas, pero de éstas no se conocen ensayos de su actividad terapéutica. *P. aculeata*, por su parte sólo se comercializa de manera tradicional en mercados locales o hierberas. Algunos reportes indican que extractos acuosos y orgánicos de la raíz de *I. sonora* tienen actividad hipoglucemiante en ratas y ratones sanos y diabéticos (Alarcón-Aguilar y cols., 2002; Alarcón-Aguilar y cols., 2005). Algunos monoglicéridos y ácidos grasos aislados de extractos orgánicos de *I. sonora* se han propuesto como los responsables de la actividad hipoglucemiante de esta planta (Hernández-Galicia y cols., 2007). Por otro lado, extractos acuosos de las hojas y flores de *P. aculeata* han mostrado efectos hipoglucemiantes en ratas con diabetes inducida por aloxán (Leite y cols., 2007). Aunque se han aislado compuestos presentes en *P. aculeata* como orientina, isorientina, vitexina y isovitexina, los responsables de la actividad hipoglucemiante se desconocen (Besson y cols., 1980). Asimismo se desconocen los mecanismos de acción por los que *I. sonora* y *P. aculeata* ejercerían sus putativos efectos hipoglucemiantes. Es por eso que estas plantas son una fuente promisoría de nuevos de compuestos aplicables al tratamiento de la DM-2.

1.6 El cultivo de adipocitos es un modelo óptimo para el estudio de nuevos agentes promisorios para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

A pesar del gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DM-2 a partir de productos naturales, los modelos experimentales utilizados para estos estudios no pueden validar su efectividad. La mayoría de los estudios para evaluar las propiedades antidiabéticas de compuestos y productos naturales se llevan a cabo utilizando modelos animales, principalmente roedores. En diversas especies animales la diabetes puede inducirse de manera farmacológica ó quirúrgica o por manipulación genética. Uno de modelos más utilizados es la inducción farmacológica por medio de estreptozotocina o aloxán, que destruyen las células beta pancreáticas productoras de insulina (Fröde y Medeiros, 2008). Sin embargo, estos sistemas de estudio en los que los animales no producen insulina, o la producen en cantidades insuficientes representan más un modelo de DM-1 que de DM-2, la forma más prevalente de la enfermedad. Además, estos ensayos requieren tiempos muy largos, presentan un alto grado de variabilidad y no son modelos óptimos para explorar en detalle los mecanismos moleculares de acción de los extractos o principios activos.

Nosotros utilizamos cultivos de preadipocitos 3T3 de ratón y preadipocitos subcutáneos humanos normales como modelo experimental para el escrutinio y la caracterización de compuestos aplicables al tratamiento de la DM-2. Estas células tienen alta sensibilidad a la insulina y permiten evaluar de forma simultánea los efectos de los compuestos ensayados sobre la incorporación de glucosa y la adipogénesis. Además, ambos tipos de adipocitos pueden volverse resistentes a la insulina mediante el tratamiento con TNF- α (Hotamisligil y cols., 1994), semejando adipocitos diabéticos de tipo 2.

Los preadipocitos 3T3, establecidos a partir de embriones tardíos de ratón suizo (Todaro y Green, 1963), son capaces de diferenciarse en adipocitos maduros cuando se detiene su proliferación en presencia de señales adipogénicas (Kuri-Harcuch y Green, 1978), acumulando triglicéridos en su citoplasma (Fig. 1A). Las células 3T3-F442A responden a concentraciones fisiológicas de insulina (Lai y cols., 1981) de dos maneras diferentes: 1) amplificación clonal de adipocitos recién comprometidos (Ntambi y Kim, 2000) (Fig. 1A) y 2) incremento de la captación de glucosa por adipocitos maduros (Green y Kehinde, 1975) (Fig. 1B). Es por ello que las líneas celulares de preadipocitos 3T3 pueden ser utilizadas para el escrutinio de compuestos con actividades insulino-miméticas así como para la caracterización molecular de sus mecanismos de acción. Adicionalmente, en nuestro laboratorio desarrollamos un sistema de cultivo de preadipocitos humanos (Herrera-Herrera y cols., 2009), el cual permite evaluar la incorporación de glucosa y determinar el mecanismo de acción de productos naturales con propiedades antidiabéticas.

En este trabajo empleamos cultivos de preadipocitos 3T3 y de preadipocitos humanos normales para evaluar los efectos de extractos acuosos de tubérculos de *Ibervillea sonora* (EAls) y de hojas (EAPah) y flores (EAPaf) de *Parkinsonia aculeata* sobre la diferenciación adiposa y la incorporación de glucosa por adipocitos maduros a fin de caracterizar los mecanismos de acción hipoglucemiante de estas plantas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Los tubérculos de *I. sonorae* S. Watson se obtuvieron en el mercado local (Mercado República, San Luis Potosí, México) y las hojas y flores de *P. aculeata* se recolectaron en el municipio de Xilitla (San Luis Potosí, México) durante los meses de Febrero a Abril del 2006 y su identidad fue confirmada por un especialista (M. Gómez-Sánchez, UAQ). El material vegetal se secó al abrigo de la luz a temperatura ambiente y posteriormente se pulverizó en una licuadora. Los extractos crudos se obtuvieron por decocción de 50 g del material vegetal en 1 L de agua bidestilada estéril en un condensador de reflujo por 2 h. Los extractos obtenidos enfriados a temperatura ambiente se centrifugaron a 11,000 *g* por 30 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de membranas con poros de 0.45 μm (Millipore Co.) y posteriormente se liofilizaron (Freezone 4.5, Labconco). Los extractos liofilizados se almacenaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz hasta su uso en los cultivos celulares.

2.2 Estimación del contenido de fenoles, alcaloides y flavonoides en los extractos vegetales

Los extractos liofilizados se analizaron para determinar el contenido de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (McDonald y cols., 2001), empleando una curva de calibración con ácido gálico (0-250 mg/l) en agua: metanol (1:1, v/v). Se mezclaron 0.25 mL de ácido gálico o de los extractos (0.1 mg/mL) con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10, diluido en agua destilada) y se adicionaron 2 mL de Na_2CO_3 1 M. Las mezclas se incubaron por 2 h a temperatura

ambiente. El contenido de fenoles totales se estimó determinando la absorbencia a 765 nm en un espectrofotómetro Jenway 6405 uv/vis. Los valores se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG) g/kg del extracto vegetal.

El método de Dowd (Arvouet-Grand y cols., 1994) se utilizó para determinar los flavonoides totales presentes en los extractos. Se mezclaron 2.5 mL de AlCl_3 al 2% en metanol con 2.5 mL de los extractos (0.1 mg/mL) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. El contenido de flavonoides totales se estimó mediante espectrofotometría a 415 nm utilizando una curva estándar de quercetina (0-250 mg/l). El contenido de flavonoides se expresa como equivalentes de quercetina (EQ) g/kg del extracto vegetal.

El contenido de alcaloides presentes en los extractos se estimó por el método de Shamsa y colaboradores (2008), empleando una curva de calibración con atropina (0-120 mg/l). Se mezclaron 2.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (fosfato de sodio 0.2 M ajustado a pH 4.7 con ácido cítrico 0.2 M) con 0.1-0.6 mL de atropina (0.1 mg/mL) ó 0.5 mL de los extractos (0.1 mg/mL en agua) con 2.5 mL de verde de bromocresol y 5 mL de cloroformo en un embudo de separación. Después de agitar se recuperó la fase clorofórmica y el contenido de alcaloides se determinó por espectrofotometría a 470 nm. El contenido de alcaloides se expresa como equivalentes de atropina (EA) g/kg del extracto vegetal.

2.3 Determinación de las concentraciones inocuas de los extractos vegetales para células adiposas

Preadipocitos 3T3-F442A (1×10^4 células/pozo) se inocularon en placas de 24 pozos (Corning Glass Works; Corning, NY) con medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY) adicionado con 7% (v/v) de suero de ternera (Hyclone; Logan, UT) (Medio basal; MB). Después de 2 días los cultivos se realimentaron con MB adicionado con diferentes concentraciones de los extractos liofilizados. La densidad celular se registró durante varios días de cultivo mediante recuentos celulares en hematímetro. Todos los cultivos en DMEM se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y cambios de medio cada tercer día. Las concentraciones que disminuyeron más del 20% de la densidad celular se consideraron como tóxicas.

2.4 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-F442A

Cultivos preconfluentes de células 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico [MA; DMEM adicionado con 10% (v/v) de suero fetal de bovino (SFB, GIBCO, BRL), 5 µg/mL insulina y 1 mM d-biotina (Sigma-Aldrich)] adicionado con diferentes concentraciones de los extractos vegetales. Para explorar los efectos proadipogénicos de los extractos, cultivos paralelos se alimentaron con medio no adipogénico [MNA; DMEM adicionado con 4% (v/v) de suero de gato adulto, 5 µg/mL insulina y 1 mM d-biotina] (Kuri-Harcuch y Green, 1978) adicionado con diferentes concentraciones de los extractos. En experimentos adicionales se estimó la actividad tipo insulina de los extractos vegetales en los que preadipocitos 3T3-F442A

se indujeron a diferenciación con MA carente de insulina (MAI⁻) adicionado con diferentes concentraciones de los extractos vegetales. En estos ensayos la acumulación lipídica se estimó al cabo de siete días mediante la tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso O (Sigma-Aldrich) (Ramírez-Zacarías y cols., 1992).

2.5 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-L1

Cultivos confluentes de células 3T3-L1 se alimentaron con medio de inducción (MI; DMEM adicionado con 10% (v/v) de SFB, 250 nM dexametasona, 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina y 1 µg/mL insulina) adicionado con 50 µg/mL de los extractos vegetales. Después de 48 h los cultivos se alimentaron con medio de mantenimiento (MM; DMEM adicionado con 7% (v/v) de suero de ternera, 5 µg/mL insulina y 1 mM d-biotina) adicionado con 50 µg/mL de los extractos vegetales. Para explorar el efecto adipogénico de los extractos, cultivos paralelos se alimentaron con MB adicionado con 50 µg/mL de cada extracto. La acumulación lipídica se estimó al cabo de quince días en MM mediante la tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols., 1992).

2.6 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de preadipocitos humanos

Cultivos preconfluentes de preadipocitos subcutáneos humanos se indujeron a diferenciación con medio adipogénico humano (MAh; L15 (GIBCO, BRL) adicionado con 5% (v/v) de suero fetal de bovino, 100 nM insulina, 100 nM dexametasona, 0.2 nM tri-yodotironina, 1 mM

rosiglitazona) (Herrera-Herrera y cols., 2009) adicionado con 50 µg/mL de los extractos vegetales. Para explorar el efecto adipogénicos de los extractos, cultivos paralelos se alimentaron con medio basal humano (MBh; L15 adicionado con 5% (v/v) de suero fetal de bovino) adicionado con 50 µg/mL de los extractos. La acumulación lipídica se estimó al cabo de treinta días mediante la tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los experimentos realizados en medio L15 se mantuvieron a 37°C en una atmósfera convencional húmeda con cambios de medio cada tercer día.

2.7 Incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3 y humanos

Preadipocitos 3T3 o humanos se inocularon en placas de 96 pozos para fluorescencia (Costar) y se diferenciaron como se describió anteriormente. Los cultivos terminalmente diferenciados se incubaron con PBS a 37°C en ausencia de glucosa durante 2 h. Posteriormente se incubaron por 60 min en PBS con 80 µM del análogo fluorescente de la D-glucosa 2-NBD [2-N-7(nitrobenzen-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino-2-desoxi-D-glucosa] (Invitrogen) (Alonso-Castro y Salazar-Olivo, 2008) y concentraciones no tóxicas de los extractos vegetales. Como controles se utilizaron insulina 100 nM o 10 µM del hipoglucemiante oral rosiglitazona (RGZ). Después de la incubación, las monocapas se lavaron con PBS para eliminar el análogo libre y la fluorescencia retenida en las células se midió en un lector para fluorescencia Tecan-GENios (Tecan), a una longitud de onda de excitación de 460 nm y de emisión a 540 nm, utilizando el programa Magellan 4.0. En experimentos paralelos los adipocitos maduros fueron previamente incubados por 5 días

adicionales con 10 ng/mL TNF- α para inducir la resistencia a insulina (Hotamisligil y cols., 1994) y posteriormente utilizados para experimentos de incorporación de 2-NBDG.

2.8 Efecto de inhibidores de la vía de señalización de la insulina sobre la incorporación de glucosa

La incorporación de glucosa en cultivos tratados con EAls, EAPah y EAPaf se evaluó también en presencia de inhibidores de la vía de señalización de la insulina. Adipocitos maduros 3T3 y humanos se incubaron con PBS a 37°C en ausencia de glucosa durante 2 h. Posteriormente, los cultivos se trataron individualmente con los inhibidores adicionados al PBS durante 1 h. HNMPA-(AM)₃ 200 μ M se utilizó para inhibir el receptor de insulina (Saperstein y cols., 1989), wortmanina (WORT) 200 nM para inhibir la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3-K) (Tomiya y cols., 1995), Akt-I-1/2 420 nM para inhibir Akt (Zhao y cols., 2005), e indinavir (IND) para el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Murata y cols., 2000). Después de la incubación se llevó a cabo el ensayo de incorporación de 2-NBDG como se describió anteriormente en presencia de 50 μ g/mL de EAls, EAPah y EAPaf y del inhibidor correspondiente. Cultivos control fueron tratados con insulina 100 nM o rosiglitazona 10 μ M en presencia y ausencia de los inhibidores.

2.9 Evaluación del efecto antidiabético de muestras comerciales de *I. sonorae*

Siete muestras basadas en *I. sonorae* se obtuvieron en el comercio local. De ellas se obtuvieron extractos acuosos mediante la ebullición de 10 g de muestra en 200 mL de agua bidestilada

estéril y posteriormente se procesaron como se indica en la sección 2.1. El efecto de los extractos en la adipogénesis se evaluó en cultivos de preadipocitos 3T3-F442A a concentraciones de 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver sección 2.4). En experimentos paralelos se evaluaron los efectos de los extractos sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A a las mismas concentraciones (ver sección 2.7).

2.10 Análisis estadístico

Los datos experimentales se expresan como la media \pm desviación estándar de al menos dos experimentos realizados por triplicado y se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía. El nivel de $P \leq 0.05$ se utilizó como un criterio de significancia estadística. Los datos se analizaron con el programa estadístico JMP 5.1 (SAS Institute, Cary, NC).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de los extractos acuosos de raíz de *I. sonorae* (EAls) y de hojas (EAPah) y flores (EAPaf) de *P. aculeata*

Los extractos liofilizados rindieron 4.18 g de EAls, 1.2 g de EAPah y 8.27 g de EAPaf con proporciones de extracto obtenido con respecto a la preparación de la planta de 1:11.96, 1:41.6 y 1:6.1, respectivamente. La caracterización química de EAls resultó en 1.38 ± 0.07 EAG g/kg de compuestos fenólicos, 4.81 ± 0.04 EA g/kg de flavonoides y no se detectó presencia de alcaloides. Para EAPah y EAPaf se obtuvieron 9.43 ± 0.12 y 3.16 ± 0.11 EAG g/kg de compuestos fenólicos, 7.45 ± 0.01 y 5.74 ± 0.04 EA g/kg de flavonoides y 9.36 ± 4.4 y 35.16 ± 4.5 EQ g/kg de alcaloides, respectivamente. Algunos de estos compuestos como alcaloides, flavonoides, terpenos y fenoles se han reportado como los principales componentes activos de diversas plantas antidiabéticas (Jung y cols., 2006). Los extractos acuosos de *I. sonorae* y *P. aculeata* evaluados en el presente trabajo también contienen fenoles y flavonoides, además esta última contiene alcaloides, los cuales pudieran ser los responsables de las actividades antidiabéticas. Estudios fitoquímicos se han realizado en otras plantas antidiabéticas. *Aloe ferox* es comúnmente utilizada en Sudáfrica para el tratamiento de la DM-2 y su composición química resultó en 0.792 EAG g/kg de polifenoles y 0.05 EA de flavonoides (Loots y cols., 2007). Por otra parte, *Equisetum arvense* L, utilizado por la medicina tradicional de Medio Oriente para el tratamiento de la DM-2, reveló un contenido de 2.5 EA g/kg de alcaloides (Shamsa y cols., 2008). En nuestro estudio, EAls mostró 1.7 veces la concentración de fenoles y 96 veces la concentración de flavonoides presentes en *Aloe ferox*. Por otra parte EAPah y EAPaf mostraron

12 y 4 veces la concentración de fenoles y 149 y 115 veces la de flavonoides con respecto a *Aloe ferox*, así como 3.7 y 14 veces la concentración de alcaloides presentes en *Equisetum arvense*, respectivamente. Las altas concentraciones de flavonoides en *I. sonorae* y fenoles en *P. aculeata* podrían explicar la alta capacidad de estas plantas para estimular la incorporación de 2-NBDG en adipocitos sensibles y resistentes a insulina como se muestra en resultados posteriores.

3.2 Determinación de concentraciones inocuas de los extractos vegetales para las células 3T3-F442A

Para determinar las concentraciones inocuas de EAls, EAPah y EAPaf aplicables a los bioensayos se evaluaron los efectos de dichos extractos sobre la proliferación de los preadipocitos 3T3-F442A. Los extractos se adicionaron al MB a concentraciones entre 1 y 100 µg/mL. En los tres extractos solo las concentraciones de 70 y 100 µg/mL disminuyeron de manera considerable la densidad celular con respecto al control en MB (Fig. 2). A dichas concentraciones EAls disminuyó la densidad celular final en 30% y 37% respectivamente (Fig. 2A), EAPah en 44% y 47% (Fig. 2B), mientras que EAPaf disminuyó la densidad celular en 38% y 41% (Fig. 2C). Puesto que concentraciones de 1 a 50 µg/mL de los tres extractos no disminuyeron de manera significativa la densidad celular al cabo de 6 días en tratamiento, los efectos metabólicos de estas preparaciones se evaluaron en este intervalo de concentraciones.

3.3 Efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la adipogénesis murina y humana

Debido a que algunos hipoglucemiantes orales estimulan el desarrollo del tejido adiposo, lo que induce a obesidad (de Souza y cols., 2001), nosotros determinamos el efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la adipogénesis de preadipocitos murinos y humanos. Evaluados en condiciones adipogénicas, EAls y EAPah incrementaron significativamente la acumulación lipídica de las células 3T3-F442A de manera concentración-dependiente. A 50 µg/mL EAls y EAPah estimularon la adipogénesis en 379% y 258%, respectivamente, respecto al control de MA (Fig. 3A y B). Por otro lado, EAPaf adicionado al MA sólo afectó la acumulación lipídica de los preadipocitos 3T3-F442A evaluado a 50 µg/mL en 124% (Fig. 3C).

Los resultados obtenidos con EAls y EAPah sugieren que estos extractos poseen potentes efectos adipogénicos sobre las células 3T3-F442A, contrario a lo obtenido con EAPaf, que sólo afectó la adipogénesis a la mayor concentración evaluada en este tipo celular. Por ello, evaluamos la capacidad adipogénica de EAls y EAPah en condiciones adipogénicas y no adipogénicas sobre tres tipos celulares, 3T3-F442A, 3T3-L1 y preadipocitos humanos. EAls 50 µg/mL estimuló la acumulación lipídica de los preadipocitos 3T3-F442A en 379% adicionado al medio adipogénico y en 64% ensayado en condiciones no adipogénicas. EAls, sin embargo, no afectó la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1 y humanos en ambas condiciones (Fig. 4A). Por su parte, EAPah evaluado en condiciones adipogénicas incrementó la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3-F442A y 3T3-L1 en 258% y 169%, respectivamente, mientras que redujo la acumulación lipídica en los preadipocitos humanos en 57% (Fig. 4B). En condiciones no adipogénicas, EAPah solamente incrementó la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A en 52%, y no tuvo efectos proadipogénicos significativos sobre los preadipocitos 3T3-L1 y humanos

(Fig. 4B). Estos resultados indican que los extractos por sí mismos tienen efectos proadipogénicos sólo en los preadipocitos 3T3-F442A, pero no en los otros dos tipos celulares.

La insulina afecta la diferenciación y el metabolismo de los adipocitos 3T3 induciendo la amplificación clonal transitoria de los adipocitos recién comprometidos y estimulando la incorporación de glucosa en los adipocitos maduros. Para determinar si EAls, EAPah y EAPaf poseen actividades tipo insulina evaluamos el efecto de estos extractos sobre la acumulación de triglicéridos inducida por MAI carente de insulina (MAI⁻) en preadipocitos 3T3-F442A. En dichas condiciones EAls, EAPah y EAPaf a 50 µg/mL incrementaron la adipogénesis en 41%, 151% y 47%, respectivamente, en comparación al control de MAI⁻ (Fig. 5). Estos resultados sugieren que EAls, EAPah y EAPaf poseen actividades insulino-miméticas que modulan en diverso grado la adipogénesis de las células 3T3. La presencia de compuestos insulino-miméticos se ha reconocido previamente en otras plantas reputadas como antidiabéticas. Resultados obtenidos con *Guazuma ulmifolia* (Alonso-Castro y Salazar-Olivo, 2008) y con *Cecropia obtusifolia* y su compuesto activo, ácido clorogénico (Alonso-Castro y cols., 2008) indicaron que preparaciones de estas plantas presentan actividades tipo insulina que favorecen la adipogénesis de las células 3T3.

3.4 EAls, EAPah y EAPaf estimulan la incorporación de 2-NBDG en adipocitos 3T3 y humanos sensibles y resistentes a insulina

Los agentes hipoglucemiantes pueden ejercer sus efectos a través de tres mecanismos principales: disminuyendo la absorción intestinal de glucosa, estimulando la secreción de

insulina por las células beta pancreáticas y favoreciendo la incorporación de glucosa en los tejidos blanco de la insulina como el músculo, el hígado o el tejido adiposo. El tercer mecanismo es el más prometedor para el tratamiento de la DM-2 debido a que disminuye la concentración de glucosa en la sangre permitiendo el metabolismo y uso de los azúcares por los tejidos.

Aunque existen algunos reportes sobre las propiedades antidiabéticas de *I. sonorae* y *P. aculeata* (Alarcón-Aguilar y cols., 2002; Alarcón-Aguilar y cols., 2005; Leite y cols., 2007) y sobre la composición química de estas plantas (Hernández-Galicia y cols., 2007; Besson y cols., 1980), los compuestos responsables de su actividad hipoglucemiante y sus mecanismos de acción se desconocen. Para determinar si EAls, EAPah y EAPaf estimulan la incorporación de glucosa en adipocitos, evaluamos sus efectos sobre la captación de 2-NBDG en adipocitos 3T3 y humanos. Los tres extractos promovieron la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos, en función de la concentración y con distinta potencia, comparados con el control de insulina. EAls 50 µg/mL estimuló la incorporación del análogo de la glucosa en 100%, 64% y 33% en adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos, respectivamente (Fig. 6A). EAPah 50 µg/mL estimuló la incorporación de 2-NBDG en 261%, 98% y 109% en adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos (Fig. 6B), mientras que EAPaf a la concentración mencionada, promovió la incorporación del análogo en 191%, 117% y 98%, respectivamente, en cada tipo de adipocito (Fig. 6C). Estos resultados muestran que EAls, EAPah y EAPaf ejercen sus efectos antidiabéticos por medio de actividades que mimetizan la acción de la insulina en la incorporación de glucosa por adipocitos.

Para tener una visión más detallada del potencial antidiabético de nuestros extractos analizamos su efecto sobre adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos resistentes a insulina por

tratamiento con TNF- α (Hotamisligil y cols., 1994). Estas células representan de un mejor modelo de estudio para evaluar las actividades aplicables al tratamiento de la DM-2. En ensayos de incorporación de 2-NBDG los adipocitos 3T3 y humanos tratados previamente con TNF- α no fueron capaces de incorporar el análogo en respuesta a insulina (Fig. 7). EAls, EAPah y EAPaf fueron capaces de revertir la resistencia a insulina mediada por TNF- α en estos adipocitos en los que indujeron la incorporación de 2-NBDG a niveles similares alcanzados en adipocitos normales en respuesta a insulina. A 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EAls estimuló la incorporación del análogo en 117%, 84% y 48% en adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos resistentes a insulina, respectivamente (Fig. 7A). EAPah indujo la incorporación de 2-NBDG en 71% y 49% en adipocitos 3T3-F442A y 3T3-L1 resistentes a insulina, mientras que en adipocitos humanos resistentes a la hormona no fue capaz de inducir la incorporación del análogo a ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 7B). EAPaf estimuló la incorporación del análogo de la glucosa en 69%, 154% y 66% en adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos resistentes a insulina, respectivamente (Fig. 7C).

Los resultados muestran que EAls, y EAPaf son capaces de inducir la incorporación de glucosa incluso en adipocitos 3T3 y humanos resistentes a insulina mientras que EAPah solamente en adipocitos 3T3 insulino-resistentes pero no en adipocitos humanos resistentes a la hormona. La capacidad de los extractos de inducir la incorporación de glucosa por adipocitos resistentes a insulina nos muestran el alto potencial antidiabético de estas plantas, ya sea que utilicen una vía de señalización distinta a la de la hormona o bien que sean capaces de revertir la resistencia a insulina inducida por TNF- α . Extractos de otras plantas como *Amomum xanthioides* (Kang y Kim, 2004) y *Momordica charantia* (Roffey y cols., 2007) estimulan la incorporación de glucosa en

adipocitos 3T3-L1. Sin embargo, estos trabajos solo evaluaron los efectos sobre adipocitos normales y no sobre modelos de adipocitos resistentes a insulina, por lo que brindan información parcial sobre el verdadero potencial antidiabético que poseen las preparaciones estudiadas. Por el contrario, trabajos realizados en nuestro laboratorio mostraron que plantas usadas en la medicina tradicional mexicana, tales como *Guazuma ulmifolia*, *Cecropia obtusifolia* y su compuesto activo ácido clorogénico ejercen sus efectos antidiabéticos estimulando la incorporación de glucosa en adipocitos sensibles y resistentes a insulina (Alonso-Castro y Salazar-Olivo, 2008; Alonso-Castro y cols., 2008). Los resultados del presente trabajo muestran que compuestos con tal potencialidad antidiabética están presentes también en *I. sonorae* y *P. aculeata*.

3.5 EAls estimula la incorporación de glucosa a través de una vía de señalización parcialmente diferente a la de la insulina en adipocitos humanos

El mecanismo por el cual la glucosa es incorporada por las célula involucra diversas moléculas que regulan la translocación del transportador de glucosa sensible a insulina GLUT4 (Thong y cols., 2005). Ya que establecimos que los extractos son capaces de estimular la captación de glucosa en adipocitos sensibles y resistentes a insulina evaluamos si afectan la vía de señalización de insulina para estimular la incorporación de 2-NBDG. Utilizando inhibidores para diversos elementos de la vía de señalización de insulina evaluamos el mecanismo de acción de EAls, EAPah y EAPaf en adipocitos murinos y humanos. La incorporación mediada por EAPah y EAPaf en los tres tipos de adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos fue reprimida por los

inhibidores para el receptor de la insulina (RI), PI-3K, Akt y GLUT4 en un grado similar al obtenido con la insulina en presencia de los inhibidores (Fig. 8). Estos resultados muestran que la incorporación de glucosa en adipocitos estimulada por EAPah y EAPaf es dependiente de los elementos de la vía de señalización de insulina y sugieren que los efectos hipoglucemiantes de *P. aculeata* están mediados por esta vía de señalización.

La incorporación de 2-NBDG mediada por EAls en adipocitos 3T3-F442A y 3T3-L1 fue asimismo reprimida por todos los inhibidores. Sin embargo, la incorporación del análogo en adipocitos humanos no fue bloqueada por wortmanina, un inhibidor de PI-3K (Fig. 8). Estos resultados sugieren que EAls utiliza una vía parcialmente diferente a la de la insulina para la inducción de la incorporación de glucosa por el tejido adiposo humano.

Se ha mostrado que algunas plantas antidiabéticas y sus compuestos activos favorecen la incorporación de glucosa en adipocitos a través de la vía de señalización de la insulina induciendo la fosforilación de los elementos de esta vía. Las semillas de *Trigonella foenum-graecum* L. estimulan la incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 y células hepáticas HepG2 a través de la vía de señalización de insulina e inducen la fosforilación de RI, PI-3K y PKC en un grado similar al de la insulina (Vijayakumar y cols., 2005). De la misma manera el ácido tánico, aislado de *Lagerstroemia speciosa*, estimula la incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 a través de la vía de señalización de insulina y favorece la fosforilación del RI, PI-3K y Akt (Liu y cols., 2005). Asimismo, EAPah y EAPaf inducen la incorporación de glucosa en las células adiposas múridas y humanas utilizando la vía de señalización de insulina. Sin embargo, EAls utiliza una vía de señalización parcialmente diferente a la de la insulina para inducir la incorporación glucosa en adipocitos humanos. Experimentos futuros en nuestro laboratorio

podrían identificar de la vía de señalización por la cual EAls actúa; esto permitirá el enfoque a nuevos blancos terapéuticos y el desarrollo de fármacos con actividad dirigida a vías de señalización alternativas a la de la insulina.

En resumen, nuestros resultados muestran que EAls, EAPah y EAPaf inducen la incorporación de glucosa en adipocitos de ratón y humano, sensibles y resistentes a insulina, excepto por EAPah que no es capaz de inducir la incorporación de glucosa por adipocitos humanos resistentes a insulina. Nuestros resultados muestran también que EAPah y EAPaf inducen la incorporación de glucosa a través de la vía de señalización de la insulina mientras que EAls utiliza una vía parcialmente diferente en adipocitos humanos subcutáneos normales. Los efectos que muestran los extractos sugieren que tanto *I. sonora* como *P. aculeata* son fuentes promisorias de compuestos de utilidad para el desarrollo de nuevos fármacos para tratar la DM-2.

3.6 Las preparaciones comerciales de *I. sonora* tienen un marcado efecto anti-adipogénico y un modesto efecto estimulador de la incorporación de glucosa

La popularización de terapias alternativas para el tratamiento de la DM (Pagán y Tanguma, 2007), ha resultado en la aparición de numerosas presentaciones comerciales basadas en plantas reputadas como antidiabéticas, aunque su eficacia terapéutica no haya sido validada. Nosotros analizamos los efectos de siete preparaciones comerciales de *I. sonora* sobre la incorporación de 2-NBDG y la adipogénesis de células 3T3-F442A. Cinco muestras consistieron en preparaciones puras de *I. sonora* (EMI 1-5) mientras que las dos restantes fueron mezclas

de *I. sonorae* con *Tecoma stans* (EMI 6 y 7). Los extractos de las muestras comerciales se evaluaron a las concentraciones empleadas para EAIs (1-50 µg/mL).

En contraste con los resultados obtenidos con nuestro extracto (EAIs), seis de las preparaciones comerciales analizadas exhibieron un marcado efecto anti-adipogénico sobre las células 3T3-F442A y solo un modesto efecto estimulador de la incorporación de glucosa. Evaluadas a 50 µg/mL, las muestras comerciales de *I. sonorae* bloquearon la acumulación lipídica de los preadipocitos 3T3-F442A en 68%, 49%, 58%, 23%, 42%, 71% y 54% (EMI 1-7, respectivamente). Por otra parte, las muestras estimularon la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A en 44%, 16%, 30%, 35%, 2.3%, 10% y 107% (EMI 1-7, respectivamente). Solo EMI4 no afectó de manera significativa la adipogénesis de estas células, mientras que EMI7 fue la única preparación que indujo niveles de incorporación de 2-NBDG similares ($P \geq 0.05$) a los inducidos por insulina o por EAIs. Sin embargo, el efecto de esta muestra sobre la captación de 2-NBDG no puede atribuirse solamente a *I. sonorae* puesto que esta preparación contuvo también *Tecoma stans*. Esta es otra planta antidiabética presente en la mezcla de la preparación comercial. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que un extracto acuoso de *Tecoma stans* estimula la incorporación de glucosa en adipocitos murinos y humanos sensibles y resistentes a insulina (Alonso-Castro y cols., enviado a publicación). La actividad de *T. stans* en conjunto con la de *I. sonorae* podrían explicar los niveles significativos de incorporación del análogo de glucosa que induce la muestra EMI7 en comparación con las otras muestras. Por otra parte, dos preparaciones (EMI3 y EMI6) parecen tener efectos citotóxicos a concentraciones que en nuestro extracto fueron inocuas.

IV. CONCLUSIONES

1. *Ibervillea sonora* y *Parkinsonia aculeata* ejercen sus efectos antidiabéticos estimulando la incorporación de glucosa por el tejido adiposo. Además EAls y EAPaf son capaces de inducir la incorporación de glucosa en adipocitos múridos y humanos resistentes a insulina.
2. Los extractos de hojas (EAPah) y flores (EAPaf) de *P. aculeata* favorecen la incorporación de glucosa en adipocitos múridos y humanos empleando la vía de señalización de la insulina, mientras que el extracto de *I. sonora* (EAls) utiliza una vía parcialmente diferente en adipocitos humanos.
3. Esto podría afectar nuevos blancos y llevar al desarrollo de fármacos con actividad dirigida a elementos de la vía de señalización de insulina o de vías alternativas.
4. Los tres extractos carecen de efectos adipogénicos en preadipocitos humanos y solamente EAls y EAPah poseen efectos adipogénicos en preadipocitos 3T3-F442A de ratón. La carencia de efectos inductores del tejido adiposo humano es una característica altamente deseable para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para la DM-2.
5. La alta capacidad de los extractos de estimular la incorporación de glucosa, aunado a su carencia de efectos adipogénicos en células humanas sugieren que *I. sonora* y *P. aculeata* son fuentes promisorias de compuestos antidiabéticos para el tratamiento de la DM-2.
6. Seis de siete preparaciones comerciales de *I. sonora* tuvieron un leve efecto estimulatorio de la incorporación de glucosa lo que sugiere la necesidad de evaluar la eficacia de los productos naturales de venta en el mercado.

V. REFERENCIAS

- Aguilar-Salinas CA, Velásquez-Monroy O, Gomez-Perez FJ, González-Chavez A, Esqueda AL, Molina-Cuevas V, Rull-Rodrigo JA, Tapia-Conyer R. 2003. Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care* 26, 2021-2026.
- Alarcón-Aguilar FJ, Calzada-Bermejo F, Hernandez-Galicia E, Ruiz-Angeles C, Roma-Ramos R, 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* extracts-II. *J Ethnopharmacol* 97, 447-52.
- Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Aguirre-García F. 2002. Investigation on the hypoglycemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Res* 16, 383-386.
- Alonso-Castro AJ, Miranda-Torres AC, González-Chávez MM, Salazar-Olivo LA. 2008. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 120, 458–464.
- Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA. 2008. The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. *J Ethnopharmacol* 118, 252–256.
- Alonso-Castro AJ, Zapata-Bustos R, Romo-Yañez J, Camarillo-Ledesma P, Gómez-Sánchez M, Salazar-Olivo LA. The anti-diabetic plants *Tecoma stans* and *Teucrium cubense* induce the

incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. Enviado a publicación.

Anónimo, 2001. Boletín no. 206 de la Coordinación de comunicación social. Instituto Mexicano del Seguro Social. México.

Arredondo A, Zuñiga A, 2004. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle-income countries: the Mexican case. *Diabetes Care* 27, 104-109.

Arredondo A, Zúñiga A, Parada I. 2005. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from Mexico. *Public Health* 119, 711-720.

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J Pharm Bel* 49, 462-468.

Besson E, Chopin J, Gunasegaran R, Ramachandran Nair AG. 1980. C-glycosylflavones from *Parkinsonia aculeata*. *Phytochemistry* 19, 2787-2788.

Bustos-Saldana R, Barajas-Martínez A, López-Hernández G, Sánchez-Novoa E, Palomera-Palacios R, Islas-García J. 2007. Conocimientos sobre diabetes mellitus en pacientes diabéticos tipo 2 tanto urbanos como rurales del occidente de México. *Medicina Familiar* 9, 147-159.

Caldwell SH, Patrie JT, Brunt EM, Redick JA, Davis CA, Park SH, Neuschwander-Tetri BA. 2007. The effects of 48 weeks of rosiglitazone on hepatocyte mitochondria in human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 46, 1101-1107.

- Chang L, Chiang SH, Saltiel A. 2004. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular medicine* 10, 7-12.
- de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF. 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50, 1863-1871.
- Ekoé JM, Zimmet P, Rhys Williams DR. 2001. México. The epidemiology of diabetes mellitus. An international perspective. John Wiley and Sons. 195-204. ISBN 047197448X, 9780471974482.
- Fröde TS, Medeiros YS. 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol* 115, 173-183.
- Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27.
- Hernández-Galicia E, Calzada F, Roma-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ, 2007. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med* 73, 1-5.
- Herrera-Herrera ML, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo LA. 2009. Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications. *Cytotherapy* 29, 1-9.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4854-4858.

- Inzucchi SE, 2002. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. Scientific Review. JAMA, 287, 360-372.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 13, 1203–1218.
- Kang Y, Kim HY. 2004. Glucose uptake-stimulatory activity of Amomi Semen in 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol* 92, 103-105.
- Kuri-Harcuch W, Green H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci* 75, 6107-6109.
- Lai E, Rosen OM, Rubin CS. 1981. Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase. Roles of the B-receptor and the G/F protein in differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 256, 12866-12874.
- Leite ACR, Araújo TG, Carvalho BM, Silva NH, Lima VLM, Maia MBS. 2007. Parkinsonia aculeata aqueous extract fraction: Biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 111, 547-552.
- Loots DT, van Der Westhuizen FH, Botes L. 2007. Aloe ferox leaf gel phytochemical content, antioxidant capacity, and possible health benefits. *J Agric Food Chem* 55, 6891–6896.
- Liu X, Jae-kyung Kim, Yunsheng Li, Jing Li, Fang Liu, Xiaozhuo Chen, 2004. Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *J Nutr* 135, 165-71.

- Liu X, Kim JK, Li Y, Li J, Liu F, Chen X, 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells.. J Nutr 131, 2242-7.
- Luna B, Feinglos MN. 2001. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. Am Fam Physician 63, 1747-1756.
- McDonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chem 73, 73–84.
- Murata H, Hruz PW, Mueckler M. 2000. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. J Biol Chem 275, 20251-20254.
- Ntambi JM, Kim YC. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. J Nutr 130, 3122-3126.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008. Accesado el 11 de mayo de 2008 http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_amro_mex_mexico.pdf
- Pagán JA, Tanguma JT. 2007. Health care affordability and complementary and alternative medicine utilization by adults with diabetes. Diabetes Care 30, 2030-2031.
- Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. Histochem Cell Biol 97, 493-497.
- Roffey BW, Atwal AS, Johns T, Kubow S. 2007. Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. J Ethnopharmacol 112, 77-84.

- Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, Montague DC, Lecka-Czernik B. 2004. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* 145, 401-406.
- Saperstein R, Vicario PP, Strout HV, Brady E, Slater EE, Greenlee WJ, Ondeyka DL, Patshett AA, Hangauer DG. 1989. Design of a selective insulin receptor tyrosine kinase inhibitor and its effect on glucose uptake and metabolism in intact cells. *Biochem* 28, 5694-5701.
- Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci* 32, 17–20.
- Spiller HA, Sawyer TS. 2006. Toxicology of oral antidiabetic medications. *Am J Health-System Pharm* 63, 929-938.
- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. 1997. Protein kinase C- as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 272, 30075-30082.
- Thong FSL, Dugani CB, Klip A. 2005. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology* 20, 271-284.
- Todaro GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.

- Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. 1995. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *BBRC* 212, 263-269.
- Turmelle YP, Shikapwashya O, Tu S, Hruz PW, Yan Q, Rudnik DA. 2006. Rosiglitazone inhibits mouse liver regeneration. *Fed Am Soc Exp Biol J* 20, 2609-2611.
- Vijayakumar MV, Singh S, Chhipa RR, Bhat MK. 2005. The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway. *British J Pharmacol* 146, 41-48.
- Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. 2004. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocrine Reviews* 25, 177-204.
- Zhao Z, Leister WH, Robinson RG, Barnett SF, Defeo-Jones D, Jones RE, Hartman GD, Huff JR, Huber HE, Duggan ME, Lindsley CW. 2005. Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters* 15, 905-909.

VI. PIES DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efectos de la insulina sobre preadipocitos 3T3-F442A. Las células 3T3 inician su diferenciación adiposa terminal cuando devienen quiescentes en presencia de señales adipogénicas de origen sérico. Entonces cambian su forma fibroblástica, con largos procesos citoplasmáticos, a células redondeadas, más grandes y con acumulación de triglicéridos en el citoplasma. Las células 3T3-F442A responden a la insulina de dos diferentes maneras: mediante la amplificación clonal de los adipocitos recién comprometidos (A), e incrementando la captación de glucosa mediante la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática de adipocitos maduros (B).

Figura 2. Efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la proliferación de preadipocitos 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A se inocularon en placas de 24 pozos (1×10^4 células/pozo) con DMEM suplementado con 7% de suero de ternera (medio basal; MB). Después de dos días, los cultivos se alimentaron con MB adicionado con diferentes concentraciones de EAls, EAPah y EAPaf. La densidad celular se determinó en los días señalados mediante recuentos celulares con hematímetro. La figura representa el valor promedio \pm desviación estándar (DE) de dos experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado.

Figura 3. Efecto de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-F442A. La diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A se indujo con medio adipogénico (MA) adicionado con diferentes concentraciones de EAls, EAPah y EAPaf. Los cultivos control se mantuvieron en MA o medio no adipogénico (MNA). Después de 7 días los cultivos se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 4. Efecto adipogénico de EAls y EAPah sobre preadipocitos murinos y humanos subcutáneos normales. Cultivos de preadipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos se mantuvieron en condiciones adipogénicas (medio adipogénico, MA) y no adipogénicas (medio no adipogénico, MNA; o medio basal, MB) en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EAls y EAPah. Cultivos control recibieron medio MA, MNA o MB. Los cultivos se fijaron después de 7 días (3T3-F442A), 15 días (3T3-L1) o 30 días (humanos) y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 5. Evaluación de los efectos insulino-miméticos de EAls, EAPah y EAPaf en la adipogénesis de 3T3-F442A. La diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A se indujo con medio adipogénico carente de insulina (MAI-) adicionado con diferentes concentraciones de EAls, EAPah y EAPaf. Cultivos control recibieron MA o medio no adipogénico (MNA). Después de 7 días los cultivos se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 6. Efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3 y humanos. Adipocitos 3T3-F442A, 3T3-L1 y humanos subcutáneos normales se incubaron con PBS/ASB conteniendo 2-NBDG 80 μ M y concentraciones no tóxicas de EAls, EAPah y EAPaf durante 60 min. Cultivos control recibieron insulina (INS) o rosiglitazona (RGZ) a las concentraciones señaladas. Después de la incubación, el 2-NBDG libre se lavó de los cultivos y la fluorescencia retenida en las monocapas celulares se midió en un fluorómetro. Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 7. Efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3 y humanos insulino-resistentes. Adipocitos 3T3 y humanos terminalmente diferenciados se incubaron con 10 ng/mL TNF- α por 5 días para inducir la resistencia a insulina (Hotamisligil y cols., 1994). Posteriormente se incubaron con PBS/ASB y 2-NBDG 80 μ M y concentraciones no tóxicas de EAls, EAPah y EAPaf durante 60 min. Cultivos control recibieron insulina (INS) o rosiglitazona (RGZ) a las concentraciones señaladas. Después de la incubación, el 2-NBDG libre se lavó de los cultivos y se midió la fluorescencia retenida en las monocapas celulares. Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

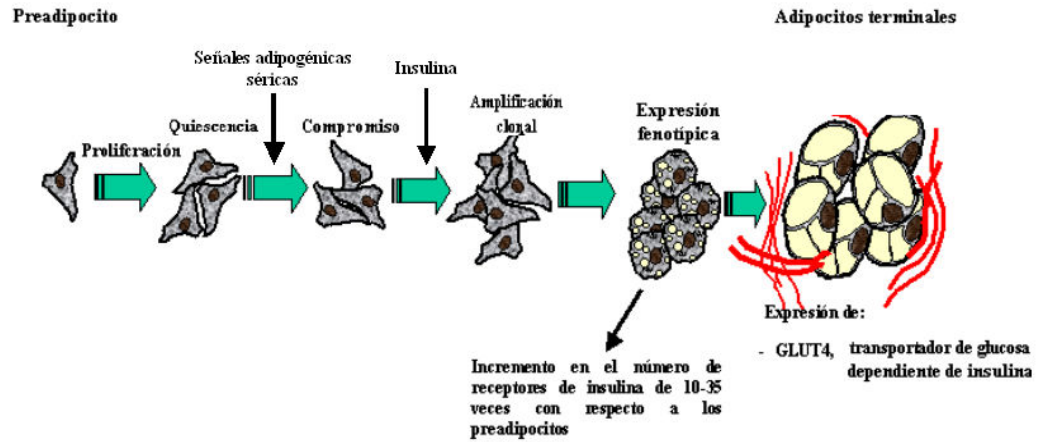
Figura 8. Efecto de inhibidores de la vía de señalización de insulina sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos tratados con EAls, EAPah y EAPaf. El efecto de EAls, EAPah y EAPaf sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3 y humanos terminalmente diferenciados se evaluó en presencia de inhibidores de la vía de señalización de la insulina: HNMPA-(AM)₃ (inhibidor del receptor de insulina), wortmanina (WORT; inhibidor de la fosfatidilinositol 3 cinasa PI3-K), Akt-I-1/2 (AKT INH; inhibidor de la cinasa Akt), e indinavir (IND; inhibidor del transportador de glucosa 4). Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 9. Efecto de muestras comerciales de *I. sonora* sobre la adipogénesis de 3T3-F442A. La diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A se indujo con medio adipogénico (MA) adicionado con diferentes concentraciones de los extractos de las muestras comerciales de *I. sonora* (EMI 1-7). Cultivos control recibieron MA o medio no adipogénico (MNA). Después de 7 días los cultivos se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

Figura 10. Efecto de muestras comerciales de *I. sonora* sobre la incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A. Adipocitos 3T3-F442A se incubaron en PBS/ASB con 2-NBDG 80 μ M y concentraciones de 1 a 50 μ g/mL de los extractos de siete muestras comerciales de *I. sonora* (EMI 1-7) durante 60 min. Cultivos control recibieron insulina (INS). Después de la incubación, el 2-NBDG libre se lavó de los cultivos y se midió la fluorescencia retenida en las monocapas celulares. Los resultados representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado. Las letras minúsculas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía.

VII. FIGURAS

A



B

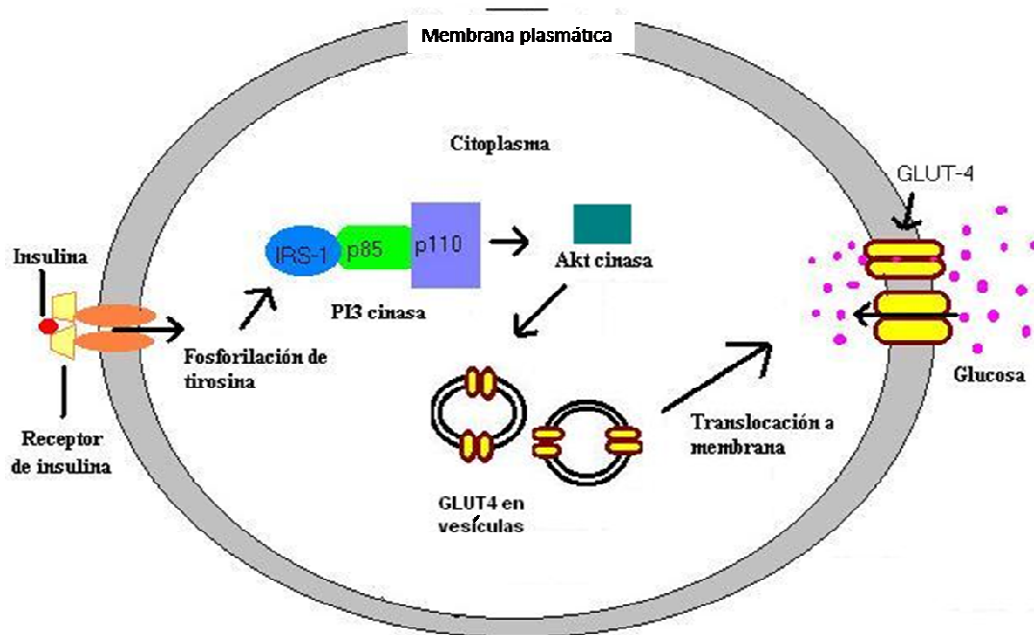


Figura 1

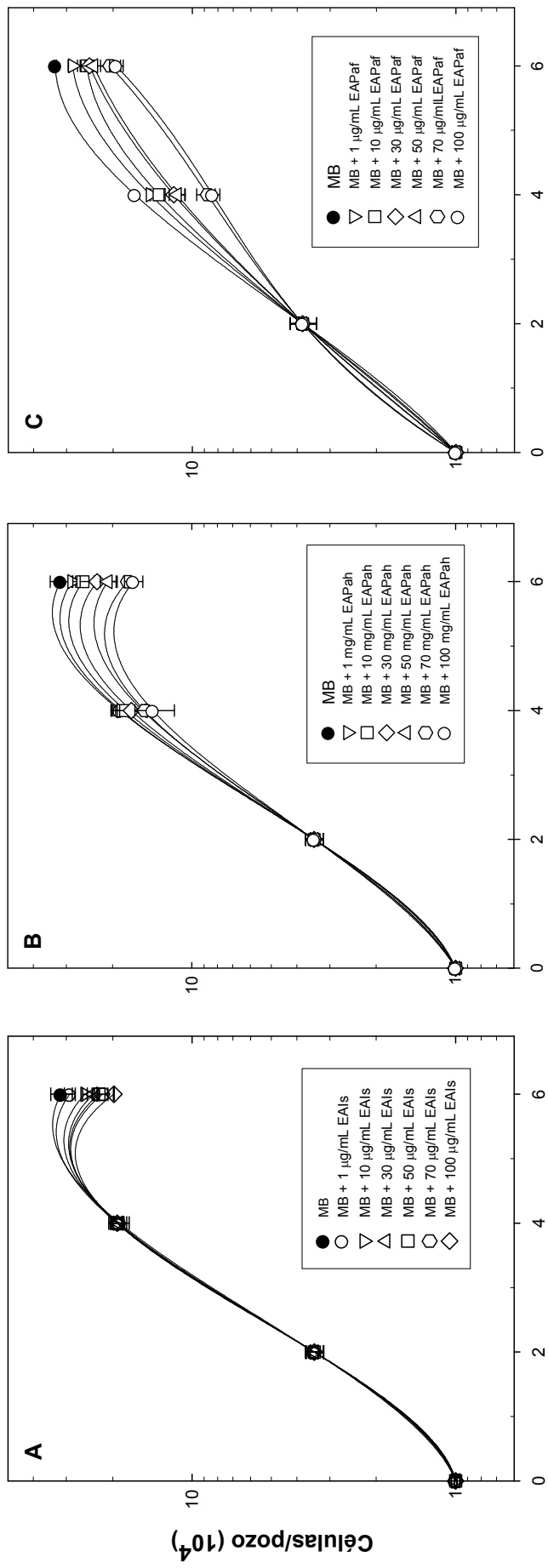


Figura 2

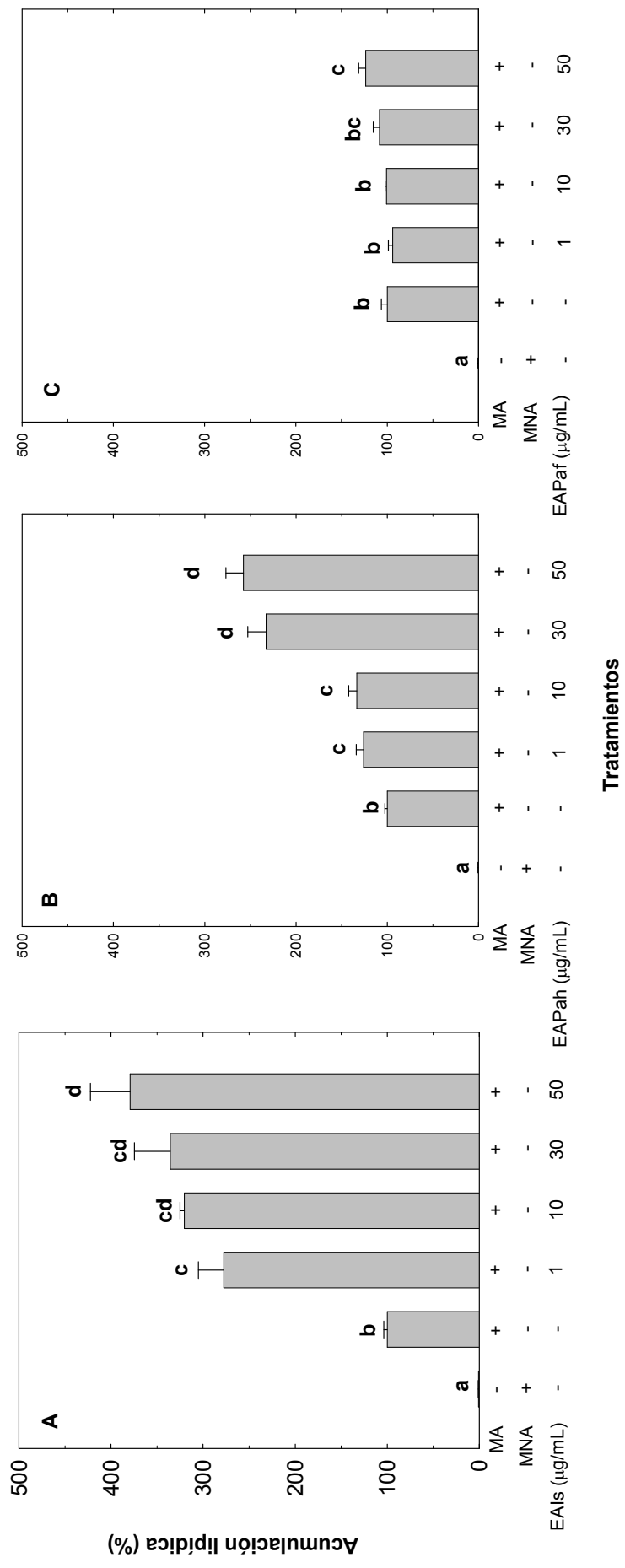


Figura 3

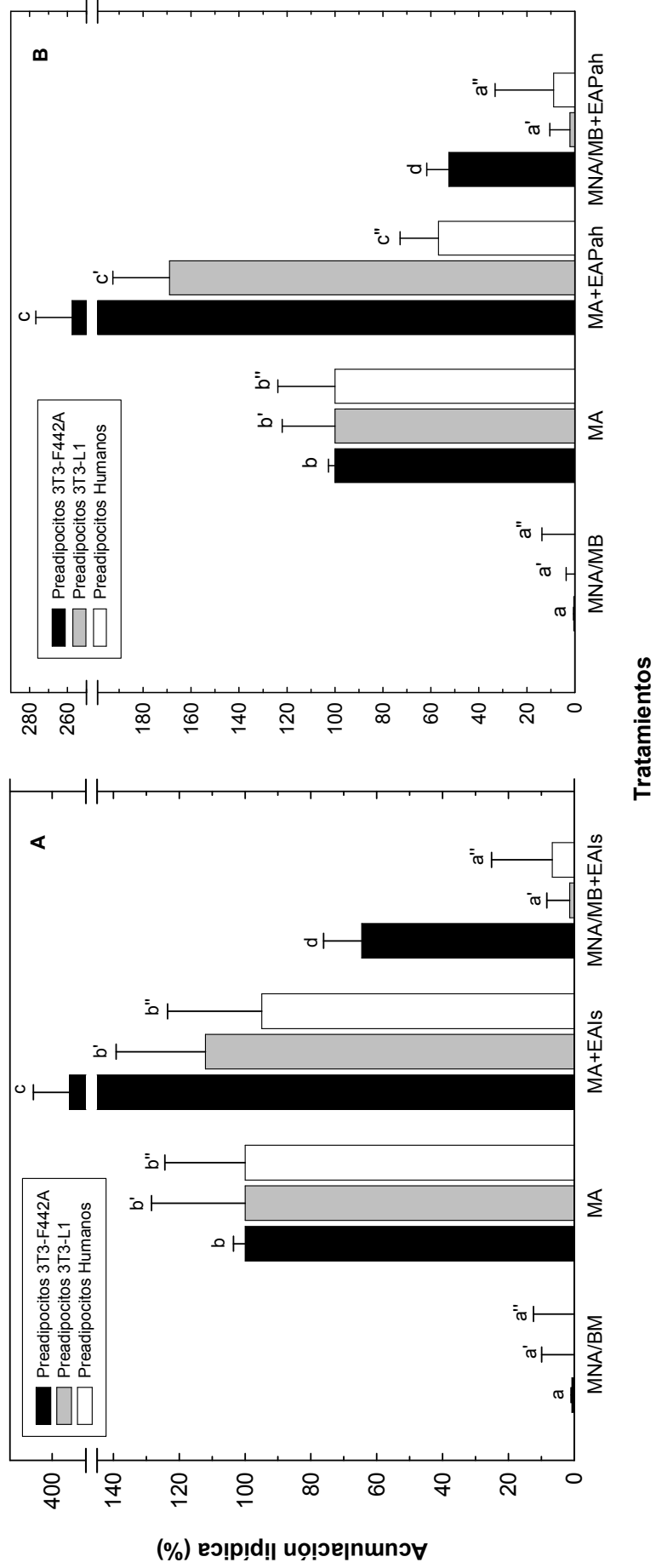


Figura 4

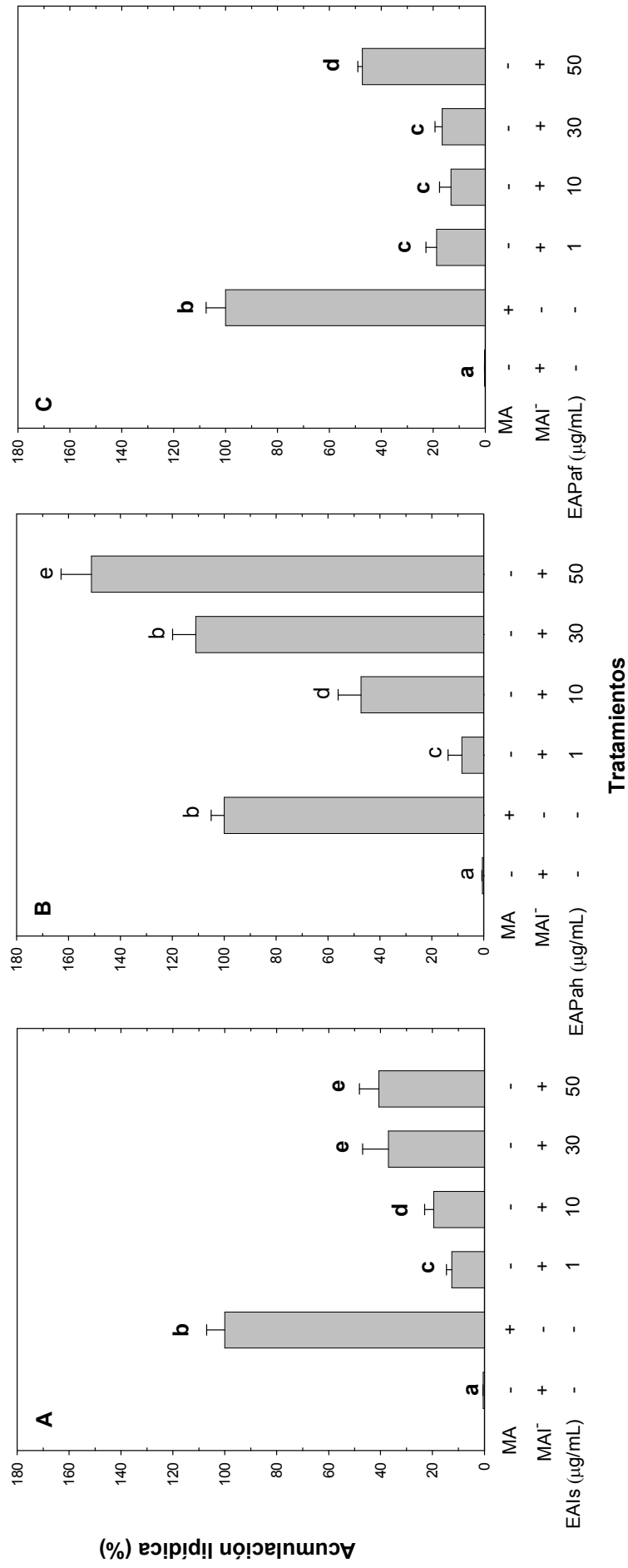
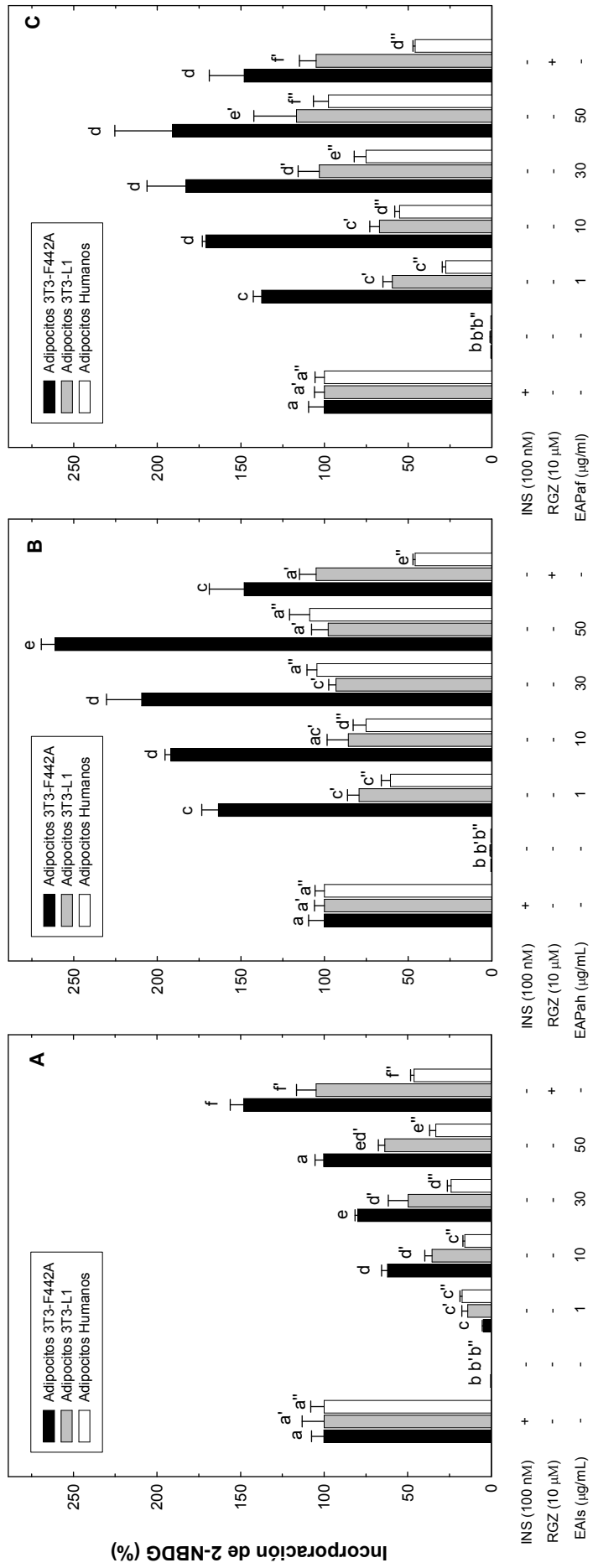
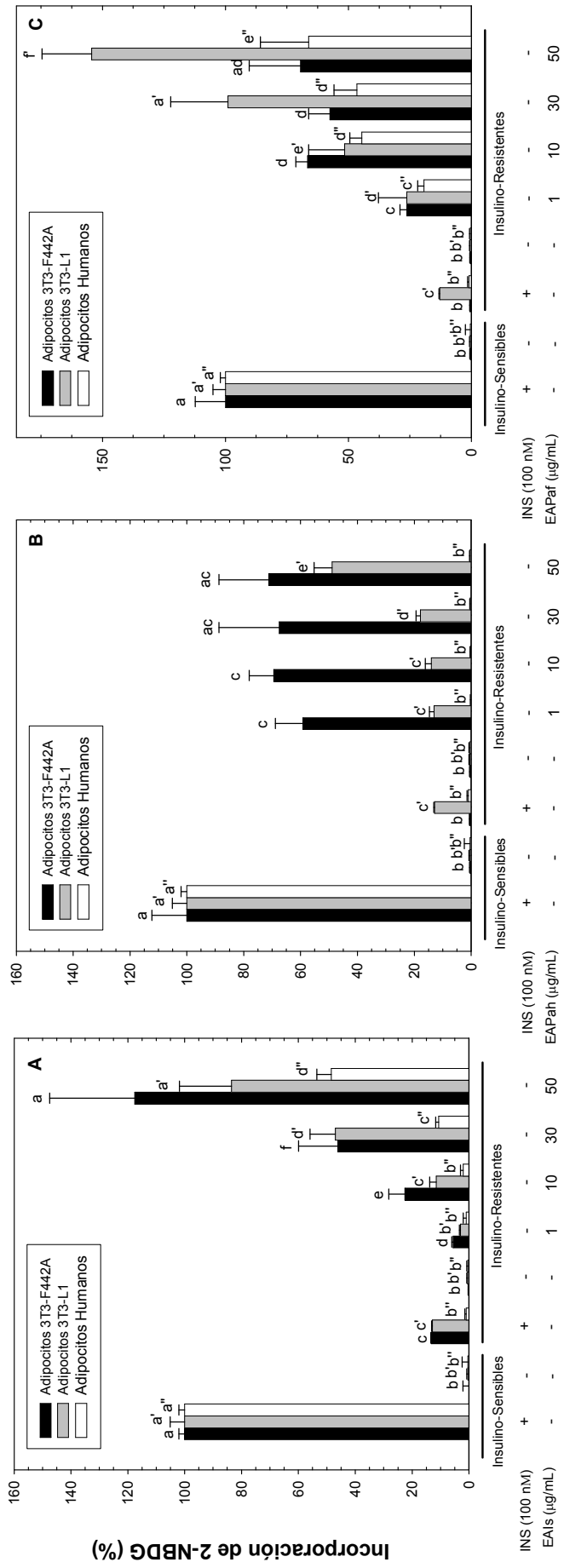


Figura 5



Tratamientos

Figura 6



Tratamientos

Figura 7

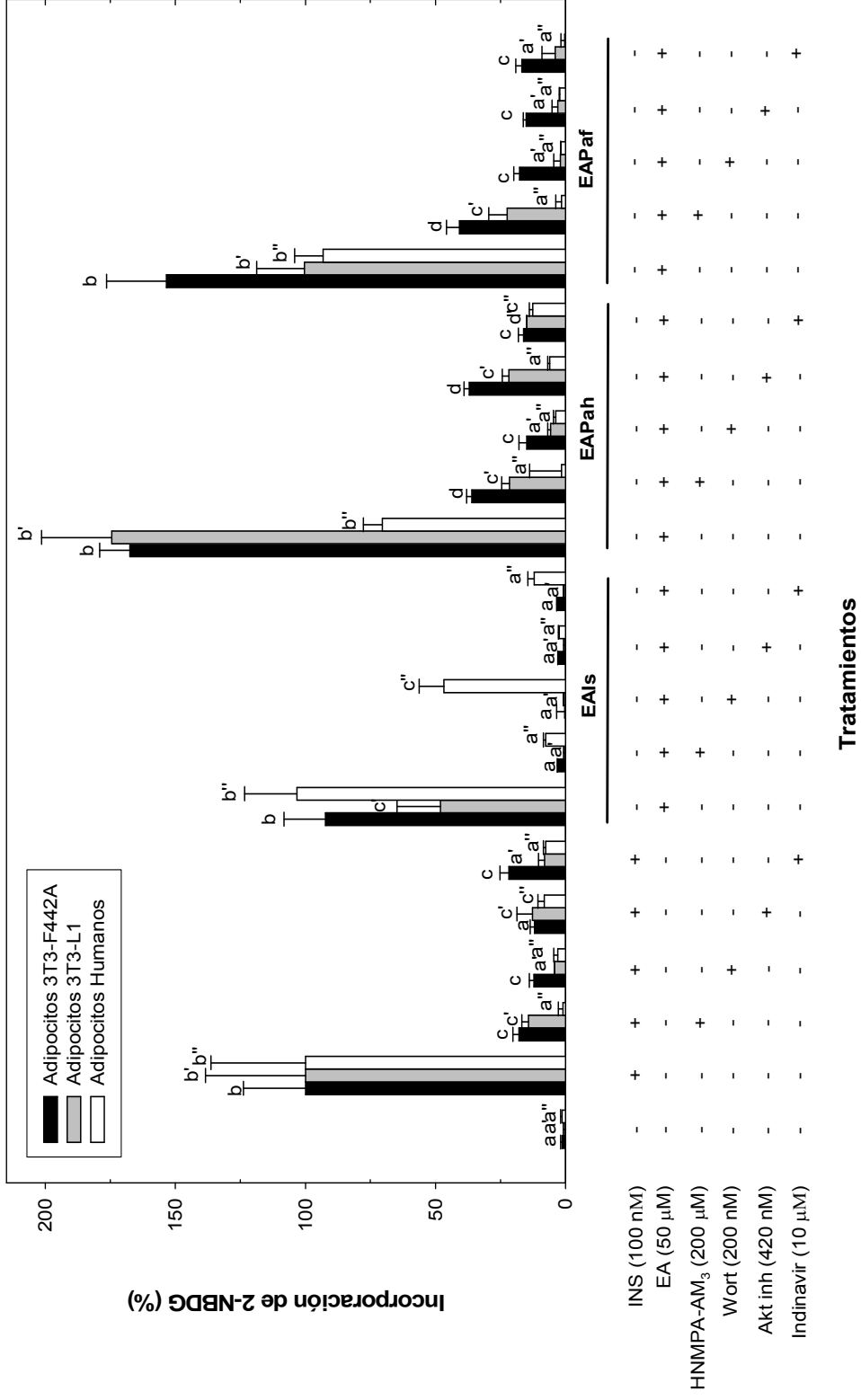


Figura 8

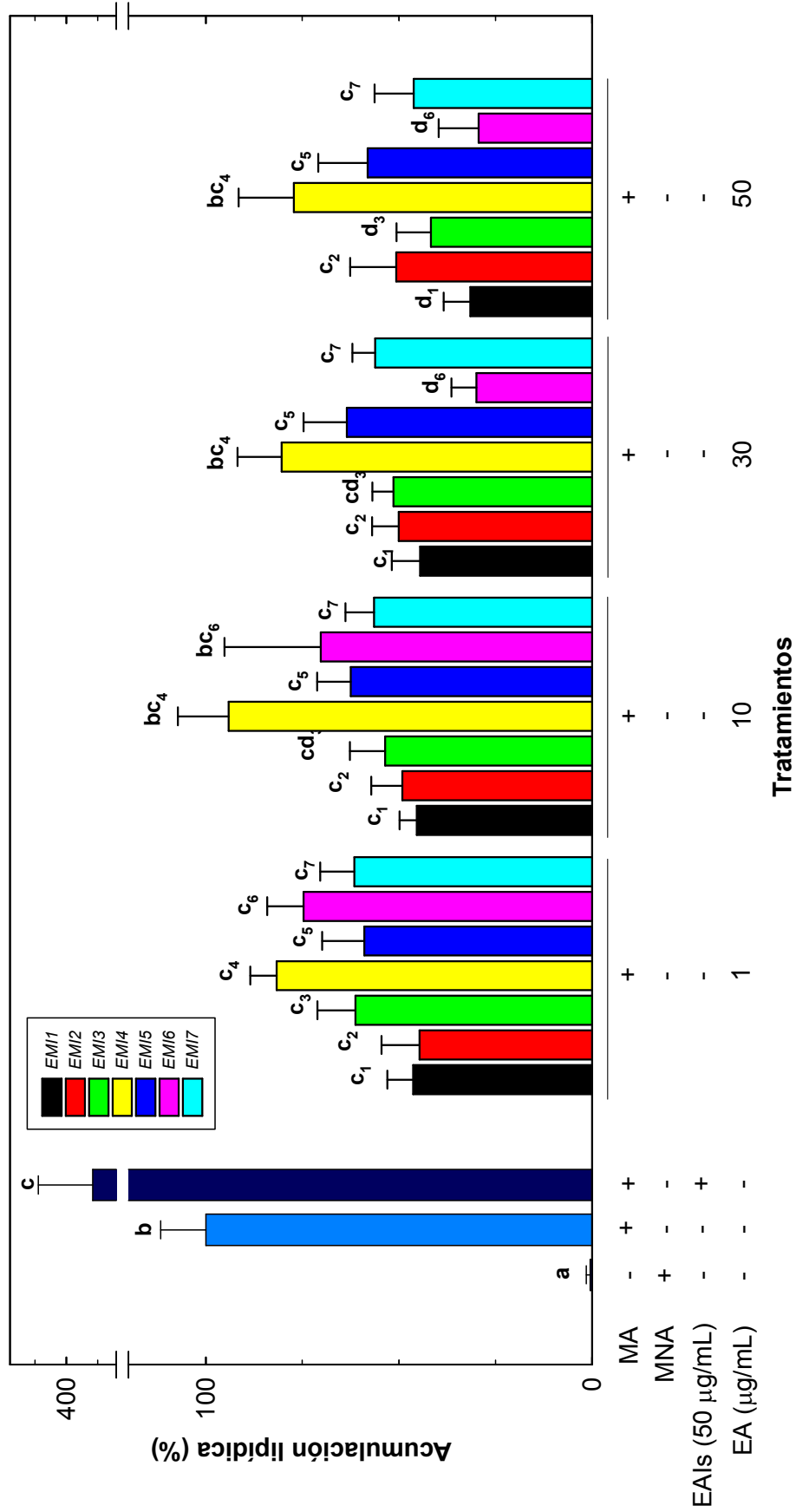


Figura 9

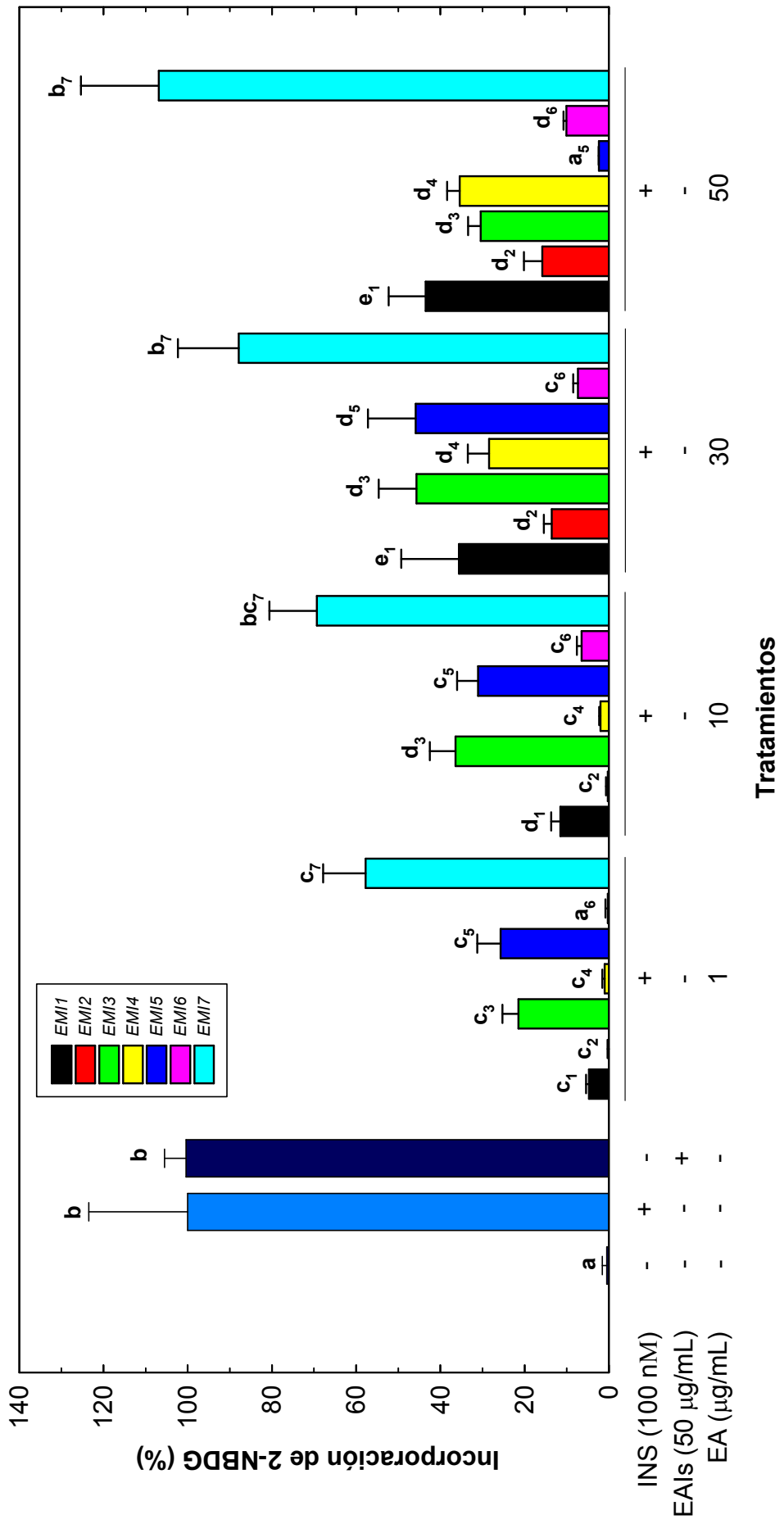


Figura 10