



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y  
TECNOLÓGICA

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

***“ESCRUTINIO DE ACTIVIDADES TIPO  
INSULINA EN PLANTAS USADAS  
TRADICIONALMENTE COMO  
ANTIDIABÉTICOS”***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD  
DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

**Q.F.B. Angel Josabad Alonso Castro**

DIRECTOR

**Dr. Luis A. Salazar Olivo**

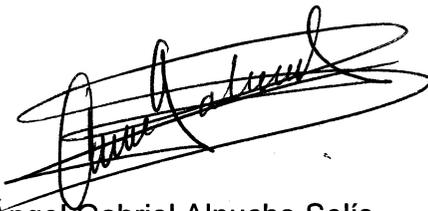
San Luis Potosí, SLP.

Julio de 2007

La tesis “**Escrutinio de actividades tipo insulina en plantas usadas tradicionalmente como antidiabéticos**” fue elaborada por el Químico Fármaco Biólogo **Angel Josabad Alonso Castro** y aprobada el **5 de julio** de 2007 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 A. Salazar Olivo  
Director de la tesis

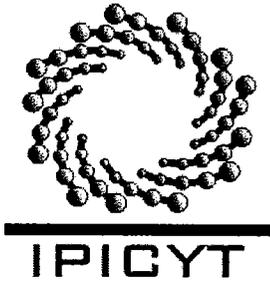


Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
Asesor de la tesis



Dr. Alejandro De las Peñas Nava  
Asesor de la tesis

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. El trabajo fue financiado parcialmente con recursos del proyecto FMSLP-2005-CO1-45, otorgado al Dr. Salazar Olivo por el Fondo Mixto de fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de San Luís Potosí.



# 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 036 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 5 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De las Peñas Nava</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Angel Josabad Alonso Castro**

sobre la Tesis intitulada:

*Escrutinio de Actividades Tipo Insulina en Plantas Usadas Tradicionalmente como Antidiabéticos*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 13:23 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes julio de 2007.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



## INDICE

	Pág.
Constancia de aprobación de la tesis	1
Créditos institucionales	2
Lista de figuras	5
Resumen	6
Abstract	8

## INTRODUCCIÓN

Epidemiología de la diabetes mellitus	9
Clasificación de la diabetes mellitus	9
Costos de la diabetes mellitas para los sistemas de salud en México	9
Los hipoglucemiantes orales ocasionan múltiples efectos adversos	10
La herbolaria mexicana es una alternativa para el tratamiento de la diabetes mellitus	11
Los preadipocitos 3T3-F442A son un bioensayo ideal para evaluar actividades tipo insulina	12
Posibles mecanismos de acción de las plantas antidiabéticas	13

## MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal	15
Determinación de las concentraciones inocuas de los extractos vegetales aplicables a bioensayos sobre las células 3T3-F442A	15
Efecto de los extractos vegetales sobre la adipogénesis de las células 3T3-F442A	16
Incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A	16
Análisis estadístico	17

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Determinación de concentraciones de los extractos vegetales no tóxicas para las células 3T3-F442A	18
Los extractos acuosos vegetales probados afectaron en forma diferente la adipogénesis de las células 3T3.	18
Seis de los siete extractos vegetales estudiados presentan actividades tipo insulina que modulan la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A.	20
Los siete extractos vegetales acuosos estimulan la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3-F442A.	20
<b>CONCLUSIONES</b>	23
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	24
<b>PIES DE FIGURA</b>	28
<b>FIGURAS</b>	30

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efectos de extractos acuosos vegetales sobre la proliferación celular.	30
Figura 2. Efecto de extractos acuosos vegetales sobre la diferenciación adiposa de las células 3T3.	31
Figura 3. Actividades insulino-miméticas de extractos vegetales acuosos sobre la adipogénesis de las células 3T3.	32
Figura 4. Efecto de extractos vegetales acuosos sobre la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3.	33

## RESUMEN

*Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae), *Guazuma ulmifolia* Lam (Sterculiaceae), *Ibervillea sonora* S. Watson (Cucurbitaceae), *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber (Cactaceae), *Opuntia leucotricha* DC. (Cactaceae) y *Teucrium cubense* Jacq. (Lamiaceae) son plantas ampliamente usadas en México para el tratamiento empírico de la diabetes mellitus, pero sus principios activos y sus mecanismos de acción aún se desconocen. Para explorar los mecanismos de sus propiedades antidiabéticas, evaluamos los efectos de extractos acuosos de estas plantas sobre la incorporación de glucosa por los adipocitos 3T3-F442A de ratón, así como sobre la diferenciación de estas células. El extracto de *G. ulmifolia* (EAGu) en medio adipogénico con insulina, no afectó la adipogénesis de las células 3T3, mientras que el extracto de *C. obtusifolia* (EACo) indujo un incremento marginal de 20% en la acumulación lipídica. Extractos de la pulpa (EAOlp) y las semillas (EAOls) de *O. leucotricha*, y de *T. cubense* (EATc) indujeron incrementos en la acumulación lipídica de 62, 43 y 80%, respectivamente, mientras que los extractos de *I. sonora* (EAls) y *O. joconostle* (EAOj) causaron aumentos marcados de 380% y 350%, respectivamente. Ensayados en medio adipogénico carente de insulina, EACo no indujo la acumulación de triglicéridos, mientras que los extractos restantes promovieron la adipogénesis en 22% (EAGu), 40% (EAls), 60% (EAOj), 59% (EAOlp), 63% (EAOls), y 58% (EATc). Además, los siete extractos estimularon la incorporación del análogo fluorescente de la glucosa 2-NBDG por los adipocitos 3T3-F442A en 17% (EACo), 27% (EAGu), 46% (EAls), 54% (EAOj), 62% (EAOlp), 66% (EAOls), y 53% (EATc). Nuestros resultados indican que EAls, EAOj y EATc ejercen potentes efectos proadipogénicos sobre las células 3T3-F442A, que EACo y EAGu no afectan mayormente la diferenciación adiposa y que EAOlp y EAOls indujeren moderadamente la acumulación lipídica. Nuestros resultados muestran también que los siete extractos vegetales estudiados estimulan en diverso grado la captación de 2-NBDG por estas células y sugieren que la estimulación de la captación de glucosa por el tejido adiposo es uno de los mecanismos que median las propiedades

antidiabéticas de estas plantas. Finalmente, nuestros resultados muestran que los sistemas *in vitro* son modelos óptimos para la caracterización de los principios activos de plantas de interés farmacológico.

## ABSTRACT

*Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae), *Guazuma ulmifolia* Lam (Sterculiaceae), *Ibervillea sonora* S. Watson (Cucurbitaceae), *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber (Cactaceae), *Opuntia leucotricha* DC. (Cactaceae) and *Teucrium cubense* Jacq. (Lamiaceae) are plants empirically employed in México for treatment of diabetes mellitus, however their active compounds and mechanisms of action are yet unknown. To explore the mechanisms of their antidiabetic potential, aqueous extracts of each plant were assayed on adipose differentiation and glucose uptake in murine 3T3-F442A preadipocytes. Assayed in adipogenic medium, *G. ulmifolia* aqueous extract (EAGu) did not affect 3T3 adipose differentiation whereas the aqueous extract of *C. obtusifolia* (EACo) induced a marginal increase of 20% in trygliceride accumulation. On the other hand, aqueous extracts of pulp (EAOlp) or seeds (EAOLs) of *O. leucotricha*, and *T. cubense* aqueous extract (EATc) increased the lipid accumulation by 62, 43 and 80%, respectively. Interestingly, extracts of *I. sonora* (EALs) and *O. joconostle* (EAOj) induced a high increase in lipid accumulation by 380% y 350%, respectively. In adipogenic medium lacking insulin, EACo did not induce trygliceride accumulation, whereas the other six extracts stimulated adipogenesis in 22% (EAGu), 40% (EALs), 60% (EAOj), 59% (EAOlp), 63% (EAOLs), and 58% (EATc). All seven extracts stimulated the uptake of the fluorescent glucose analog 2-NBDG by the 3T3-F442A adipocytes in 17% (EACo), 27% (EAGu), 46% (EALs), 54% (EAOj), 62% (EAOlp), 66% (EAOLs), and 53% (EATc). Our results indicate that EALs, EAOj and EATc present high pro-adipogenic effects on 3T3-F442A cells, EACo and EAGu do not affect adipose differentiation, and EAOlp and EAOLs moderately induce adipogenesis. Our results also show that the seven extracts induce 2-NBDG uptake by 3T3 adipocytes with distinct potency and suggest that the stimulation of glucose uptake by the adipose tissue could be one the mechanisms involved in the antidiabetic effects of these plants. Finally, our results show that *in vitro* assays are ideal models for the characterization of active compounds of these and other plants of pharmacological interest.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Epidemiología de la diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad metabólica con mayor prevalencia en el mundo y afecta a más de 120 millones de personas (King et al., 1998). En menos de cuatro décadas la DM se ha convertido en el problema de salud pública más importante en México, y desde el año 2000 es la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (Aguilar-Salinas et al., 2003). En 1995, cerca de 3.8 millones de mexicanos adultos fueron diagnosticados con DM, y se teme que esta cifra se triplique en el año 2025. El 10% de los pacientes diabéticos presenta trastornos coronarios y el 45% sufre retinopatía diabética. La DM es la segunda causa de ceguera en México y la primera causa de insuficiencia renal y de amputación de miembros inferiores de origen no traumático realizadas en nuestro país (Aguilar-Salinas et al., 2003).

### **Clasificación de la diabetes mellitus**

Existen dos tipos principales de DM, la DM tipo 1, en la cual el organismo no produce insulina o la produce en escasa medida, y la DM tipo 2 (DM-2) que se caracteriza por la incapacidad para responder a la insulina (resistencia a insulina). Este último tipo es el más común, y representa alrededor del 95% de los casos de DM, y se desarrolla usualmente en la edad adulta (Anónimo, 1997). La DM-2 es producto de una compleja relación entre la predisposición génica y factores ambientales como la dieta, el grado de actividad física y la edad. A largo plazo, la falta de tratamiento o un tratamiento ineficiente de la DM-2 da lugar a la retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica.

### **Costos de la diabetes mellitus para los sistemas de salud en México**

La DM-2 tiene fuertes repercusiones económicas para los sistemas de salud pública en México (SSA, IMSS, ISSSTE). Los gastos totales en la atención de esta enfermedad se estima que accederán a 317 millones de dólares en el año 2005, lo que representaría un incremento del 26% con respecto al año 2003

(Arredondo y Zúñiga, 2004). Tan solo en la compra de fármacos antidiabéticos, los sistemas de salud en México gastaron 54.28 millones de dólares en el año 2005. Ese mismo año, los costos derivados de la atención de pacientes diabéticos en los ámbitos ambulatorio y hospitalario ascendieron a 170 millones de dólares (Arredondo y Zúñiga, 2004). Por otro lado, la mayor prevalencia de esta enfermedad se presenta en los estratos de la población con menores recursos económicos (King et al., 1998; Aguilar-Salinas et al., 2003), los cuales no cuentan con un sistema de salud público (alrededor del 40% de los mexicanos) y por consiguiente tienen que comprar los fármacos de su propio dinero (Arredondo y Zúñiga, 2004) u optar por terapias alternativas.

### **Los hipoglucemiantes orales ocasionan múltiples efectos adversos**

El tratamiento más usado para la DM-2 son los hipoglucemiantes orales, pero todos ellos ocasionan efectos adversos en el organismo. Las sulfonilureas y las meglitinidas, que actúan como secretagogos de insulina, producen problemas gastrointestinales; las biguanidas y los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, que disminuyen la absorción intestinal de glucosa, ocasionan problemas gastrointestinales, así como fallas renales y cardiovasculares (Spiller y Sawyer, 2006). Las tiazolidinedionas, que incrementan la captación de glucosa en los tejidos blanco (músculo, hígado y tejido adiposo), inducen obesidad (de Souza et al., 2001) y osteoporosis (Rzonca et al., 2004). Los hipoglucemiantes orales revierten insuficientemente la hiperglucemia, y fallan a medida que la severidad de la enfermedad progresa, y tarde o temprano el paciente diabético debe recibir insulina exógena. Es altamente deseable encontrar agentes antidiabéticos que induzcan la captación de glucosa por las células pero que, a diferencia de la insulina o de hipoglucemiantes orales como las tiazolidinedionas, no estimulen simultáneamente la adipogénesis.

## **La herbolaria mexicana es una alternativa para el tratamiento de la diabetes mellitus**

Aunque la administración de insulina o de hipoglucemiantes orales son los tratamientos farmacológicos aceptados en México para el tratamiento de la DM, un alto número de diabéticos recurren a terapias alternativas como la herbolaria (Aguilar-Salinas et al., 2003). Más de 250 especies vegetales son usadas en México para el tratamiento empírico de la DM, aunque solo algunas de estas plantas se han estudiado experimental o clínicamente (Alarcón-Aguilar et al., 2003).

Los estudios realizados en campo (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) indican que las plantas empleadas en el tratamiento empírico de la DM son usadas como extractos acuosos principalmente.

*Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae), un árbol monopódico de 20 m de alto con amplia distribución en las zonas tropicales de nuestro país (Pennington y Sarukhán, 1968) es una de las plantas utilizadas tradicionalmente como antidiabéticas en México. Extractos acuosos de *C. obtusifolia* disminuyeron en casi 20% los niveles de glucosa sanguínea en conejos sanos (Román-Ramos et al., 1991) y en ratas tratadas con estreptozotocina (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001), un fármaco que destruye a las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. El extracto metanólico de esta planta redujo en 33% los niveles de glucemia en ratones sanos (Nicasio et al., 2005). En dos estudios clínicos mostraron que el extracto acuoso de *C. obtusifolia* disminuyó en 15 y 17%, respectivamente, los niveles de glucosa en pacientes en ayuno (Herrera-Arellano et al., 2004; Revilla-Monsalve et al., 2007).

*Guazuma ulmifolia* Lam (Sterculiaceae), otra planta ampliamente utilizada en el tratamiento empírico de la DM, es un arbusto de 2 a 15 m de altura distribuido en todo México conocido comúnmente como “guázima” (Pennington y Sarukhán, 1968). Un extracto acuoso de *G. ulmifolia* disminuyó en 22.2% los niveles de glucosa sanguínea en conejos sanos (Alarcón-Aguilar et al., 1998). Ese mismo estudio indicó que *G. ulmifolia* presentó la mayor capacidad hipoglucemiante de 28 plantas estudiadas.

Otra especie vegetal usada en el tratamiento empírico de la DM-2 es *Ibervillea sonora* S. Watson (Cucurbitaceae), una planta trepadora de raíz perenne distribuida en el noroeste de México conocida popularmente como “Wareque” (Aguilar y Xolalpa, 2002). El extracto acuoso de esta planta redujo en 40% los niveles de glucosa en ratones (Alarcón-Aguilar et al., 2005). Este mismo estudio mostró que la actividad hipoglucemiante de esta planta no es afectada por el proceso de decocción de la raíz.

*Teucrium cubense* Jacq. (Lamiaceae), una herbácea distribuida en el centro y sur de México, conocida comúnmente como “agrimonia”, es también ampliamente usada en el tratamiento empírico de la DM-2. Un extracto acuoso de *T. cubense* disminuyó en 19.4% los niveles de glucosa sanguínea en conejos sanos (Román-Ramos et al., 1991).

Por otro lado, *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber y *Opuntia leucotricha* DC. son dos especies arborescentes de la familia Cactaceae y de distribución en el altiplano mexicano. Estas dos cactáceas se encuentran entre las plantas con mayor uso en México para el tratamiento empírico de la DM (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) a pesar de que no existen estudios experimentales sobre sus propiedades hipoglucemiantes.

### **Los preadipocitos 3T3-F442A son un bioensayo ideal para evaluar actividades tipo insulina**

El escrutinio de las actividades hipoglucemiantes se ha realizado usando modelos animales tales como ratas o conejos normales o tratados con estreptozotocina o aloxan para destruir las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. Sin embargo estos modelos requieren tiempos de ensayo muy largos, presentan un alto grado de variabilidad y son de difícil interpretación en el estudio de los mecanismos moleculares de los extractos o principios activos. Alternativamente se ha propuesto que los cultivos de preadipocitos son un modelo experimental óptimo para el ensayo de agentes antidiabéticos dada su alta sensibilidad a la insulina y la posibilidad de evaluar de forma simultánea los efectos de los compuestos ensayados sobre la adipogénesis (Liu et al., 2001,

Spoor et al., 2006). Un sistema experimental conveniente para estudiar la diferenciación adiposa lo constituyen las líneas celulares de preadipocitos 3T3 establecidas a partir de embriones tardíos de ratón suizo (Todaro y Green, 1963). Estas células son sensibles a la inhibición de la proliferación por densidad de saturación. Los cambios bioquímicos y morfológicos que acompañan la diferenciación de fibroblastos en adipocitos son uno de los fenómenos más notorios en el cultivo de células animales. Una vez que las células 3T3 han alcanzado confluencia y se encuentran expuestas a señales adipogénicas presentes en el suero (Kuri-Harcuch y Green, 1978), los fibroblastos cambian su forma alargada con largos procesos citoplasmáticos a células redondeadas, más grandes y con acumulación intracitoplasmática de triglicéridos. Las células 3T3-F442A responden a concentraciones fisiológicas de insulina (Lai et al., 1981) de dos diferentes maneras: dando lugar a la amplificación clonal de los adipocitos recién comprometidos (Ntambi y Kim, 2000) y estimulando la captación de glucosa por adipocitos maduros (Green y Kehide, 1975). Por lo tanto, la línea celular 3T3-F442A resulta una herramienta valiosa para el escrutinio inicial de compuestos insulino-miméticos y la subsecuente caracterización de los mecanismos celulares y moleculares (Reed y Scribner, 1999).

### **Posibles mecanismos de acción de las plantas antidiabéticas**

Las plantas antidiabéticas pueden ejercer sus efectos a través de tres mecanismos principales: 1) disminuyendo la absorción intestinal de glucosa, 2) estimulando la secreción de insulina por las células  $\beta$ - pancreáticas, y 3) favoreciendo la incorporación de glucosa en tejidos blanco (músculo, hígado y tejido adiposo) (Atta-Ur-Rahman y Zaman, 1989). A pesar del uso extendido de *C. obtusifolia*, *G. ulmifolia*, *I. sonorae*, *O. joconostle*, *O. leucotricha* y *T. cubense* en el tratamiento empírico de la DM-2, sus principios activos y sus mecanismos de acción son aún desconocidos. Los resultados obtenidos en estudios con animales de laboratorio (Roman-Ramos et al., 1991; Alarcón-Aguilar et al., 1998; Andrade Cetto y Wiedenfeld, 2001; Nicasio et al., 2005; Alarcón-Aguilar et al., 2005) y en estudio clínicos (Herrera-Arellano et al., 2004; Revilla-Monsalve et al., 2007)

descartan la posibilidad que las propiedades hipoglucemiantes de estas plantas puedan atribuirse a un efecto estimulante de la secreción (secretagogo) de la insulina. En el presente trabajo, evaluamos si los extractos acuosos de *C. obtusifolia*, *G. ulmifolia*, *I. sonorae*, *O. joconostle*, *O. leucotricha* y *T. cubense* inducen la incorporación de glucosa por el tejido adiposo, otro de los mecanismos propuestos para las plantas antidiabéticas (Atta-Ur-Rahman y Zaman, 1989). Nuestros resultados sugieren que la incorporación de glucosa por el tejido adiposo es uno de los mecanismos de acción que median las propiedades antidiabéticas de estas plantas. Estos resultados nos permitirán identificar y caracterizar nuevos compuestos y precisar los mecanismos moleculares a través de los cuales ejercen sus efectos hipoglucemiantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las hojas de *C. obtusifolia* se colectaron en el municipio de Xilitla (San Luis Potosí, México). La corteza de *G. ulmifolia*, y las ramas y hojas de *T. cubense* se obtuvieron en el municipio de Tamasopo (San Luis Potosí, México). Los frutos de *O. joconostle*, y los frutos y las semillas de *O. leucotricha* se obtuvieron en el municipio de San Luis Potosí. Los tubérculos de *I. sonorae* se obtuvieron en el mercado local (Mercado república, San Luis Potosí, México). La colecta de los materiales vegetales se realizó durante los meses de Febrero a Abril de 2006 y su identidad fue confirmada por un especialista (M. Gómez-Sánchez, UAQ). El material vegetal se secó a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, y posteriormente se molió en una licuadora. Los extractos crudos se obtuvieron por decocción de 50 g del material vegetal con 1 L de agua bidestilada estéril en un condensador de reflujo por 2 h. Después de enfriarlos a temperatura ambiente, los extractos se centrifugaron a 11,000 g durante 30 min, los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0.45 µm (Millipore Co., Bedford, MA) y posteriormente se liofilizaron (Freezone 4.5, Labconco, Kansas City, MO). Los extractos liofilizados se preservaron a temperatura ambiente protegidos de la luz hasta su uso en los cultivos celulares.

### Determinación de las concentraciones inocuas de los extractos vegetales aplicables a bioensayos sobre las células 3T3

Preadipocitos 3T3-F442A ( $1 \times 10^4$  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% de suero de ternera (HyClone; Logan, UT) (medio basal; MB). Después de 2 días, los cultivos se alimentaron con MB adicionado de diferentes concentraciones de los extractos liofilizados. La viabilidad celular se registró a lo largo de varios días de cultivo mediante recuentos celulares en un hematímetro. En todos los experimentos, los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y cambios de medio cada tercer día.

## **Efecto de los extractos vegetales sobre la adipogénesis de las células 3T3-F442A**

Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se trataron con medio adipogénico [MA; DMEM adicionado con 10% (v/v) de suero fetal de bovino (GIBCO BRL), 5 µg/ml insulina y 1 µM d-biotina] adicionado con concentraciones no tóxicas de los extractos vegetales. Cultivos paralelos se alimentaron con medio no adipogénico (MNA; DMEM conteniendo 4% (v/v) de suero de gato adulto, 5 µg/ml insulina y 1 µM d-biotina) (Kuri-Harcuch y Green, 1978) como control negativo. Al cabo de siete días, la acumulación lipídica se estimó mediante la tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías et al., 1992). La presencia de actividades tipo insulina en los extractos vegetales se estimó mediante experimentos paralelos en los que preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con MA conteniendo insulina (MA-I<sup>+</sup>), como se describe arriba, o en MA carente de insulina (MA-I<sup>-</sup>) adicionado con concentraciones no tóxicas de los extractos vegetales. La presencia de actividades tipo insulina en los extractos vegetales se cuantificó por tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías et al., 1992).

## **Incorporación de 2-NBDG por adipocitos 3T3-F442A**

Preadipocitos 3T3-F442A inoculados en placas de 96 pozos para fluorescencia (Costar, Cambridge, MA) se diferenciaron con MA. Después de cinco días de incubación, el medio de diferenciación se retiró y las monocapas celulares se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfatos conteniendo 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (PBS/ASB). Los cultivos se incubaron por 60 min en PBS/ASB con 80 µM del análogo fluorescente de la D-glucosa 2-NBDG [2-N-7-(nitrobencen-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino-2-desoxi-D-glucosa] (Molecular Probes, Orgeon, USA) (Yoshioka et al., 1996) y concentraciones no tóxicas de los extractos vegetales. Como controles se usaron 5 µg/ml de insulina o 10 µM del hipoglucemiante oral rosiglitazona (Rgz). Al final de la incubación, las monocapas celulares se lavaron con PBS/ASB para eliminar

el 2-NBDG libre y la fluorescencia retenida en las células se midió en un lector para fluorescencia Tecan-GENios (Tecan, Salzburg, Austria), a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión a 535 nm, usando el programa Magellan 4.

### **Análisis estadístico**

Los datos experimentales se expresan como la media  $\pm$  error estándar de al menos dos experimentos en tratamientos 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.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de concentraciones de los extractos vegetales no tóxicas para las células 3T3-F442A

Para establecer las concentraciones no tóxicas de los extractos acuosos de *C. obtusifolia* (EACo), *G. ulmifolia* (EAGu), *I. sonorae* (EAls), *O. joconostle* (EAOj), la pulpa (EAOlp) o las semillas (EAOls) de *O. leucotricha* y *T. cubense* (EATc), determinamos primeramente los efectos de estos extractos sobre la proliferación de los preadipocitos 3T3. Los siete extractos acuosos se ensayaron a concentraciones entre 1 y 100 µg/ml, adicionados al MB. En el caso de EACo, solo la concentración de 100 µg/ml ocasionó una disminución apreciable ( $\approx 20\%$ ) en la densidad celular con respecto al control, luego de cuatro días de tratamiento (Fig. 1A), sin afectar la apariencia celular. Por ello, 100 µg/ml de EACo se consideró como una concentración segura para los ensayos posteriores.

Por el contrario, 100 µg/ml de EAGu disminuyeron la densidad celular en 42% (Fig. 1B), en tanto que concentraciones de 70 y 100 µg/ml de EAls, EAOj, EAOlp y EAOls indujeron decrementos en la densidad celular de más del 30% (Fig. 1C-1F). Asimismo, 100 µg/ml de EATc disminuyeron la densidad celular en 35% (Fig. 1G). Por lo tanto, los efectos de los extractos acuosos sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3 y su metabolismo se evaluaron a concentraciones de 1 a 100 µg/ml (EACo), 1 a 70 µg/ml (EAGu), 1 a 50 µg/ml (EAls), 1 a 50 µg/ml (EAOj), 1 a 50 µg/ml (EAOlp), 1 a 50 µg/ml (EAOls) y 1 a 70 µg/ml (EATc).

### Los extractos acuosos vegetales probados afectaron en forma diferente la adipogénesis de las células 3T3.

Diversas plantas presentan compuestos que afectan positiva o negativamente el desarrollo del tejido adiposo (Huang et al., 2005). Para determinar si EACo, EAGu, EAls, EAOj, EAOlp, EAOls o EATc afectan la adipogénesis, evaluamos el efecto de concentraciones no tóxicas de cada extracto vegetal sobre la acumulación de triglicéridos por las células 3T3 F442A. Las concentraciones de EACo entre 1 a 30 µg/ml adicionadas al MA no afectaron la

acumulación lipídica, mientras que concentraciones de 50 a 100 µg/ml de EACo incrementaron la adipogénesis en un 20 % con respecto a los cultivos control (Fig. 2A). Asimismo, ninguna de las concentraciones probadas de EAGu afectaron la acumulación lipídica (Fig. 2B). Por el contrario, EAls indujo un marcado incremento en la acumulación lipídica a todas las concentraciones ensayadas: 1 µg/ml de EAls incrementó la acumulación lipídica en casi 300% respecto al control positivo (MA sin extractos), en tanto que 50 µg/ml, la máxima concentración de EAls ensayada, indujo un contenido de triglicéridos en las células 3T3 de 380% con respecto al tratamiento control (Fig. 2C). EAOj indujo incrementos en la acumulación lipídica a partir de la concentración de 10 µg/ml. La máxima concentración de EAOj ensayada (50 µg/ml) estimuló un contenido de triglicéridos de 350% en las células 3T3 (Fig. 2D). Concentraciones de EAOlp o EAOls de 1 a 10 µg/ml no afectaron la acumulación lipídica, mientras que concentraciones de 50 µg/ml de EAOlp o EAOls incrementaron la adipogénesis en 62 y 43%, respectivamente (Fig. 2E y 2F). EATc a concentraciones de 1 y 10 µg/ml no afectó la acumulación lipídica, pero concentraciones de 30 a 70 µg/ml indujeron incrementos en la acumulación lipídica de entre 61 a 80% respecto al control positivo (MA sin extractos) (Fig. 2G).

Nuestros resultados muestran que ninguno de los extractos analizados posee propiedades antiadipogénicas y que, por el contrario, EAls y EAOj presentan potentes efectos pro-adipogénicos sobre las células 3T3-F442A. La funcionalidad de este efecto adipogénico, una característica poco deseable para un agente antidiabético, está siendo ensayada actualmente sobre preadipocitos humanos en nuestro laboratorio. De confirmarse su efecto sobre células humanas, las moléculas responsables de dicha actividad podrían ser de utilidad en el estudio y/o tratamiento de afecciones del tejido adiposo como lipodistrofias. Por otro lado, los resultados obtenidos con EACo y EAGu sugieren la ausencia de moléculas proadipogénicas en estos extractos.

### **Seis de los siete extractos vegetales estudiados presentan actividades tipo insulina que modulan la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A.**

La insulina ejerce al menos dos tipos de efectos sobre los adipocitos 3T3: induce la amplificación clonal transitoria de los adipocitos recién comprometidos (Ntambi y Kim, 2000) y estimula la incorporación de glucosa en los adipocitos maduros (Green y Kehide, 1975). Para determinar si EACo, EAGu, EAls, EAOj, EAOlp, EAOls y EATc poseen actividades tipo insulina que modulan la amplificación clonal de los preadipocitos 3T3, concentraciones inocuas de cada extracto se evaluaron sobre la acumulación de triglicéridos inducida por MA carente de insulina (MA-I<sup>-</sup>). Ninguna de las concentraciones probadas de EACo estimuló la adipogénesis bajo tales condiciones (Fig. 3A), en tanto que EAGu incrementó el contenido de triglicéridos en función de la concentración: 1, 30 y 70 µg/ml incrementaron en 3.5, 14 y 22% la acumulación lipídica, respectivamente, comparado con el control sin extractos (MA-I<sup>-</sup>) (Fig. 3B). Asimismo, EAls, EAOj, EAOlp y EAOls incrementaron la acumulación lipídica de las células 3T3 en función de la concentración: 1, 10 y 50 µg/ml estimularon la adipogénesis mediada por insulina entre 12 a 63% (Fig. 3C-3F). Por su parte, EATc aplicado a 10 µg/ml incrementó la acumulación lipídica en 1.5%, mientras que concentraciones de 10, 30 y 70 µg/ml estimularon la acumulación lipídica en 13, 22 y 58% (Fig. 3G). Aunque ninguno de los extractos ensayados restauró la acumulación lipídica alcanzada con el tratamiento con insulina (MA-I<sup>+</sup>), nuestros resultados sugieren que EAGu, EAls, EAOj, EAOlp, EAOls y EATc poseen en diverso grado actividades insulino-miméticas que modulan la adipogénesis de las células 3T3, mientras que EACo carece de tales actividades insulino-miméticas

### **Los siete extractos vegetales acuosos estimulan la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3-F442A.**

A pesar del uso extendido de *C. obtusifolia*, *G. ulmifolia*, *I. sonorae*, *O. joconostle*, *O. leucotricha* y *T. cubense* en el tratamiento empírico de la DM-2, sus principios activos y sus mecanismos de acción son aún desconocidos. Los resultados obtenidos en estudios con animales de laboratorio (Román-Ramos et

al., 1991; Alarcón-Aguilar et al., 1998; Andrade Cetto y Wiedenfeld, 2001; Nicasio et al., 2005; Alarcón-Aguilar et al., 2005) y en estudio clínicos (Herrera-Arellano et al., 2004; Revilla-Monsalve et al., 2007) descartan la posibilidad que las propiedades hipoglucemiantes de estas plantas puedan atribuirse a un efecto secretagogo sobre la insulina. En este trabajo, evaluamos si los extractos acuosos de estas plantas inducen la incorporación de glucosa por el tejido adiposo, otro de los mecanismos propuestos para las plantas antidiabéticas (Atta-Ur-Rahman y Zaman, 1989).

Los adipocitos 3T3 son capaces de incorporar 2-NBDG en ausencia de insulina. Esta incorporación de fondo se restó a los valores obtenidos en cultivos incubados con 5 µg/ml de insulina para obtener el 100% de incorporación específica del análogo fluorescente de la glucosa. Un control adicional incluyó 10 µM de rosiglitazona, un hipoglucemiante oral ampliamente usado. Los siete extractos ensayados promovieron la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3-F442A en función de la concentración y con distinta potencia. EACo aplicado a 1, 50 y 100 µg/ml estimuló la incorporación del análogo fluorescente en 3, 11 y 17%, respectivamente (Fig. 4A). Por otro lado, 1, 30 y 70 µg/ml de EAGu promovieron la incorporación del 2-NBDG en 11, 17 y 26%, respectivamente (Fig. 4B). En el caso de EAls, 0.1, 10 y 50 µg/ml estimularon la incorporación de 2-NBDG en 14, 35 y 46% (Fig 4C). EAOj aplicado a concentraciones de 0.1, 10 y 50 µg/ml estimuló la captación de 2-NBDG en 12, 25 y 54% (Fig 4D). EAOlp aplicado a 0.1, 10 y 50 µg/ml estimuló la incorporación del análogo fluorescente en 7, 46 y 61%, respectivamente (Fig. 4E). En el caso de EAOIs, 0.1, 10 y 50 µg/ml estimularon la incorporación de 2-NBDG en 37, 51 y 66% respecto al control (Fig 4F). Finalmente, 0.1, 30 y 70 µg/ml de EATc estimularon la captación de 2-NBDG en 24, 36 y 53%, respectivamente (Fig 4G).

Nuestros resultados sugieren que *C. obtusifolia*, *G. ulmifolia*, *I. sonorae*, *O. joconostle*, *O. leucotricha* y *T. cubense* ejercen sus efectos hipoglucemiantes estimulando la incorporación de glucosa por el tejido adiposo. Como en el caso de la adipogénesis en ausencia de insulina, ninguno de los extractos ensayados indujo los niveles de captación de 2-NBDG alcanzados con insulina. Sin embargo,

altas concentraciones de EAOIs (30 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) presentaron valores similares ( $P \leq 0.05$ ) a los obtenidos con el hipoglucemiante oral rosiglitazona. Estos resultados sugieren que los compuestos activos de EAI y EAOj podrían actuar como una tiazolidinediona debido a que estos extractos también presentaron efectos proadipogénicos sugerentes de un efecto agonista sobre PPAR gamma, un gene maestro inductor de la adipogénesis. Lo anterior está siendo investigado actualmente en nuestro laboratorio con células de tejido adiposo humano.

Finalmente, nuestros resultados muestran que los experimentos de captación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3 son un modelo sensible, de rápida ejecución y alta reproducibilidad para la evaluación de las actividades hipoglucemiantes de compuestos naturales o sintéticos. Este modelo presenta la ventaja adicional de prescindir del uso de análogos radioactivos de glucosa.

En resumen, nuestro trabajo mostró que *Cecropia obtusifolia*, *Guazuma ulmifolia*, *Ibervillea sonora*, *Opuntia joconostle*, *Opuntia leucotricha* y *Teucrium cubense* ejercen su mecanismo hipoglucemiante estimulando la incorporación de glucosa por los adipocitos. Algunos de los extractos presentan marcados efectos proadipogénicos. El siguiente paso de nuestro estudio será identificar los principios activos responsables de los efectos hipoglucemiantes y caracterizar a mayor detalle sus mecanismos moleculares de acción. Además evaluaremos la toxicidad de los principios activos obtenidos de los extractos acuosos de *Cecropia obtusifolia*, *Guazuma ulmifolia*, *Ibervillea sonora*, *Opuntia joconostle*, *Opuntia leucotricha* y *Teucrium cubense* sobre modelos animales para determinar sus posibles efectos hepatotóxicos, genotóxicos y teratogénicos. De esta manera podremos diseñar y realizar estudios clínicos de los efectos hipoglucemiantes de los principios activos de estos siete extractos acuosos vegetales. El modelo experimental utilizado en nuestro trabajo nos permitirá ampliar el estudio hipoglucemiante a otras especies vegetales.

## CONCLUSIONES

Nuestro trabajo ha identificado un mecanismo de la acción hipoglucemiante de las plantas *Cecropia obtusifolia*, *Guazuma ulmifolia*, *Ibervillea sonora*, *Opuntia joconostle*, *Opuntia leucotricha* y *Teucrium cubense*, usadas ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus. Nuestros resultados sugieren que *C. obtusifolia* y *G. ulmifolia* ejercen sus efectos hipoglucemiantes estimulando la incorporación de glucosa por el tejido adiposo sin inducir un efecto adipogénico apreciable. Los resultados obtenidos muestran asimismo que los extractos acuosos de la pulpa (EAOIp) y las semillas (EAOIsp) de *Opuntia leucotricha* poseen un fuerte efecto estimulador de la incorporación de glucosa por los adipocitos 3T3 y un efecto adipogénico sobre estas células. Los resultados obtenidos indican también que *I. sonora*, *O. joconostle* y *T. cubense* poseen un marcado efecto estimulante sobre la incorporación de glucosa por los adipocitos 3T3 acompañado por un potente efecto pro-adipogénico. Si bien este efecto pro-adipogénico resulta desventajoso para cualquier hipoglucemiante oral, nuestros resultados, obtenidos con extractos crudos, no permiten afirmar que ambos efectos, la actividad proadipogénica y el efecto estimulante de incorporación de glucosa, dependan de la misma molécula. Estudios adicionales de fraccionamiento biodirigido de los extractos crudos de *I. sonora*, *O. joconostle* y *T. cubense* nos permitirán aclarar esta cuestión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C.A., Xolalpa, M.S., 2002. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia* 53, 24-35.
- Aguilar-Salinas, C.A., Velásquez-Monroy, O., Gomez-Perez, F.J., González-Chavez, A., Esqueda, A.L., Molina-Cuevas, V., Rull-Rodrigo, J.A., 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, F.J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutiérrez, S., Aguiar-Contreras, A., Contreras-Weber, C., Flores-Saenz J. L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 101-110.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Banderas-Dorantes, T., Gutierrez-León, A., Vazquez-Carrillo, L., Flores-Saenz, J.L., Róman-Ramos, R., 2003. Study of the anti-hyperglycemic effect of anti-diabetic plants in rabbits with impaired glucose tolerance. *Proceedings of the West Pharmacology Society* 46, 148-152.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Calzada-Bermejo, F., Hernández-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C., Róman-Ramos, R., 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonorae* root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 447-452.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on Streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 78, 145-149.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in th treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 325-248.
- Anónimo, 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ECDCDM). *Diabetes Care* 20, 1183-1197.
- Arredondo, A., Zuñiga, A., 2004. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle-income countries: the Mexican case. *Diabetes Care* 27, 104-109.

- Atta-Ur-Rahman, Zaman, K., 1989. Medicinal plants with hypoglycemic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 26, 1-55.
- de Souza, C.J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., Burkey, B.F., 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50, 1863-1871.
- 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.
- Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernández, B., Nicasio-Torres, P. and Tortoriello, J., 2004. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* 11, 561-566.
- Huang, T.H., Kota B.P., Razmovski, V., Roufogalis, B.D., 2005. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 96, 3-14.
- King, H., Aubert, R.F., Hermann, W. H., 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21, 1414-1431.
- Kuri-Harcuch, W., Green, H., 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 75, 6107-6109.
- Lai, E., Rosen, O.M., Rubin, C.S., 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. *Journal of Biological Chemistry* 256, 12866-12874.
- Liu, F., Kim, J., Li, Y., Liu, X., Li, J., Chen, X., 2001. An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *Journal of Nutrition* 131, 2242-2247.

- Nicasio, P., Aguilar-Santamaria, L., Aranda, E., Ortiz, S., Gonzalez, M., 2005. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytotherapy Research* 19, 661-664.
- Ntambi, J.M., Kim, Y.C., 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition* 130, 3122-3126.
- Pennington, T.D., Sarukhán, J., 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles forestales en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México, D.F. 413p.
- Ramírez-Zacarías, J.L., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W., 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry and Cell Biology* 97, 493-497.
- Reed, M.J., Scribner, K.A., 1999. In-vivo and in-vitro models of type 2 diabetes in pharmaceutical drug discovery. *Diabetes Obesity and Metabolism* 1, 75-86.
- Revilla-Monsalve, M.A., Andrade-Cetto, A., Palomino-Garibay, M.A., Wiedenfeld, H., Islas-Andrade, S., 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 636-640.
- Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A. Alarcon-Aguilar, F., 1991. Experimental study of the hypoglycaemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica* 2, 87-93.
- Rzonca, S.O., Suva, L.J., Gaddy, D., Montague, D.C., Lecka-Czernik, B., 2004. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* 145, 401-406.
- Spiller, H.A., Sawyer, T.S., 2006. Toxicology of oral antidiabetic medications. *American Journal of Health-System Pharmacy* 63, 929-938.
- Spoor, D.C., Martineau, L.C., Leduc, C., Benhaddou-Andaloussi A., Meddah, B., Harris, C., Burt, A., Fraser, M.H., Coonishish, J., Joly, E., Cuerrier, A., Bennett, S.A., Johns, T., Prentki, M., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2006. Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec

possess anti-diabetic potential. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84, 847-858.

Todaro, G.J., Green, H., 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *Journal of Cell Biology* 17, 299-313.

Yoshioka, K., Takahashi, H., Homma, T., Saito, M., Oh, K.B., Nemoto, Y., Matsuoka, H., 1996. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289, 5-9.

## PIES DE FIGURA

**Figura 1. Efectos de extractos acuosos vegetales sobre la proliferación celular.** Células 3T3-F442A se inocularon en placas de 24 pozos ( $1 \times 10^4$  células/pozo) con DMEM añadido con 7% de suero de ternera (medio basal; MB). Después de dos días, los cultivos se alimentaron con MB adicionado con diferentes concentraciones de EACo (A), EAGu (B), EAls (C), EAOj (D), EAOlp (E), EAOls (F), EAPa (G) y EATc (H). La densidad celular se determinó los días señalados mediante recuentos celulares con hematómetro. Las figuras representan el valor medio de dos experimentos independientes realizados en tratamientos por triplicado  $\pm$  error estándar (SEM).

**Figura 2. Efecto de extractos acuosos vegetales sobre la diferenciación adiposa de las células 3T3.** Cultivos preconfluentes de células 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) añadido con concentraciones no tóxicas de EACo (A), EAGu (B), EAls (C), EAOj (D), EAOlp (E), EAOls (F), EAPa (G) y EATc (H). Tratamientos control recibieron medio no adipogénico (MNA). Después de siete días, los cultivos se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica (ver Capítulo IV). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de dos 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 3. Actividades insulino-miméticas de extractos vegetales acuosos sobre la adipogénesis de las células 3T3.** Preadipocitos 3T3-F442A se diferenciaron en adipocitos con MA completo ( $MA-I^+$ ). Cultivos paralelos se alimentaron con MA carente de insulina ( $MA-I^-$ ) adicionado de concentraciones no tóxicas de EACo (A), EAGu (B), EAls (C), EAOj (D), EAOlp (E), EAOls (F), EAPa (G) y EATc (H). Después de siete días, los cultivos se fijaron y tiñeron con rojo oleoso O y la diferenciación se cuantificó por la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de dos

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 de extractos vegetales acuosos sobre la incorporación de 2-NBDG por los adipocitos 3T3.** Adipocitos 3T3-F442A se incubaron con PBS/ASB conteniendo 80  $\mu$ M del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG y concentraciones no tóxicas de EACo (A), EAGu (B), EAls (C), EAOj (D), EAOlp (E), EAOls (F), EAPa (G) y EATc (H) durante 60 min. Tratamientos control recibieron insulina o rosiglitazona (Rgz) a las concentraciones señaladas. Luego de la incubación, el 2-NBDG libre se lavó de los cultivos y la fluorescencia retenida en las monocapas celulares se midió en un lector de fluorescencia. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  SEM 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.

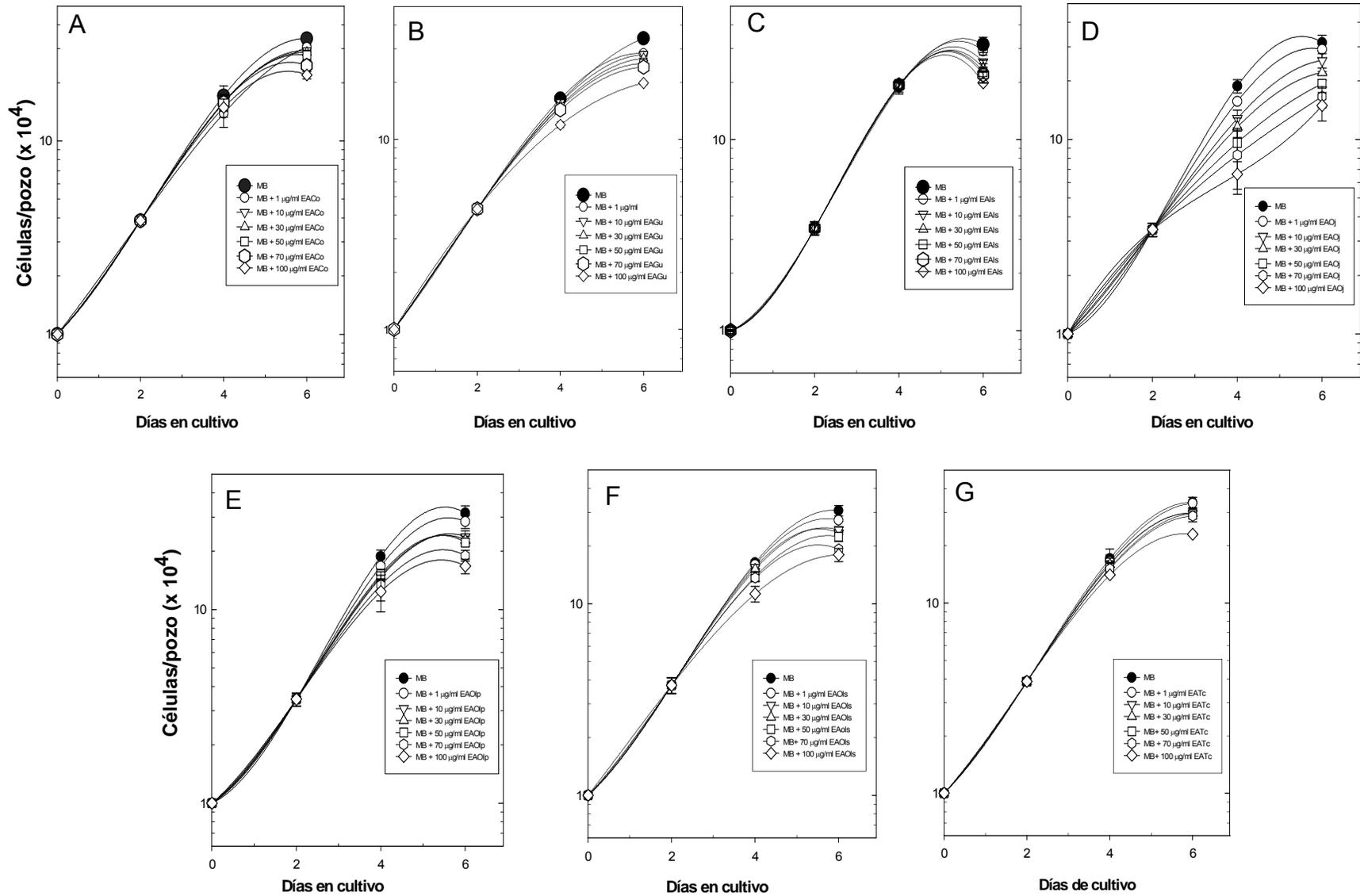
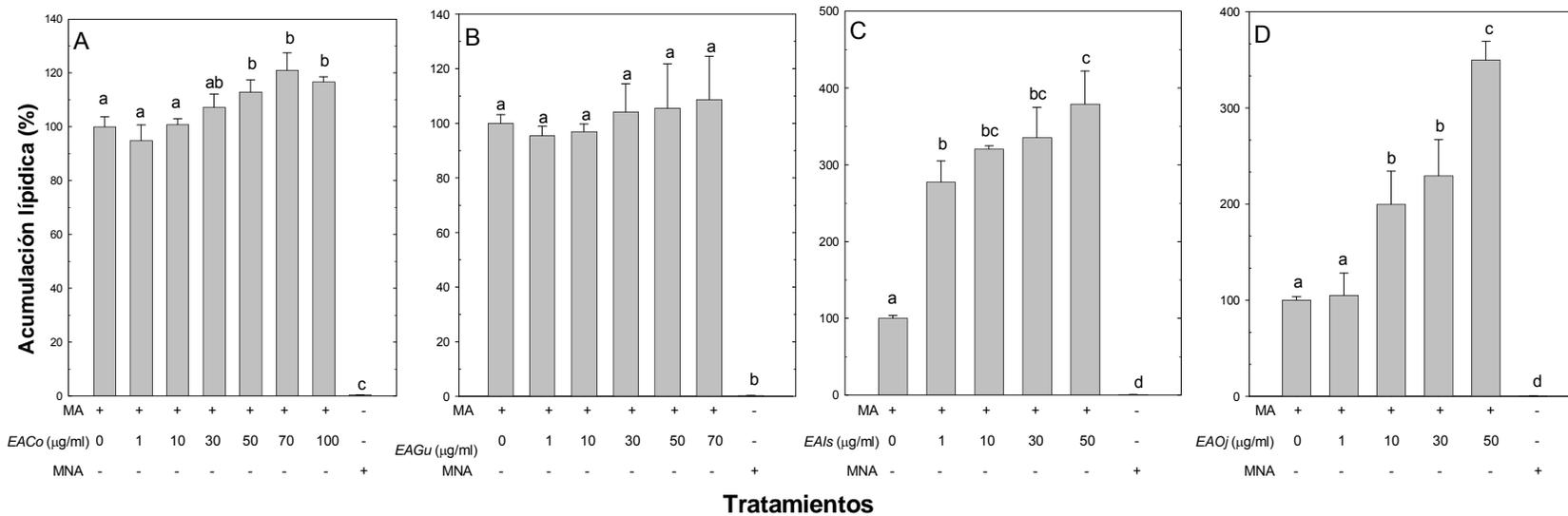
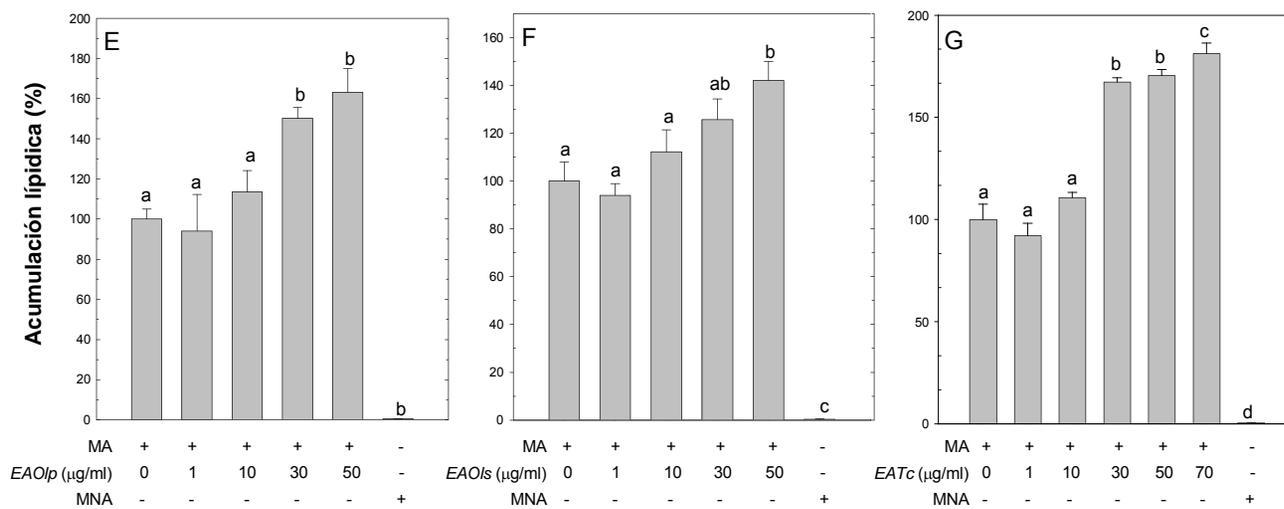


Figura 1

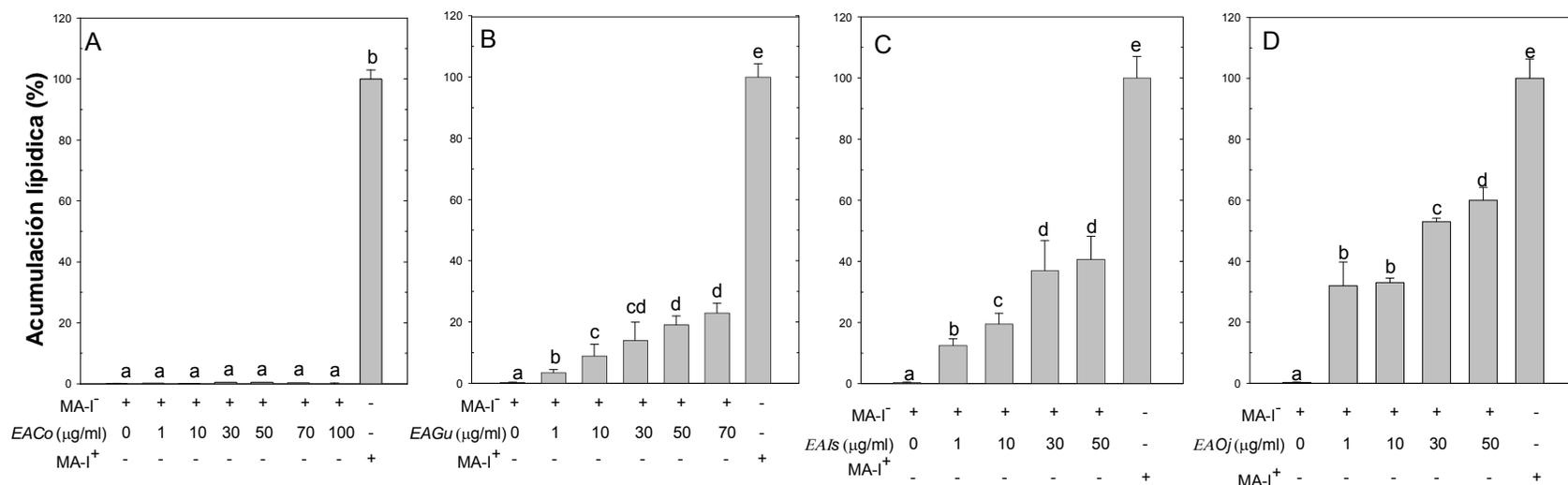


Tratamientos

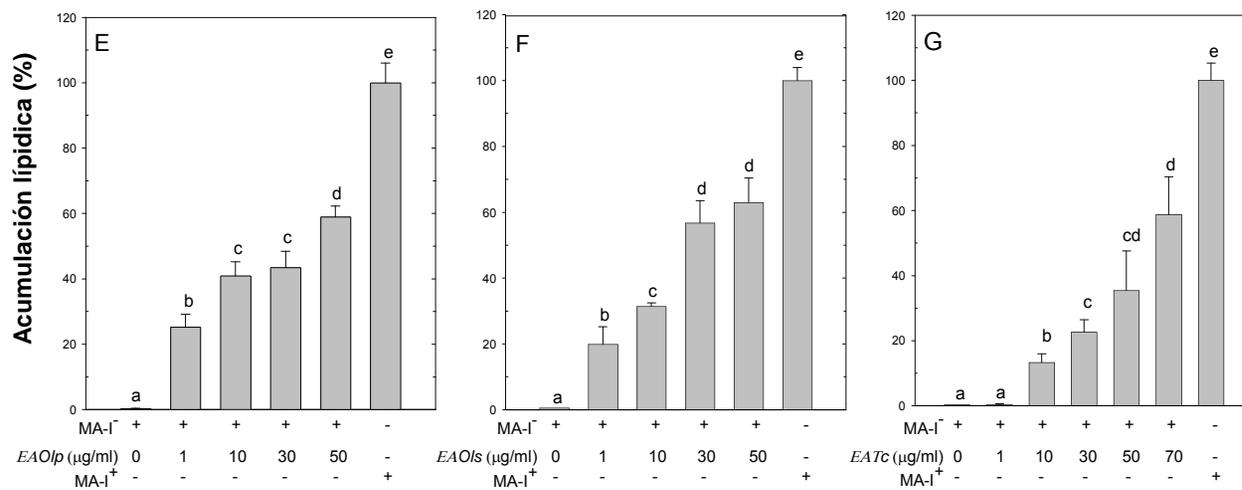


Tratamientos

Figura 2

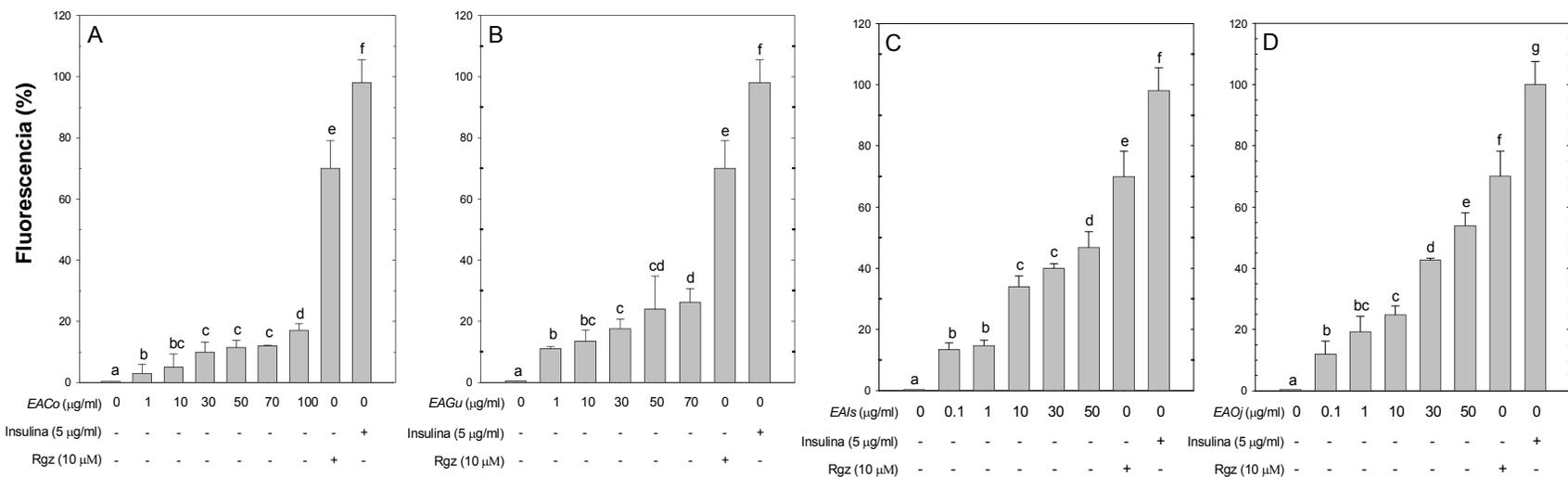


Tratamientos

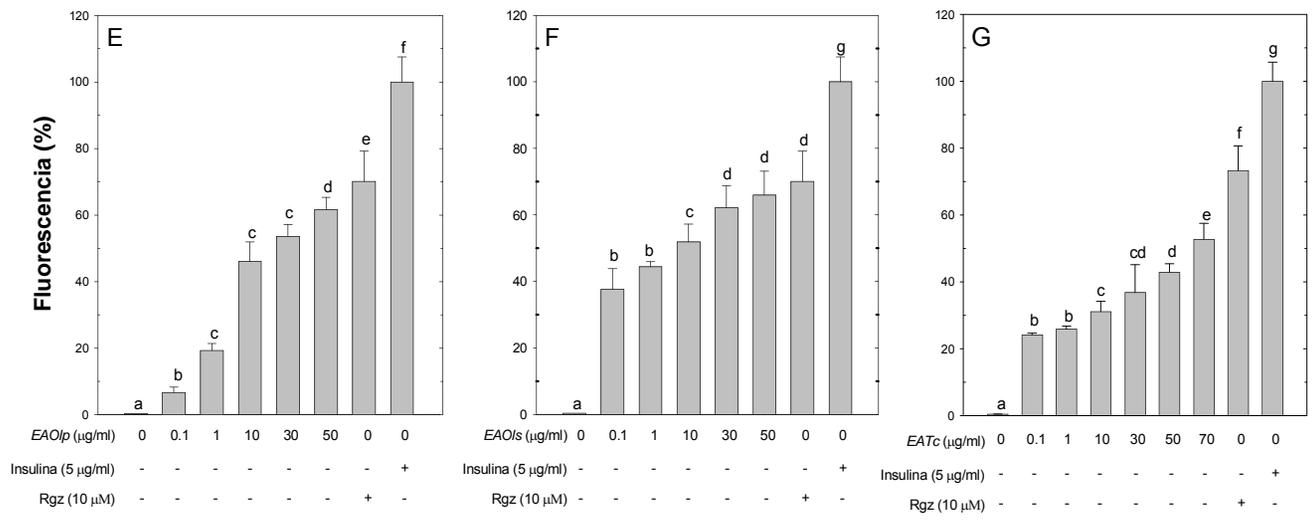


Tratamientos

Figura 3



**Tratamientos**



**Tratamientos**

Figura 4

