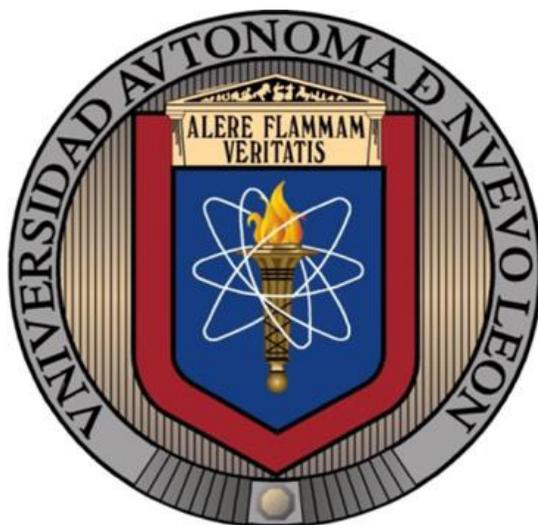


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

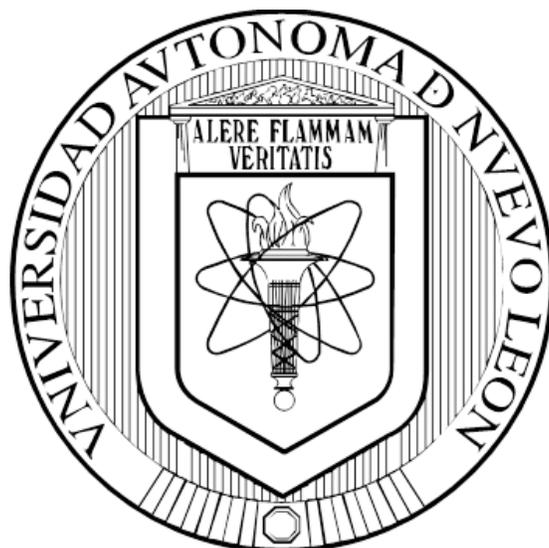
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE
PLANTAS MEDICINALES DE USO TRADICIONAL**

**POR
DAVID MIZAEEL ORTIZ MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES**

ENERO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE
PLANTAS MEDICINALES DE USO TRADICIONAL**

Por
DAVID MIZAEEL ORTIZ MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES**

Enero, 2018

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE PLANTAS
MEDICINALES DE USO TRADICIONAL**

Comité de tesis

Dra. Catalina Leos Rivas

Presidente

Dra. Adriana Núñez González

Secretario

Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Vocal

Dra. María Julia Verde Star

Vocal

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE PLANTAS
MEDICINALES DE USO TRADICIONAL**

Dirección de tesis

Dra. Catalina Leos Rivas

Director

Dra. Paula Cordero Pérez

Director externo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, que a través de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud me permitieron desarrollar este trabajo facilitando mi crecimiento académico y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado con la beca 487127 para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo parcial al proyecto PAICYT-UANL No CN358-15.

DEDICATORIAS

A Dios, por su amor incondicional y presencia en mi vida.

A mis padres, familia y a Jessica que han sido siempre el motivo de mi superación, los amo.

A la Dra. Catalina Rivas y Dra. Catalina Leos por su paciencia, invaluable consejos y enseñanzas.

Al Dr. Eduardo Sánchez, MC Sergio García y Dra. Patricia Rodríguez por esa amistad que valoro en demasía y por su gran aporte en este trabajo y en mi vida. A David Alejandro, Teresa, Alejandro, Damaris, Luis y David Gilberto, así como a todos mis compañeros del laboratorio gracias por su amistad, por hacer del trabajo y aprendizaje algo muy divertido.

A mis amigas Lily, Janeth y Patricia García, aprendí muchísimo de ustedes, entre tantas cosas lo valioso de contar con personas tan dedicadas y maravillosas.

A la Dra. Myriam de la Garza por ser uno de los principales soportes de este trabajo, gracias por sus consejos y confianza.

A Israel Escobedo, en la vida conoces pocas personas tan humildes y dispuestas a ayudar sin interés alguno, gracias amigo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Diabetes	3
3.2 Resistencia a la insulina	4
3.3 Papel del PPAR γ (Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas, isotipo gama) en el metabolismo de los carbohidratos	4
3.4 Uso del tejido adiposo para predecir enfermedades metabólicas	5
3.5 Relación entre adipogénesis y diabetes	6
3.6 Estrés oxidativo y diabetes	7
3.7 Tratamientos en Diabetes mellitus	7
3.8 Medicina tradicional, productos naturales y diabetes	9
3.9 <i>Clidemia submontana</i>	11
3.10 <i>Cyathea princeps</i>	14
3.11 <i>Bidens sp</i>	16
4. JUSTIFICACION	18
5. HIPOTESIS	19
6. OBJETIVOS DEL TRABAJO	19
7. MATERIALES Y METODOS	20
7.1 Estrategia general del trabajo	20
7.2 Colecta del material vegetal	20
7.3 Preparación del extracto	20
7.4 actividad inhibitoria de α -amilasa	21
7.5 actividad inhibitoria de α -glucosidasa	22
7.6 Preparación del cultivo celular y diferenciación de adipocitos	24
7.7 Expresión de PPAR α en adipocitos	24
7.8 Acumulación de lípidos en adipocitos	25

7.9 Ensayo de proliferación celular	26
7.10 Actividad anti radical: capacidad de captura de radical libre	27
7.11 Fraccionamiento del extracto de <i>C. submontana</i>	28
7.12 Perfil fitoquímico de las plantas de estudio	28
7.13 Análisis estadístico	30
8. RESULTADOS	31
8.1 Preparación del extracto	31
8.2 actividad inhibitoria de α -amilasa	31
8.3 actividad inhibitoria de α -glucosidasa	33
8.4 Preparación del cultivo celular y diferenciación de adipocitos	34
8.5 Expresión de PPAR γ en adipocitos	34
8.6 Acumulación de lípidos en adipocitos	35
8.7 Ensayo de proliferación celular	37
8.8 Actividad anti radical: capacidad de captura de radical libre	38
8.9 Fraccionamiento del extracto de <i>C. submontana</i>	38
8.10 Perfil fitoquímico de las plantas en estudio	40
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIÓN	45
11. PERSPECTIVAS	46
12. BIBLIOGRAFÍA	47
13 ANEXOS	60
14. RESUMEN BIOGRÀFICO	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No.	TITULO	PÁGINA
1	Rendimientos de extracción	30
2	Inhibición enzimática de extracto etanólico de <i>C. submontana</i> y acarbosa	32
3	Capacidad de captura de DPPH de los extractos etanólicos y tocoferol	38
4	Perfil fitoquímico de las plantas en estudio	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	TITULO	PAGINA
1	<i>Clidemia submontana</i>	11
2	<i>Cyathea princeps</i>	14
3	<i>Bidens sp.</i>	16
4	Estrategia general	20
5	Prueba positiva y negativa de inhibición de α -amilasa	32
6	Inhibición de α -amilasa	32
7	Inhibición de α -glucosidasa	33
8	Nivel de expresión del mRNA de PPAR γ en adipocitos murinos	35
9	Efecto de <i>C. submontana</i> y Rosiglitazona en la acumulación de lípidos	36
10	Tinción de adipocitos murinos (línea 3T3-L1) con Oil red O	37
11	Efecto de <i>C. submontana</i> en la proliferación de células VERO	37
12	Elución del extracto de <i>C. submontana</i> en cromatografía en columna de sílica gel	39
13	Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de las diferentes fracciones de <i>C. submontana</i>	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo o abreviatura	Significado
BBR	Berberina
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
C/H	Mezcla de cloroformo y metanol
CAM	Medicina complementaria y alternativa
CAT	Catalasa
cDNA	Cadena complementaria de ácido desoxiribonucleicos
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DE	Desviación estándar
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNS	ácido dinitrosalicílico
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FeCl ₃ /EtOH	Mezcla de cloruro de hierro con etanol
FW	Peso fresco
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
H/C	Mezcla de hexano y cloroformo
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MD	Medio de diferenciación
MM	Medio de maduración
MP	Medio de propagación

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PBS	Buffer salino de fosfatos
pNPG	p-nitrofenil-a-D-glucopiranosido
PPAR α	Receptores activados alfa por los proliferadores de peroxisomas
PPAR β	Receptores activados beta por los proliferadores de peroxisomas
PPAR γ	Receptores activados gama por los proliferadores de peroxisomas
RI	Resistencia a la insulina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxigeno
RXR	Receptor retinoide x
SFB	Suero fetal bovino
SGLT-2	Cotransportador sodio-glucosa tipo 2
TZD	Tiazolidinedionas
U/mL	Unidades por mililitro

1. RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica, la cual se ha convertido en un grave problema a nivel mundial. En el 2014 aproximadamente 422 millones de personas padecían esta enfermedad y se espera que en los próximos 20 años este número se duplique. La búsqueda de nuevos fármacos que actúen como agonistas de los Receptores γ activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) tiene una gran importancia, ya que se ha demostrado que, incrementar la expresión de PPAR α y a su vez equilibrar el proceso de adipogénesis conduciría a una mejor respuesta en el metabolismo de carbohidratos. Otra forma de combatir la DM es retrasando la absorción de la glucosa a través de la inhibición de la hidrólisis enzimática de carbohidratos llevada cabo por la α -amilasa y α -glucosidasa. Se conoce que una de las complicaciones más importantes en el estado diabético es el estrés oxidativo, de aquí la importancia de adicionar agentes antioxidantes en pacientes hiperglucémicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos etanólicos de *C. submontana*, *Cyathea princeps* y *Bidens sp.*, además de separar la fracción activa del extracto o extractos activos. Se evaluó la capacidad de los extractos para inhibir la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa, los resultados de *C. submontana* fueron de CI₅₀ de $28.2 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$ y $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente para cada enzima. *C. princeps* y *Bidens sp* no mostraron una actividad relevante. Se evaluó el efecto de los extractos sobre la expresión del gen de PPAR γ , solamente *C. submontana* incremento el nivel de expresión del gen de manera significativa en comparación con el fármaco rosiglitazona. De la misma forma *C. submontana* fue el extracto con mayor capacidad de captura del radical DPPH con una CE₅₀ de $21.52 \pm 1.75 \mu\text{g/mL}$. Tomando en cuenta los resultados anteriores se decidió continuar solo con *C. submontana*, el cual se considera como moderadamente toxico en el ensayo de proliferación celular con células VERO. EL extracto de *C. submontana* se fraccionó por cromatografía en columna de sílica gel, de la cual se obtuvieron 18 fracciones. Las fracciones se probaron con los ensayos enzimáticos para encontrar la fracción responsable de la actividad biológica *in vitro*, únicamente las fracciones f12 y f18 fueron activas. Los compuestos presentes en el extracto etanólico de *C. submontana* pueden contribuir en el tratamiento y/o como coadyuvante en la Diabetes mellitus.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease considered a severe global public health problem. In 2014, approximately 285million people suffered from this illness, and this amount is expected to double up within the next 20 years. The search for new drugs that act as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is essential. The best carbohydrates metabolism state could be reach by increase PPAR γ expression. Another way to confront DM is inhibiting enzymatic hydrolysis of both α -amylase y α -glucosidase, this would delay the glucose absorption. One of the most critical complications in diabetes is oxidative stress, which is why the use of antioxidants in diabetic patients is indispensable. This work aimed to evaluate the antidiabetic activity in vitro of the ethanol extracts *C. submontana*, *Cyathea princeps*, and *Bidens sp.*, as well as its fractionation. Was evaluated the ability of the extracts to inhibit the enzymatic activity of α -amylase and α -glucosidase, the results of *C. submontana* were IC 50 of 28.2 ± 2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.9 ± 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively for each enzyme. *C. princeps* and *Bidens sp* did not show a relevant activity. Was evaluated the effect of the extracts on the expression of the PPAR γ gene, only *C. submontana* increased the expression level of the gene significantly compared to the drug rosiglitazone. In the same way, *C. submontana* was the extract with the best capture capacity of the DPPH radical with an EC50 of 21.52 ± 1.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Taking into account the previous results it was decided to continue only with *C. submontana*, which is considered to be moderately toxic in the cell proliferation assay with VERO cells. The extract of *C. submontana* was fractionated by chromatography on a silica gel column, from which 18 fractions were obtained. The fractions were tested with enzymatic assays to find the part responsible for the biological activity in vitro, only fractions f12 and f18 were active. The compounds present in the ethanolic extract of *C. submontana* may contribute to the treatment and as an adjuvant in diabetes mellitus.

2. INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica, la cual se ha convertido en un grave problema a nivel mundial. En el 2014 aproximadamente 422 millones de personas padecían esta enfermedad y se espera que en los próximos 20 años este número se duplique (Chen 2016). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la de mayor prevalencia entre los diferentes tipos de diabetes, esta es una compleja alteración metabólica caracterizada por una combinación de resistencia a la insulina (RI, baja sensibilidad de uno o múltiples tejidos hacia la insulina) y alteración en la secreción de esta (Ascaso 2014).

La búsqueda de nuevos fármacos que actúen como agonistas de los Receptores γ activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) tiene una gran importancia debido a que los ligandos de estos factores de transcripción presentan múltiples respuestas biológicas tales como: la disminución de RI evitando los niveles elevados de glucosa en plasma. Se ha demostrado que el proceso de adipogénesis se encuentra bajo el control de una compleja cascada transcripcional de factores reguladores en la que juegan un papel fundamental el receptor nuclear PPAR α y diversos miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (Gosh et al. 2014; Alonso et al. 2012). Los agentes anti adipogénicos, incluyendo algunos productos botánicos, han sido estudiados como potenciales agentes terapéuticos para disminuir o prevenir la obesidad, sin embargo la hipótesis actual que prevalece es que la interrupción de la diferenciación adipocitaria limita la expansión del tejido adiposo y conduce a RI y el desarrollo de DM2 (Richard et al. 2014). Dicho lo anterior, incrementar la expresión de PPAR α y a su vez equilibrar el proceso de adipogénesis conduciría a una mejor respuesta en el metabolismo de carbohidratos.

Por otro lado, las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa que se encuentran en la saliva y en el borde en cepillo del intestino delgado respectivamente, actúan en la hidrólisis sobre oligosacáridos y disacáridos produciendo monosacáridos de fácil absorción como glucosa. Por lo antes mencionado, otra forma de combatir la DM es retrasando la absorción de la

glucosa a través de la inhibición de la hidrólisis enzimática de carbohidratos llevada cabo por la α -amilasa y α -glucosidasa (efecto antihiper glucémico) (Alonso et al. 2012).

Se conoce que una de las complicaciones más importantes en el estado diabético es el estrés oxidativo que provoca complicaciones cardiovasculares, especialmente en la diabetes tipo 2. Los niveles elevados de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en diabetes es debida a la disminución en la producción de catalasa (CAT), super oxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa, lo que provoca un estrés oxidativo. De acuerdo a estudios epidemiológicos la mortalidad de la diabetes puede ser ocasionada por un incremento en enfermedades cardiovasculares (Asmat et al. 2016). De aquí la importancia de adicionar agentes antioxidantes en el tratamiento para pacientes hiperglucémicos.

A pesar de la disponibilidad de tratamientos para la DM, esta enfermedad continua como un grave problema a nivel mundial, principalmente por la ausencia de fármacos para combatir la enfermedad y con mínimos efectos secundarios adversos.

Alrededor del 80% de la población a nivel mundial utilizan las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades. Estas son una importante fuente de fármacos, alrededor del 25% de los medicamentos prescritos en todo el mundo tienen su origen en alguna especie vegetal (Mara et al. 2011).

En la medicina tradicional mexicana se reportan plantas que poseen beneficios en el tratamiento de la DM, a pesar de esto muchas especies no han sido estudiadas de forma científica para validar su capacidad de mejorar la condición de los pacientes diabéticos, así como determinar su citotoxicidad para la administración segura de las mismas. Por lo cual es importante buscar alternativas para el tratamiento o como coadyuvante efectivo y seguro de esta enfermedad. En este trabajo se seleccionaron distintas especies vegetales de los géneros *Clidemia*, *Cyathea* y *Bidens* que son usadas al sur de México como una alternativa en el tratamiento de la diabetes mellitus, sin embargo, esta actividad aún no se ha confirmado de manera científica.

3. ANTECEDENTES

3.1 Diabetes

El término *Diabetes* se asigna a un grupo de desórdenes metabólicos en donde una falta de sensibilidad a la insulina y/o una deficiente producción de insulina resultan en niveles elevados de glucosa en sangre. Estos incluyen DM1, DM2 y otras variantes menos prevalentes. Los niveles elevados de glucosa en sangre tienen un impacto negativo en múltiples órganos, lo que representa un alto riesgo de accidentes cerebrovasculares, enfermedades del corazón, fallas renales, ceguera, presión sanguínea elevada y otras condiciones crónicas que afectan la calidad de vida. Existen alrededor de 400 millones de casos de diabetes en el mundo y las cifras siguen incrementando. Aun no existe cura para esta enfermedad, pero en los sistemas de salud se implementan estrategias encaminadas a reducir las complicaciones de la enfermedad (Zhang y Thurber 2018).

En el cuerpo humano, un gran número de rutas metabólicas funcionan en sincronía para mantener el organismo saludable. Una aberración en la homeostasis deriva en el desarrollo de un estado patológico en varios órganos. En la Diabetes mellitus se reduce la capacidad de un individuo para regular los niveles de glucosa en sangre, resultando en complicaciones mayores o menores ya mencionadas (Kirti et al. 2012). A pesar de la participación de múltiples órganos en el desarrollo de la DM, el páncreas es un órgano crítico debido a su papel principal en la regulación de los niveles de glucosa en sangre (Laurent et al. 2016). Dentro de las funciones del páncreas se incluye la secreción de insulina, esta función se realiza específicamente por los islotes de Langerhans presentes en las células beta (constituyen el 70–80 % del órgano) (Zhang y Thurber 2018).

La DM1 es un desorden autoinmune caracterizado por la destrucción de las células beta pancreáticas secretoras de insulina, por parte de las células T. La drástica reducción en la funcionalidad de las células beta resulta en una hiperglicemia por la falta de insulina que estimule la absorción de glucosa por parte de las células en el organismo (Kaul et al. 2012).

La patofisiología de la intolerancia a la glucosa en DM2 es compleja y están involucrados tanto factores genéticos como factores adquiridos como el incremento de peso y la

inactividad física. En individuos diabéticos con hiperglucemia en ayunas, los tres principales factores que contribuyen en la resistencia a la insulina son: deficiencia en la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas, resistencia a la insulina del tejido muscular y la resistencia hepática a la insulina (Bays et al. 2004)

3.2 Resistencia a la insulina

Bajo condiciones normales, la unión de la insulina con el receptor de insulina provoca un cambio conformacional del receptor que le permite su auto-fosforilación en el dominio citoplasmático y que a su vez lleva a los receptores a cumplir con su función de estimular la producción y secreción de proteínas clave en el metabolismo (Zand et al. 2017). La resistencia a la insulina (RI) es una condición en la cual la célula se vuelve menos sensible y resistente a la actividad de la insulina, causando un incremento de glucosa en sangre, lo que lleva a una hiperglucemia (Zhang *et al.* 2017). Algunos de los factores que influyen en el desarrollo de la resistencia a la insulina son: dieta, estrés, sedentarismo, obesidad, falta de horas de sueño y embarazo (Sah *et al.* 2016).

No solo el metabolismo de carbohidratos se ve afectado como consecuencia de la RI, también el metabolismo de lípidos y la respuesta inflamatoria; y esto tiene que ver con el mal funcionamiento de los adipocitos o falta de estas células durante la RI. Esta condición de resistencia a la insulina es la principal causa de la diabetes tipo 2 (Chen 2016; Zand et al. 2017).

3.3 Papel del PPAR γ en el metabolismo de los carbohidratos

Los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR) son una super familia de receptores nucleares que se conoce desde 1990. Se han reportado 3 diferentes isotipos: PPAR α , PPAR β y PPAR γ ; los cuales forman heterodímeros con el receptor retinoide x (RXR) para transcribir los genes blanco a través de la unión con elementos regulatorios en regiones promotora. PPAR α y PPAR β lideran la beta oxidación. El isotipo PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo y a niveles menores en tejido cardiaco,

colon, riñón, páncreas, intestino y musculo esquelético. Se sabe que este isotipo tiene diversas funciones en el metabolismo, especialmente en la adipogénesis y en la sensibilidad a la insulina (Yasmin y Jayaprakash 2017). La expresión del gen de PPAR γ resulta en la producción de tres tipos diferentes de mRNA; PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3. Las proteínas producidas por los mRNA de PPAR γ 1 y PPAR γ 3 son idénticos, mientras que el producto de PPAR γ 2 contiene una región amino terminal adicional, compuesta por 30 amino ácidos. Todas las isoformas de PPAR γ juegan un rol importante en la diferenciación del tejido adiposo y en el metabolismo de glucosa. La isoforma PPAR γ 1 se expresa en todas las células cercanas mientras que PPAR γ 2 se limita principalmente al tejido adiposo. Por esto, PPAR γ 2 es el más potente activador transcripcional (Janani y Ranjitha 2015).

Las tiazolidinedionas (TZD) son los compuestos más importantes que exhiben una alta selectividad por los PPAR γ para inducir un incremento en el consumo de glucosa, potenciando la sensibilidad a la insulina por parte de los adipocitos, musculo y macrófagos (Yasmin y Jayaprakash 2017). Los efectos farmacológicos de la activación de PPAR γ , por parte de las TZD ha sido atribuido, en parte a la disminución de los niveles de ácidos grasos y al incremento en el almacén de lípidos en el tejido adiposo, en el cual PPAR γ es expresado en grandes cantidades. Por consecuencia también se disminuye la lipotoxicidad en musculo e hígado. Algunos estudios realizados en ratones con el gen de PPAR γ apagado, demuestran que este receptor es importante para mantener los niveles normales de sensibilidad a la insulina, además hay una contribución del gen sobre el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Janani y Ranjitha 2015). La activación de PPAR γ en pacientes diabéticos por parte de las TZD resulta en una mejoría a la sensibilidad de la insulina. Los mecanismos por lo cual esto sucede, aún no están claros.

3.4 Uso del tejido adiposo para predecir enfermedades metabólicas

El síndrome metabólico emerge como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Síndrome metabólico, se refiere al conjunto de factores metabólicos de riesgo involucrados en dislipidemia aterogénica, presión sanguínea elevada, altas

concentraciones de glucosa en sangre estrechamente relacionadas a la resistencia a la insulina, estado protrombótico y estado proinflamatorio. El tejido adiposo funciona como un órgano secretor de hormonas y citocinas para regular y mantener la homeostasis metabólica en otros tejidos. Es bien sabido que el exceso de tejido adiposo está estrechamente asociado con factores cardio metabólicos involucrados en la hipertensión, dislipidemia y DM. Además, el índice de grasa visceral puede ser usado como un indicador de desarrollo del síndrome metabólico, así como el desarrollo de DM2 (Tsavetsov et al. 2018).

3.5 Relación entre adipogénesis y diabetes

El proceso de diferenciación de pre adipocitos a adipocitos se ha estudiado ampliamente en modelos celulares de pre adipocitos blancos (3T3-L1, 3T3-F442A) y líneas inmortales de pre adipocitos marrones. La morfología típica de adipocito se alcanza con la fase de diferenciación terminal, induciéndose la transcripción de genes típicos de adipocitos maduros, dentro de los cuales están genes relacionados con la producción de adipocinas, estas incluyen proteínas que intervienen en la regulación de la ingesta y del balance energético como son la adiponectina y la leptina, estrechamente relacionadas con la homeostasis de la glucosa (Ràfols 2014).

Se ha demostrado que se puede disminuir la diferenciación de las células 3T3-L1 regulando negativamente PPAR γ , -C/EBP α , leptina y adiponectina (Kim *et al.* 2015). PPAR γ es una de las proteínas de mayor importancia en DM ya que es el regulador maestro en la diferenciación adipocitaria e incremento en el número de adipocitos sensibles a la insulina, además la activación de PPAR γ en adipocitos maduros regula varios genes involucrados en la cascada de señalización de la insulina y en el metabolismo de glucosa y lípidos (Janani y Ranjitha 2015).

3.6 Estrés oxidativo y diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad en la cual los pacientes se encuentran en constante riesgo de complicaciones tales como: macrovasculares (enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica e infarto cerebrovascular) microvascular (neuropatías, retinopatías y nefropatías) y ambas (pie diabético). Todas ellas asociadas al estrés oxidativo. Actualmente hay evidencia de la importancia del rol del estrés oxidativo en la DM. La formación de radicales libres en la diabetes por la glicación no enzimática de proteínas, la oxidación de la glucosa y un incremento en la peroxidación de lípidos, llevan a un daño enzimático, también de la maquinaria celular, además de aumentar la resistencia a la insulina. Hay experimentos que evidencian la relación de la diabetes con el estrés oxidativo utilizando diferentes biomarcadores como el DNA y productos de peroxidación de lípidos. Una variedad de condiciones patológicas han sido relacionadas con el estrés oxidativo como la artritis reumatoide y el cáncer (Asmat et al. 2016). Por tal motivo es de gran importancia tener control del estrés oxidativo en pacientes diabéticos administrando agentes antioxidantes.

3.7 Tratamientos en Diabetes mellitus

El tratamiento eficaz de los pacientes con diabetes debe incluir todas aquellas medidas que permiten prevenir la enfermedad o retrasar su manifestación y, cuando ya esté presente, detectar la diabetes y sus complicaciones en fase temprana para instaurar de forma anticipada las medidas terapéuticas adecuadas, tanto para prevenir el desarrollo de las complicaciones crónicas como las consecuencias de estas. Sin embargo, los resultados distan mucho de ser los deseables, tanto desde el punto de vista del control de la hiperglucemia y de otros factores de riesgo asociados como de las complicaciones. Esto es, en parte, consecuencia de la fisiopatología compleja de la enfermedad, las limitaciones de los tratamientos disponibles y la adherencia a los mismos de los pacientes, pero también de cómo son aplicados por el personal sanitario. En este sentido, existen una serie de deficiencias en la estrategia del manejo de los pacientes, especialmente en la diabetes tipo 2 (DM2) (Alcántara y Pérez 2016)

En el caso de la diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) el principal tratamiento es la administración de insulina y se pueden combinar algunos otros tratamientos. Para tratar a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) se pueden utilizar diferentes grupos de fármacos como lo son: la metformina, Inhibidores de DPP-4, Inhibidores de SGLT-2 (gliflozinas), Sulfonilureas, Glinidas o meglitinidas, Pioglitazona e inhibidores de α -glucosidasas y α -amilasas. Metformina es en monoterapia el fármaco de primera elección en la DM2, que reduce la producción hepática de glucosa, disminuye la glucemia basal y presenta como efecto secundario frecuente intolerancia gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal), por este motivo menos del 5% de los pacientes en los ensayos clínicos abandonan el tratamiento. Los Inhibidores de DPP-4 actúan inhibiendo dicha enzima, incrementan los niveles circulantes del glucagón-like peptide (GLP-1) endógeno en torno a 2-3 veces, tanto en situación basal como postprandial. La liberación de GLP-1 con la ingesta estimula la secreción de insulina e inhibe la secreción de glucagón. Recientemente se han publicado varios estudios de seguridad cardiovascular con inhibidores de DPP-4 y solo en un estudio con saxagliptina se encontró un inesperado incremento del 27% en las hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca. Los inhibidores de SGLT-2 actúan sobre el riñón inhibiendo la reabsorción de glucosa por un mecanismo independiente de la insulina; aumentando la glucosuria y reduciendo la hiperglucemia. Dentro de los efectos secundarios, estos fármacos aumentan moderadamente los niveles de LDL (5-10%) y HDL, modificando también los niveles de triglicéridos. Las sulfonilureas potencian la secreción de insulina inducida por la glucosa. Este medicamento ha sido durante años uno de los tratamientos de elección en los pacientes con DM2. Tienen una potencia similar a metformina, con el inconveniente de que su uso induce ganancia ponderal de peso (2-3 kg) y puede provocar hipoglucemias graves (glibenclamida, clorpropamida). Además, algunos datos retrospectivos sugieren un mayor riesgo de muerte global y por causas isquémicas con el empleo de dosis elevadas de sulfonilureas de primera generación (clorpropamida, tolbutamida). Al igual que las sulfonilureas, las glinidas son secretagogos, aunque actúan uniéndose a un receptor distinto. Tienen una vida media más corta que las sulfonilureas, por lo cual requiere una administración más frecuente. Al igual que las sulfonilureas, el tratamiento con meglitinidas induce ganancia ponderal, aunque el riesgo de hipoglucemia parece ser menor. El fármaco pioglitazona

incrementa la sensibilidad a la insulina a nivel del hígado, músculo y tejido adiposo. Tiene una eficacia comparable a metformina y a las sulfonilureas, al igual que metformina, no induce hipoglucemia. Los efectos secundarios más frecuentes son edema, ganancia de peso y anemia. En Europa no hay autorización para su comercialización desde el 23 de septiembre de 2010, suspendiéndose su distribución en España en diciembre 2010 (Ampudia y Perello 2016).

3.8 Medicina tradicional, productos naturales y diabetes

A pesar de contar con fármacos para el tratamiento de algunas enfermedades que padece el hombre, cuando estos tratamientos son poco efectivos, el tiempo designado de administración de fármacos es muy prolongado, inclusive cuando son muy costosos, o simplemente son muy agresivos hacia el organismo provocando efectos secundarios. Siempre se recurre a una alternativa para hacer más accesible o efectiva la cura de alguna enfermedad; un ejemplo de alternativas es el uso de Productos Naturales.

Alrededor del 80% de la población general en todo el mundo usa plantas para tratar diversas enfermedades. Las plantas medicinales son una importante fuente de fármacos, alrededor del 25% de los medicamentos prescritos en todo el mundo vienen de las plantas. México posee más de 23,400 especies de plantas vasculares y 5,000 de ellas son usadas con propósitos medicinales. Más del 90% de los mexicanos usan las plantas medicinales para el tratamiento empírico de algunas enfermedades (Alonso *et al.*, 2012).

En México, la población que busca tratamientos diferentes a los prescritos por los doctores utiliza la medicina alternativa y complementaria (CAM) como lo son; los acupunturistas, curanderos y homeópatas. Esta situación puede deberse a que los costos de los tratamientos convencionales son más elevados que los del alternativo. Los hallazgos sugieren que los motivos económicos juegan un papel importante en el uso de la medicina alternativa. La población con cobertura de seguro médico usa con menor frecuencia terapias alternativas, a diferencia de la población más pobre; donde se substituye el uso de los servicios convencionales por la medicina tradicional (Van Gameren, 2010).

Estudios han demostrado que los individuos con diabetes son 1.6 veces más propensos a utilizar Medicina Alternativa y Complementaria (CAM) que los individuos sin diabetes, y que la diabetes puede ser considerada como un predictor independiente del uso de CAM. Se reportó la prevalencia en el uso de CAM en individuos con diabetes en un en norte americanos y mayor a 62 % en mexicanos (Gobert y Duncan 2008).

Se recomienda a los pacientes diabéticos cambios en su estilo de vida y alimentación, así como agentes antidiabéticos orales, insulina y otros tratamientos modernos. Por otro lado, las terapias complementarias y alternativas son una elección popular en estos pacientes (Medagama et al. 2014; Chang et al. 2013). En estudios realizados en todo el mundo se demostró que más de dos tercios de la población utiliza la medicina complementaria y alternativa (Ching et al. 2013; Baran et al. 2017).

Tal y como se describe anteriormente, estudios han confirmado que la patogénesis de la diabetes está relacionada con varias vías de señalización tales como las de la insulina, rutas del metabolismo de los carbohidratos, algunas otras relacionadas con el estrés, rutas involucradas en la secreción de insulina, vías de regulación de PPAR y vías de modificación de cromatina. Estas vías de señalización se han convertido en la principal fuente de blancos prometedores para nuevos fármacos dedicados a tratar la diabetes y otras enfermedades metabólicas. Comparado con los compuestos sintéticos, los productos naturales contienen una gran diversidad estructural inherente. Se han vuelto la principal fuente de agentes bioactivos y juegan un rol clave en el descubrimiento de compuestos para la investigación de nuevos fármacos. Hasta la fecha se ha determinado la función en la regulación de las rutas de señalización de la patofisiología diabética de muchos componentes activos derivados de fuentes naturales, los cuales exhiben actividad antidiabética. Estas son algunas de las moléculas aisladas de productos naturales, que presentan actividad sobre las rutas de señalización en la diabetes: DAQ-B1, Cpd 2, ZL-196, LD-17, hyrtiosal, ácido ursólico, ácido oleanílico, NPLC441, TUG-424, ácido grifolico, ácido corosolico, ácido maslinico, ácido bredemolico, 12b, BBR, DhBBR, SQA, SQHA, ESD, CAB, trierixina, latifolians A y panduratin A (Quiong *et al.* 2010).

Se han reportado alrededor de 200 compuestos purificados de plantas que poseen efecto hipoglucemiante. Dichos compuestos están clasificados como: alcaloides, carbohidratos,

glicosidos, flavonoides, esteroides, terpenoides, péptidos y amino ácidos (Patel *et al.* 2012).

Para México, se habían reportado hasta el 2005 por lo menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias de plantas usadas como agentes hipoglucemiantes. Las familias más comúnmente mencionadas son: *Asteraceae* (47 especies), *Fabaceae*, (27 especies), *Cactaceae* (16 especies), *Solanaceae* y *Euphorbiaceae* (10 especies) y *Laminaceae* (9 especies). Dentro de estas familias se menciona los géneros *Clidemia*, *Cyathea* y *Bidens* como posibles fuentes de agentes antidiabéticos en México (Andrade y Heinrich 2005).

3.9 *Clidemia submontana* (Almeda 1993)



Figura 1. *Clidemia submontana*

Información Taxonómica

Reino *Plantae*

Phylum *Magnoliophyta*

Clase *Magnoliopsida*

Orden *Myrtales*

Familia *Melastomataceae*

Género *Clidemia*

Epíteto específico *submontana*

Nombre Científico *Clidemia submontana*

Autor del nombre Rose ex Gleason

Los miembros de la familia *Melastomataceae* son plantas herbáceas perennes, arbustos o árboles pequeños; hojas opuestas, decusadas, simples, usualmente con 3 a 7(9) nervaduras longitudinales, originándose en la base de la lámina, o bien a partir de la nervadura central a más o menos corta distancia de la base (“plinervadas”), rara vez pinnatinervadas (con 3 o más pares de nervaduras laterales divergiendo de la central en puntos sucesivos arriba de la base); flores por lo general hermafroditas, o bien, de ser unisexuales, las plantas son dioicas, dispuestas en panículas o cimas axilares, o solitarias, comúnmente 4-6(8)-meras, el hipantio lleva sépalos, pétalos y estambres sobre un tálamo (anillo vascular) situado en o cerca de la base de los lóbulos del cáliz; cáliz por lo general abierto en botón (en nuestras especies caliptrado en *Conostegia*); pétalos libres, blancos, rosados o morados, típicamente obovados; estambres por lo general del doble del número de los pétalos, pero en *Conostegia* con frecuencia más numerosos, isomórficos a dismórficos, anteras abriéndose por medio de uno o dos poros terminales truncados o inclinados en forma diversa, el conectivo sencillo o bien prolongado por debajo de las tecas de la antera y provisto de diferentes tipos de apéndices dorsales y/o ventrales; ovario 2-5 (10)-locular, súpero o ínfero, placentación axilar, los óvulos numerosos; fruto en forma de cápsula loculicida encerrada por el hipantio, o bien, una baya; semillas pocas a numerosas, ovoides, o linear-oblongas, sin endospermo. Tiene alrededor de 185 a 190 géneros y aproximadamente 5000 especies mayormente de distribución pantropical, de las que dos terceras partes están restringidas al hemisferio occidental. Familia de relativamente escasa importancia económica. Algunas especies se cultivan con fines ornamentales; otras tienen

frutos comestibles, pero en general no muy apetecidos; los troncos de varias de las más robustas son maderables (Almeda, 1993).

EL género *Clidemia* con más de mil especies descritas, es probablemente el cuarto genero con mayor número de especies de la familia *Melastomatácea*, pero en México es el segundo superado solamente por el género *Miconia* (Gleason, 1939).

Otras especies del género:

Clidemia hirta. Planta utilizada en la medicina tradicional de algunos países. Se ha propagado *in vitro* para mejorar la producción de algunos metabolitos secundarios con actividades biológicas como antibacteriana y antioxidante, con una importante producción de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas a partir de las hojas (Lopez T. et al, 2016).

Del extracto de acetato de etilo de la raíz de esta planta, mostrando una interesante actividad antibacteriana, pero con toxicidad en cultivo de células de piel. Se identificaron taninos hidrolizables y ácido arjunolico (Abdellaoui S. et al., 2014).

Se probó la actividad antibacteriana de un extracto etanólico de *clidemia hirta*, mostrándose con una actividad moderada frente a las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En las hojas se evidenció la presencia de triterpenos, esteroides, aceites esenciales, Fenoles, compuestos reductores, agrupamientos lactónicos, flavonoides, carotenos, saponinas. En frutos se encontraron en forma abundante alcaloides, triterpenos-esteroides, carotenos, aceites esenciales, saponinas, fenoles, compuestos reductores y flavonoides (Saldaña S. et al., 2016).

Clidemia rurbra. De esta especie se han aislado diferentes compuestos y se determinó que esta planta posee una buena capacidad antioxidante. Algunos de los compuestos son: cianidin 3-O-rutinosido (39.43 ± 1.66 mg/100 g de peso fresco (FW)), delphinidina 3-O-rutinosido (23.74 ± 1.18 mg/100 g FW), cianidina 3-O-glucosido (11.68 ± 0.56 mg/100 g FW) y delphinidina 3-O-glucoside (6.08 ± 0.35 mg/100 g FW). Ácidos fenólicos (ácido galico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico y ácido cafeico), flavan-3-oles (epigallocatequina, epigallocatequin galato) y 11 diferentes derivados de

miricetinas and quercetinas como lo son quercetin 3-O-arabinosido (5.26 ± 0.16 mg/100 g FW) y quercetin 3-O-ramnosido (5.06 ± 0.08 mg/100 g FW) (Gordon A. et al., 2011).

En esta misma especie, el extracto hecho con diclorometano presentó actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* con porcentajes de inhibición de 66.4, 57.4 y 46.1% a concentraciones de 100, 50 y 25 mg/mL. El extracto acuoso presentó actividad antioxidante con el método de DPPH respectivamente (Jaime A, 2008).

3.10 *Cyathea princeps*



Figura 2. *Cyathea princeps*

Información Taxonómica

Reino *Plantae*

Phylum *Pteridophyta*

Clase *Polypodiopsida*

Orden *Cyatheales*

Familia *Cyatheaceae*

Género *Cyathea*

Epíteto específico *princeps*

Nombre Científico *Cyathea princeps*

Autor del nombre *E. Mayer*

Tallo de 2-7 m de alto, de 8-12 cm de diámetro con fondas caedizas dejando cicatrices; frondas de 2.5-3.5 m de largo; estípite espinoso, pajizo o pardo, opaco con una caspilla parda; escamas del estípite de 15-30 x 2-5 mm, lanceolada, concoloras o casi concoloras, pardas a pardo-oscuras, a veces con un margen más claro; lámina bipinnado-pinnatifida a tripinnada, reducida gradualmente a un ápice pinnatifido; raquis glabro a escamuloso, con caspilla parda a amarillenta formada de escamulas diminutas; pinnas sésiles o pediculadas, el pedículo de 0-1 cm; pinnadas medias 50-75 x 12-24 cm, lanceoladooblongas; costas glabras o casi glabras, a menudo dispersamente cubiertas de diminutas escamulas amarillentas a pardo-amarillentas mezcladas con tricomas hialinos de 0.1-0.3 mm; pinnulas 8-12 x 1.5-2.6 cm, sésiles a cortamente pediculadas, el pedículo hasta 2 mm; costulas glabras a puberulentas y escamosas, los tricomas de 0.1-0.3 mm, hialinos a amarillentos, generalmente adpresos, las escamas anchamente ovadas, pálidas a amarillentas; segmentos de las pinnulas medias 12-20 pares, 3-5 mm de ancho, enteros a serrulados; vena media de las pinnulas glabra o con pelos hialinos patentes solo en la parte terminal del haz, glabra a medianamente pilosa y escamosa, las escamas 1-3 mm de largo, ovadas, con ápice agudo a caudado, blanquecinas a amarillentas, planas (excepto en el ápice de los segmentos con escamas a veces levemente abolladas), con pelos de 0.5-2 mm de largo, patentes, hialinos, a veces también con pelos de 0.2-0.5 mm de largo, hialinos, pardos, adpresos, retorcidos; nervaduras 8-10 pares por segmento, bifurcadas, glabras o dispersamente pilosas en ambas superficies, los pelos 0.2-0.5 mm, blanquecinos a pardo-amarillentos, patentes, abaxialmente a menudo mezclados con pelos 0.1-0.3 mm, adpresos, retorcidos; tejido laminar entre las nervaduras glabro o con pelos de 0.2-0.5 mm, blanquecinos, patentes; soros subcostales; parafisos más cortos que los esporangios, inospicuos; indusio globoso, que rodea completamente al receptáculo, evanescente en la madurez (Rojas 2005).

3.11 *Bidens sp*



Figura 3. *Bidens sp*

Información Taxonómica

Reino *Plantae*

Phylum *Magnoliophyta*

Clase *Magnoliopsida*

Orden *Asterales*

Familia *Asteraceae*

Género *Bidens*

Bidens biternata es ampliamente usada en la medicina tradicional contra inflamación, infecciones, diabetes, malaria, lepra, úlceras, diarrea y otros desordenes digestivos. Esta especie presenta un alto contenido fenólico en el tallo (0.16 mg/g), en raíz 0.15 mg/g, hoja madura 0.042 mg/g y en hojas jóvenes 0.04 mg/g.

Las especies del género *Bidens* son ricas en quercetina y compuestos fenólicos. Además, presentan glicósidos de chalconas; la más abundante es 1,3- difenil-2-propen-1-ona. En las últimas décadas se ha realizado el aislamiento de compuestos de varias especies del género *Bidens*, por ejemplo; se han aislado alrededor de 200 compuestos de *B. pilosa*.

Del extracto etanólico de las hojas de *B. biternata* se ha aislado 5, 7, 8, 4'-tetra-hidroxi-3, 5'-di-metoxi flavona-7-O- α -L-rahamnoprinosil-4'-O- β -D-arabinopiranosil (1 \rightarrow 4)-O- β -D-xilopiranosido.

Las propiedades medicinales del género *Bidens* se deben a glicosidos poliacetilenicos, auronas, glicosidos de auronas, derivados del ácido cumárico, flavonoides, flavonoides glicosilados, sesquiterpenos y diterpenos.

La actividad antimalaria de este género se debe a los compuestos acetilados. Por ejemplo; *B. biternata* contiene solo 3 de este tipo de compuestos y muestra una inhibición del crecimiento *in vitro* del 38 % sobre *Plasmodium falsiparum* (Zahara K., et al, 2015).

Se aislaron dos nuevos poliacetilenos de *Bidens bipinnata*; tridecadieno-7,9-diino-1, 2,13-triol y 3-oxotetradecadieno-8,10-diino-14-hidroxil-1-O- β -D-glucopiranosido. Se examinó la citotoxicidad de estos compuestos en células HeLa, células humanas de hepatocarcinoma (HepG-2) y células de cáncer mamario MCF-7, *in vitro* mediante en ensayo de MTT. Los valores de IC₅₀ de los compuestos sobre las líneas celulares, estaban por encima de los 100 μ M, por lo que no se consideran como efectivos (Wuang X., et al, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Las personas que viven con DM tienen un riesgo mayor de morbilidad y mortalidad que la población en general. La prevalencia global de diabetes en adultos ha ido incrementando en las últimas décadas. En 1964 se estimaba que 30 millones de personas padecían de esta enfermedad. 40 años después la organización mundial de la salud estimaba que había 171 millones de personas viviendo con diabetes y para el año 2013 había alrededor de 382 millones de personas diabéticas (Ogurtsova 2017). También se prevé que para el año 2035 existirán aproximadamente 592 millones de personas con esta enfermedad (Guariguata 2014). La American Diabetes Association y de la European Association for the Study of Diabetes publicó en los años 2012, 2013 y 2014 una guía sobre el tratamiento de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2, las 3 destacan la trascendencia de tomar en cuenta las opiniones de los pacientes, la importancia de aplicar modificaciones del estilo de vida para un buen control de la enfermedad y marcan como primer fármaco a utilizar la metformina, a la que se añaden otros agentes hipoglucemiantes en caso de no obtener los objetivos marcados (Mediavilla 2014). Sin embargo, los fármacos utilizados actualmente no se ha logrado un control de la enfermedad y por lo tanto un incremento del número de casos que se presentan año con año; aunado a los efectos secundarios que producen dichos tratamientos y sus elevados costos. La medicina complementaria y alternativa (CAM) puede ser una opción viable para reducir la prevalencia de la DM a nivel mundial. En estudios recientes se ha comprobado que aproximadamente el 46.1 % de pacientes diabéticos utilizan CAM. La práctica más recurrente en estas personas es el uso de la medicina herbal, siendo las plantas de uso más común el comino negro (26.6 %), canela (23.3 %) y hoja de olivo (12.5 %). En base a lo antes expuesto, la búsqueda de nuevos agentes antidiabéticos de origen natural tiene una gran importancia a nivel mundial, en este trabajo evaluó *in vitro* 3 plantas para el control de la DM.

5. HIPÓTESIS

Los extractos de las plantas en estudio poseen compuestos con actividad antidiabética *in vitro*.

6. OBJETIVO DEL TRABAJO

6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antidiabética *in vitro* de los extractos etanólicos de las plantas en estudio y separar la fracción activa del extracto o extractos activos.

6.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos etanólicos de las plantas en estudio por soxhlet.
- Determinar la capacidad antidiabética de los extractos vegetales mediante técnicas *in vitro*.
- Determinar la capacidad anti radical de los extractos en estudio
- Fraccionar los extractos con actividad antidiabética.
- Determinar la capacidad antidiabética de las fracciones de los extractos activos mediante técnicas *in vitro*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Estrategia general

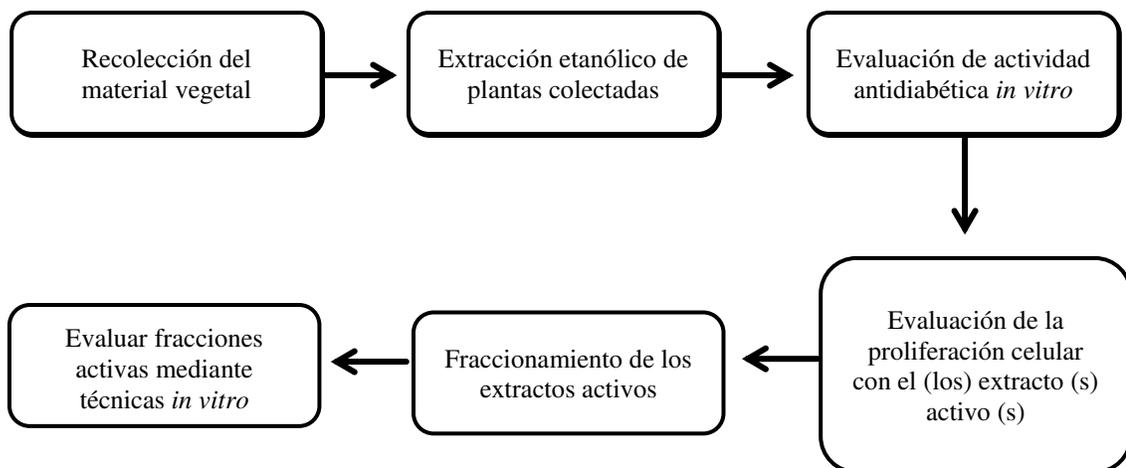


Figura 4. Estrategia general de la metodología seguida para el desarrollo del presente trabajo

7.2 Colecta del material vegetal

Se colectó la parte aérea de *Clidemia submontana* y *Cyathea princeps* en San Gabriel Mixtepec y *Bidens sp.* en Capulalpam de Méndez, las tres especies en el estado de Oaxaca, México. *Clidemia submontana* fue identificada por el Biol. Jesús Ricardo de Santiago Gómez, Facultad de Ciencias, UNAM. *Cyathea prínceps* y *Bidens sp.* fueron identificadas por el Dr. Marco Antonio Guzmán, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

7.3 Preparación de los extractos

Las plantas fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente. Se realizaron extracciones con etanol por el método de soxhelt (PYREX) por 48 h y se eliminó el disolvente a presión reducida con ayuda de un rota evaporador (YAMATO RE 200). Se determinó el rendimiento de la extracción para cada planta mediante de la siguiente ecuación:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso obtenido}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Dónde:

Peso obtenido = peso obtenido del material vegetal después la extracción

Peso inicial = peso del material vegetal antes de la extracción.

Los extractos se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso

7.4 Actividad inhibitoria de α -amilasa.

Se evaluó la inhibición de la enzima α -amilasa por parte de los extractos etanólicos de *C. submontana*, *C. prínceps* y *Bidens sp*, esto por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con algunas modificaciones. Los extractos se aplicaron como tratamientos a diferentes concentraciones usando como vehículo un buffer de fosfato de sodio 20 mM con 6.7 mM de cloruro de sodio y 2 % de etanol, a pH 6.9, las concentraciones utilizadas para la prueba fueron de 62.5, 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Además, el extracto de *C. submontana* se probó a 25, 50, 75, 100 y 125 $\mu\text{g/mL}$. La enzima α -amilasa utilizada (SIGMA ALDRICH #A9857-250KU) se preparó a una concentración de 0.5 U/mL con el mismo buffer como vehículo. El sustrato de la enzima fue una suspensión de almidón al 0.5 % en buffer de fosfato. Como control positivo se utilizó el fármaco acarbosa (SIGMA ALDRICH # PHR1253) a diferentes concentraciones (312.5, 625, 1250, 2500 y 5000 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizó una solución de DNS como indicador de actividad enzimática (SIGMA ALDRICH #D0550); a una concentración de 96 mM. El control negativo fue el Buffer de fosfato como tratamiento, este es llamado control de actividad.

En tubos cónicos de 1.5 mL se colocaron 50 μL de las sustancias a evaluar. Tratamiento 1: diferentes concentraciones de *C. submontana*, tratamiento 2: diferentes concentraciones *C. prínceps*, tratamiento 3: diferentes concentraciones del extracto de *Bidens sp*. A los tratamientos antes mencionados se les adicionaron 50 μL de la suspensión enzimática de α -amilasa, se incubaron a 37° C por 10 min, para iniciar la reacción se adicionó inmediatamente 50 μL del sustrato y se incubó a 37° C por 15 min, la reacción se detuvo adicionando 50 μL de DNS y calentando en un baño de agua a 95 °C por 5 min; se

enfriaron los tubos a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a 540 nm. En los tubos que no se presentó actividad inhibitoria, se observan con un color anaranjado, y los que presenten actividad se observa un color amarillo. Las absorbancias se utilizan para calcular el porcentaje de inhibición de cada tratamiento comparado con el control de actividad (100% de actividad), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs control de actividad} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control de actividad}} \times 100$$

Dónde:

Abs muestra: Es la absorción de luz del producto de reacción enzima-sustrato en presencia de los tratamientos o control negativo según sea el caso.

Abs control de actividad: Es la absorción de luz del producto de reacción enzima-sustrato en presencia de buffer de fosfato como tratamiento.

Los porcentajes de inhibición se utilizaron para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) con ayuda del paquete estadístico SPSS v.20. CI₅₀ es la cantidad de tratamiento necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (Alonso et al. 2015; Nyambe et al. 2015; Liu et al. 2014; Dehghan et al. 2015).

7.5 Actividad inhibitoria de α -glucosidasa.

Se evaluó la inhibición de la enzima α -glucosidasa (SIGMA ALDRICH # G5003-100UN) cuando ésta se encontraba en presencia de distintos tratamientos; por el método de pNPG (*p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, SIGMA ALDRICH #N1377-1G) con algunas modificaciones. Los extractos se aplicaron como tratamientos a diferentes concentraciones (62.5, 125, 250, 500 y 1000 μ g/mL) usando como vehículo un buffer de fosfatos de sodio 20 mM con 6.7 mM de cloruro de sodio y 2% de etanol, a pH 6.9. Además, el extracto de *C. submontana* se evaluó a 1, 2, 3, 4 y 5 μ g/mL. Las fracciones obtenidas se aplicaron como tratamiento a una misma concentración de 100 μ g/mL. La suspensión enzimática utilizada se preparó a una concentración de 0.2 U/mL usando buffer de fosfato como vehículo. El sustrato e indicador de la reacción enzimática fue

una suspensión de pNPG (2 mM) en buffer de fosfato. Como control positivo se utilizó el fármaco acarbosa (SIGMA ALDRICH # PHR1253) a diferentes concentraciones (62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL). El control negativo fue el Buffer de fosfatos como tratamiento, este es denominado control de actividad.

En una microplaca de 96 pozos se mezclaron 25 µL de las sustancias a evaluar. Tratamiento 1: diferentes concentraciones de *C. submontana*, tratamiento 2: diferentes concentraciones *C. prínceps*, tratamiento 3: diferentes concentraciones del extracto de *Bidens sp.*; A los tratamientos antes mencionados se les adicionaron 25 µL de la suspensión enzimática y se incubó a 37° C por 15 min, inmediatamente después se agregaron 50 µL del pNPG y se incubó a 37° C por 10 min, la reacción se detiene adicionando 50 µL de carbonato de sodio (0.2M). Finalmente se midió la densidad óptica a 405 nm. Las absorbancias se utilizan para calcular el porcentaje de inhibición de cada tratamiento comparado con el control de actividad (100% de actividad), aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs control de actividad} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control de actividad}} \times 100$$

Dónde:

Abs muestra: Es la absorción de luz del producto de reacción enzima-sustrato en presencia del extracto, acarbosa o control negativo según sea el caso.

Abs control: Es la absorción de luz del producto de reacción enzima-sustrato en presencia del buffer de fosfato como tratamiento.

Los porcentajes de inhibición se utilizaron para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) con ayuda del paquete estadístico SPSS v.20. CI₅₀ es la cantidad de tratamiento necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática (Gao et al. 2008; Li et al. 2017; Ali et al. 2017; Islam et al. 2016).

7.6 Preparación del cultivo celular y diferenciación de adipocitos.

Se utilizó la línea celular de preadipocitos murinos 3T3-L1. Para su propagación se usó el medio MP (DMEM adicionado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB)), se incubó a 37° C a una atmosfera con 5 % de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 90 %. Para la diferenciación de adipocitos se utilizó una confluencia del 100 %, a las 48 h (designado como día 0) se aplicó medio de diferenciación (MD = DMEM con 10 % de SFB, 1 µM de dexametasona, 0.5 mM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine y 10 µg/mL de insulina, todos marca Santa Cruz Biotechnology). Se incubó por 48 h más (día 2), se retiró el medio de diferenciación y se reemplazó con medio de maduración de adipocitos (MM= DMEM con 10 % de SFB e insulina a 10 µg/mL) cada 48 h hasta la maduración de los adipocitos, 9-11 d, ésta se confirmó con la observación de la morfología típica de un adipocito al microscopio (Kong et al. 2011; Chaiittianan et al. 2016; Tan et al. 2016).

7.7 Expresión de PPAR γ en adipocitos.

El estudio se realizó en la línea celular 3T3-L1 diferenciados, siguiendo la metodología antes descrita, utilizando micro placas de cultivo de 6 pozos con un inóculo de 100,000 células por pozo en un volumen final de 2 mL con el medio de cultivo correspondiente. La diferenciación de adipocitos se observó al día 10, se reemplazó el medio (MM) por: Tratamiento 1: DMEM con etanol a 0.1 % (CE: control de expresión); Tratamiento 2: MM adicionado con 1 µM de Rosiglitazona (control positivo, Santa Cruz Biotechnology); Tratamiento 3: MM adicionado con extracto de *C. submontana* (40 µg/mL), Tratamiento 4: MM adicionado con extracto de *C. princeps* (40 µg/mL), Tratamiento 5: MM adicionado con extracto de *Bidens sp* (40 µg/mL) y Tratamiento 6: únicamente con MM (control negativo), para observar el efecto del medio. Después de 24 h de la aplicación de los tratamientos se realizó la extracción de RNA total, la retrotranscripción (cDNA) y PCR en tiempo real para determinar el efecto en la expresión del mRNA (Chen et al. 2017; Luz et al. 2018; Jang 2017; Zeng et al. 2018).

El aislamiento del RNA total de los adipocitos tratados se realizó con un kit de extracción de SV Total RNA Isolation System #Z3100, PROMEGA (siguiendo las instrucciones del

fabricante) y el RNA se almaceno a -80°C hasta su uso. El análisis de integridad, pureza y cuantificación del RNA total se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y con un NANODROP 8000 Spectrophotometer, Thermo Scientific.

La síntesis del cDNA se realizó con el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System #A3800 de PROMEGA a partir de 500 ng del RNA aislado. El producto de la retro transcripción (cDNA) se almacenó a -20°C hasta su uso.

El análisis de expresión del mRNA de PPAR γ se llevó a cabo usando un equipo LightCycler 480 II de Roche, usando 50 ng de cDNA, 0.5 μM de los iniciadores, 12.5 μL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) #K0251 de Thermo Scientific y la cantidad de agua libre de nucleasas adecuada para tener un volumen final de 25 μL . Se utilizó 36B4 como gen de referencia (Zhang et al. 2016; Akamine et al. 2007; Biederman et al. 2004; Thompson et al. 2004). La secuencia de los iniciadores utilizados es: PPAR γ forward 5'-CTGGCCTCCCTGATGAATAAAG-3', reverse 5'-AGGCTCCATAAAGTCACCAAAG-3', 36B4 forward 5'-ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3' y reverse 5'-TCAATGGTGCCTCTGGAGATT-3'. La expresión relativa de mRNA fue calculada en base al método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

7.8 Acumulación de lípidos en adipocitos.

La acumulación de lípidos se evaluó sobre la línea celular 3T3-L1 usando Red Oil O (Santa Cruz Biotechnology), con modificaciones al método descrito por otros autores. Solamente se continuo el estudio con *C. submontana* por ser el extracto con con mayor actividad en las etapas anteriores. Se inició estimulando la diferenciación celular tal y como se describe anteriormente, se utilizaron micro placas de cultivo de 24 pozos con un inóculo de 30,000 células por pozo llevando a un volumen final de 500 μL con medio cultivo. A las 48 h post-confluencia (día 0) se aplicó el medio de diferenciación (MD) para estimular la adipogénesis, adicionado con las sustancias a evaluar. Tratamiento 1: MD (control de referencia), Tratamiento 2: MD adicionado con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de *Clidemia submontana*, Tratamiento 3: MD adicionado con 1 μM de Rosiglitazona (control positivo). Posteriormente la micro placa se incubó por 48 h a las condiciones ya

establecidas, después de este periodo se reemplazó el MD por MM (día 2) y se incubó durante 8 d; se retira el medio de cultivo quedando la mono-capa de células, ésta se fijó con formalina al 10 % durante 1 h, se lavaron 2 veces con agua destilada, posteriormente se aplicó el colorante red oil O (0.5 % en isopropanol al 60 %) por 15 min a temperatura ambiente; las células se lavaron 3 veces con agua destilada, se extrajo el colorante del interior de las células con isopropanol al 100 %, después se leyó la densidad óptica a 540 nm (Siraj et al. 2015; Cheon et al. 2017; Kang et al. 2017; Kim et al. 2018;).

7.9 Ensayo de proliferación celular.

Se evaluó la proliferación celular con el método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Se utilizó la línea celular VERO (epitelio de riñón de mono) estas son ampliamente utilizadas en investigación para evaluar el efecto de sustancias químicas y toxinas en mamíferos (Ammerman et al. 2008). En una micro placa de 96 pozos se inocularon con 1×10^5 cél/pozo ajustando a un volumen final de 200 μ L con medio de cultivo (DMEM adicionado con 10 % de SFB), se incubó a 37° C a una atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 h hasta obtener una capa de 80 % de confluencia, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con una solución de buffer salino de fosfatos (PBS), posterior mente se adicionan las sustancias a evaluar. Tratamiento 1: Extracto de *C. submontana* a distintas concentraciones (62.5, 125, 250, 500 y 1000 μ g/mL), Tratamiento 2: DMEM con 1% de etanol como (control negativo), Tratamiento 3: células con medio de cultivo (como referencia de proliferación celular); Los tratamientos se incubaron por 24 h a las condiciones antes mencionadas, se agregaron 10 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada pozo, se incubó nuevamente por 4 h; se elimina el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS, se adicionaron 200 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO), posteriormente se mide la densidad óptica a 570 nm. Se determinó el porcentaje de proliferación celular con la siguiente formula:

$$\% \text{ de proliferacion celular} = \frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Donde Abs tratamiento es la absorción de luz por el producto de las células tratadas y Abs control es la absorción de luz el producto de las células usadas como referencia de proliferación celular.

Se calculó la IC₅₀ con los porcentajes de proliferación celular y con el apoyo del programa SPSS v.20 (Kling et al. 2014; Boncler et al. 2014].

7.10 Actividad anti radical: capacidad de captura de radical libre

La actividad anti radical de los extractos etanólicos de las plantas en estudio se realizó por el método de DPPH. En micro placas de 96 pozos se colocaron 100 µL de una solución de DPPH a 200 µM más 100 µL de los diferentes tratamientos: 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL para *C. submontana*, 200, 250, 300, 350 y 400 µg/mL para *C princeps*, 25, 50, 75, 100 y 125 µg/mL *Bidens sp.*, 4, 6, 8, 10 y 12 µg/mL de tocoferol como control positivo y el vehículo de los extractos como control negativo. Una vez completa la mezcla de reacción, la micro placa se mantuvo en oscuridad por 30 min para después medir la absorbancia a 517 nm en un equipo EPOCH (BIOTEK), con las absorbancias se determinaron porcentajes de captura del radical DPPH de cada tratamiento. Los resultados en porcentaje de captura se calculan a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs control de actividad} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control de actividad}} \times 100$$

Dónde:

Abs muestra: Es la absorción de luz del DPPH en presencia del extracto, tocoferol o control negativo según sea el caso.

Abs control: Es la absorción de luz del DPPH en presencia del vehículo como tratamiento.

Este valor se utilizó para calcular la concentración efectiva 50 (CE₅₀) que es la concentración de tratamiento necesaria para capturar el 50 % del radical libre; mediante

un análisis de regresión PROBIT y con la ayuda del programa estadístico SPSS v. 20 (Ohata M et al. 2016; Zhang X. et al. 2007; Tauchen J. et al. 2015).

7.11 Fraccionamiento del extracto relevante

Al extracto de *C. submontana* se fraccionó por medio de cromatografía en Columna de sílica gel (SIGMA ALDRICH Cat. 236799-1KG, 60 A, 60 – 100 mesh). El diámetro de la columna fue de 2.4 cm y se utilizaron 50 g de sílica gel. Se inició la cromatografía con hexano como eluyente, después una mezcla de gradientes de hexano/cloroformo (H/C) 9.5:0.5, 9:1, 8.5:1.5... hasta cloroformo, seguido de una mezcla de gradientes de cloroformo/metanol 9.5:0.5, 9:1, 8.5:1.5... hasta metanol. Se colectaron consecutivamente fracciones de 20 mL y estas fueron comparadas por cromatografía en capa delgada y observadas a luz visible, luz UV y reveladas con cloruro de cobalto; aquellas fracciones que presentaron un patrón de manchas similar se unieron; a estas se les determinó la actividad enzimática con la metodología descrita anteriormente e identificar la o las fracciones con el o los compuestos responsables de la actividad biológica (Waner y Bladt 1996).

7.12 Perfil fitoquímico de las plantas de estudio

Se realizaron pruebas químicas cualitativas a las fracciones f12, f18 y al extracto completo de *C. submontana* para determinar la presencia de algunas familias de compuestos fitoquímicos.

Prueba de para taninos: Se disolvió una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 en 1 mL de etanol, se le añadieron 5 gotas de cloruro férrico al 5% en etanol; la coloración verde oscura o negra será considerada como prueba positiva.

Prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenos: Primero se prepara el reactivo mezclando 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A una gota del reactivo se le añadió una muestra del extracto de *C.*

submontana, f12 y f18 disuelta en 1 mL de metanol, la aparición de un color azul o morado se consideró como prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpenos.

Prueba de NaOH para cumarinas: se disolvió una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 en una solución de hidróxido de sodio al 10%; la aparición de una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, se usó como criterio para considerar positiva la prueba.

Prueba de Shinoda para flavonoides: se disolvió una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 en 1 mL de metanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se tornó color rojo intenso, la prueba se consideró positiva.

Prueba de H₂SO₄ para quinonas: a una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 se le añadieron 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico. Para considerar como prueba positiva de quinonas, se observó un cambio a color rojo y se confirmó al añadir 2-3 gotas de hidrosulfito de sodio al 5% decolorando la solución y se regeneró el color añadiendo de 2-3 gotas de agua oxigenada al 30%.

Prueba de la Antrona para carbohidratos: en un tubo de ensaye se colocó una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 disuelta en agua, después se vertió por las paredes del tubo una solución de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado; la prueba fue positiva si en la interfase apareció un anillo azul-verde o violeta.

Prueba de Baljet para sesquiterpenlactonas: se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se preparó pesando un gramo de ácido pícrico y disolviendo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesaron 10 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Para la prueba se ponen una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 y se le adiciona 3 a 4 gotas del reactivo, se considera positiva si se presenta una coloración naranja o rojo oscuro.

Prueba de espuma para saponinas: en un tubo de ensaye se colocó una muestra del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 disuelta en 1 mL de agua, se agitó. Al formarse espuma abundante y permanecer así durante 15 min, la prueba se consideró positiva.

Prueba de Dragendorff para alcaloides: se colocó una pequeña cantidad del extracto de *C. submontana*, f12 y f18 disuelta en metanol y se añadieron una o dos gotas del reactivo de Dragendorff, al observarse un precipitado naranja la prueba se consideró positiva para la presencia de alcaloides.

7.13 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente (n=3). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (DE). Los valores de las medias de los tratamientos se compararon entre ellas y con los grupos control, con una significancia de 0.05. Los valores medios de las diferentes concentraciones de un extracto, así como las de los controles, se compararon con un análisis de varianza de 1 vía, con una significancia de 0.05 y cumpliendo con los requisitos necesarios; para asegurar que las concentraciones utilizadas fueran distintas entre ellas. Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico SPSS v.20.

8. RESULTADOS

8.1 Preparación de los extractos

En la tabla 1 se muestran los rendimientos obtenidos de las plantas en estudio.

Tabla 1. Rendimientos de extracción

	<i>Clidemia submontana</i>	<i>Cyathea princeps</i>	<i>Bidens sp.</i>
Rendimientos de extracción (% p/p)	4.1	7.5	7.5

8.2 Actividad inhibitoria de α -amilasa

En los tres extractos etanólicos completos se evaluaron solo a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ como prueba preliminar para determinar la CI_{50} de los extractos. Como se muestra en la figura 6, los extractos etanólicos de *C. prínceps* y de *Bidens sp* mostraron poca actividad a la concentración evaluada, a diferencia del extracto de *C. submontana* que presentó un resultado de $93.1 \% \pm 2.6 \%$ de inhibición de la enzima y el control positivo acarbossa inhibió un $55.6 \% \pm 3.2 \%$.

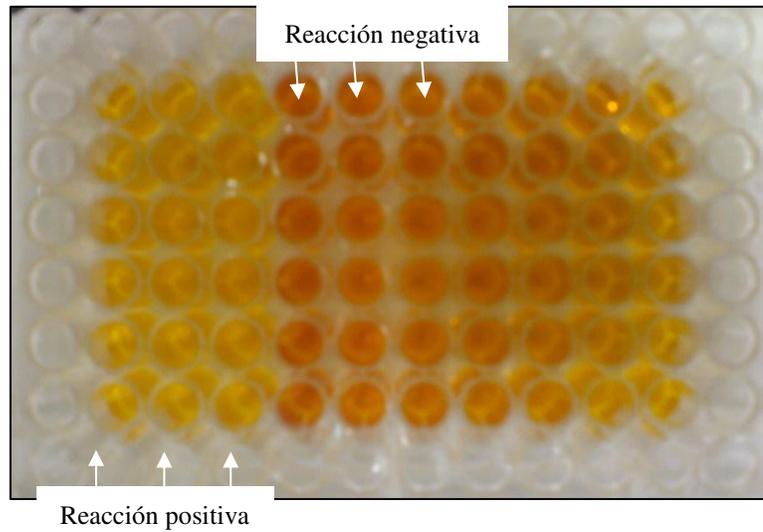


Figura 5. Prueba de inhibición de α -amilasa, se muestra un ejemplo de reacción positiva y una reacción negativa.

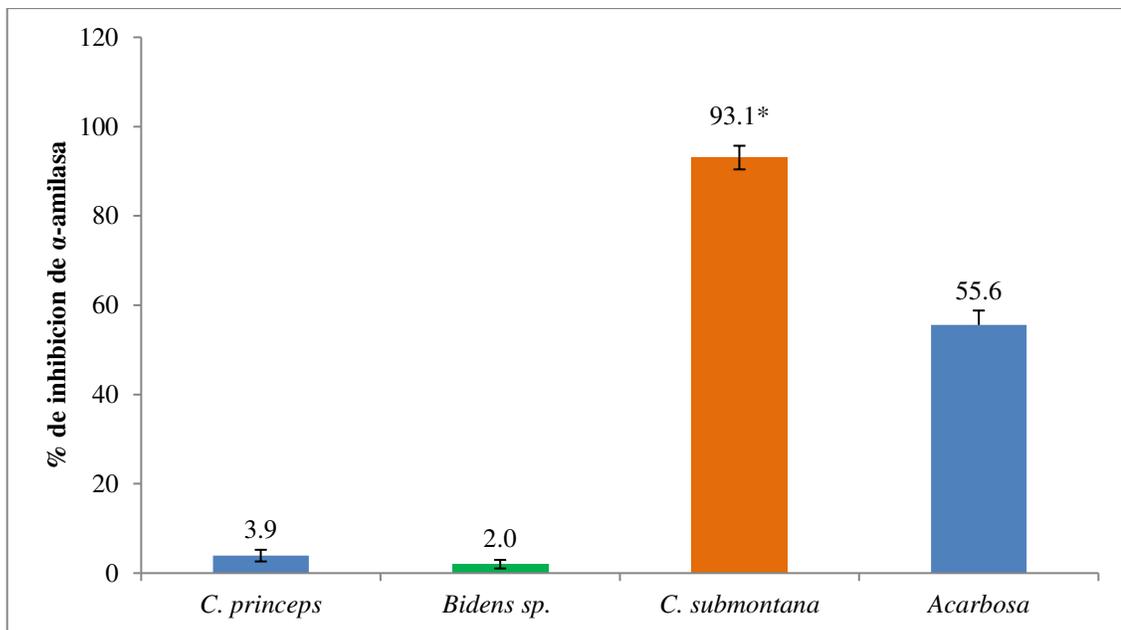


Figura 6. Efecto de los tres diferentes extractos etanólicos de las plantas en estudio y acarbosa (control positivo) sobre la actividad enzimática de α -amilasa, todos a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. * $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre el tratamiento y el control positivo (n=3).

El extracto de *C. submontana* se sometió a la misma prueba a las diferentes concentraciones citadas en la sección 3.3. Utilizando los porcentajes de inhibición, se comprobó que cada una de las concentraciones utilizadas eran estadísticamente diferentes

por medio de un análisis de varianza de 1 vía con un nivel de confianza del 95 %. A partir de estos se calculó la concentración de extracto necesaria para inhibir el 50 % de la actividad hidrolítica de la enzima (CI_{50}) sobre el almidón, con un valor de $28.2 \mu\text{g/mL} \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$ y para el control positivo acarbosa de $993.8 \mu\text{g/mL} \pm 57.1 \mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en la tabla 2.

8.3 Actividad inhibitoria de α -glucosidasa

En la evaluación de inhibición de α -glucosidasa sobre los tres extractos, se observó una actividad relevante para *C. submontana* a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 7.

Se muestran los resultados de la CI_{50} del extracto de *C. submontana* y el control positivo en la tabla 2.

Por lo antes descrito se decidió realizar un fraccionamiento del extracto de *C. submontana* para separar la fracción responsable de la actividad inhibitoria.

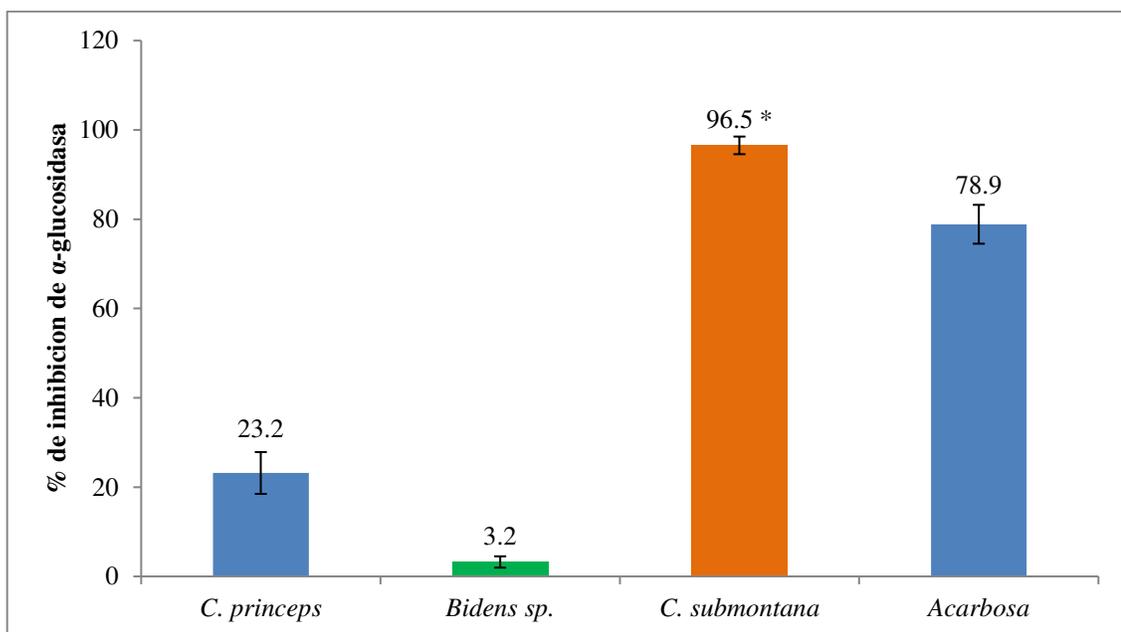


Figura 7. Efecto de los tres diferentes extractos etanolicos y acarbosa (control positivo) sobre la actividad enzimática de α – glucosidasa todos a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$. * $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre el tratamiento y el control positivo (n=3).

Tabla 2. Inhibición enzimática de extracto etanólico de *C. submontana* y acarbosa.

	CI ₅₀ de α -amilasa ($\mu\text{g/mL}$)	CI ₅₀ de α -glucosidasa ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. submontana</i>	28.2 \pm 2.1*	1.9 \pm 0.1 *
Acarbosa	993.8 \pm 57.1	331.0 \pm 72.0

\pm DE: Desviación estándar, * $P \leq 0.05$ diferencia significativa con la acarbosa (n=3).

8.4 Preparación del cultivo celular y diferenciación de adipocitos

La línea celular se propagó de manera adecuada para su diferenciación, en la cual se logró diferenciar los preadipocitos hasta células redondas con vacuolas de grasa en el interior, que corresponde a la morfología típica de un adipocito.

8.5 Expresión de PPAR γ en adipocitos

En la determinación del nivel de expresión del mRNA de PPAR γ en adipocitos maduros de ratón, el Grupo con el tratamiento 1 se utilizó como un control de expresión, los resultados de dicho tratamiento se utilizaron para normalizar los datos a un valor de 1, por lo tanto, los valores que se encuentren por encima de 1 indican una sobre-expresión o regulación positiva y por el contrario, cuando un tratamiento presenta valores de expresión menores que 1 entonces se considera como una regulación negativa o disminución en la expresión del gen en estudio. Como se puede observar en la figura 8, cuando los adipocitos fueron tratados con los extractos de *C. prínceps* y *Bidens sp*, los niveles de expresión incrementan poco en comparación con el control positivo rosiglitazona que además tiene una diferencia estadísticamente significativa tomando como referencia el control de

expresión. *C. submontana* mostró mayor actividad que el tratamiento con el fármaco, para estimular la expresión del gen en estudio.

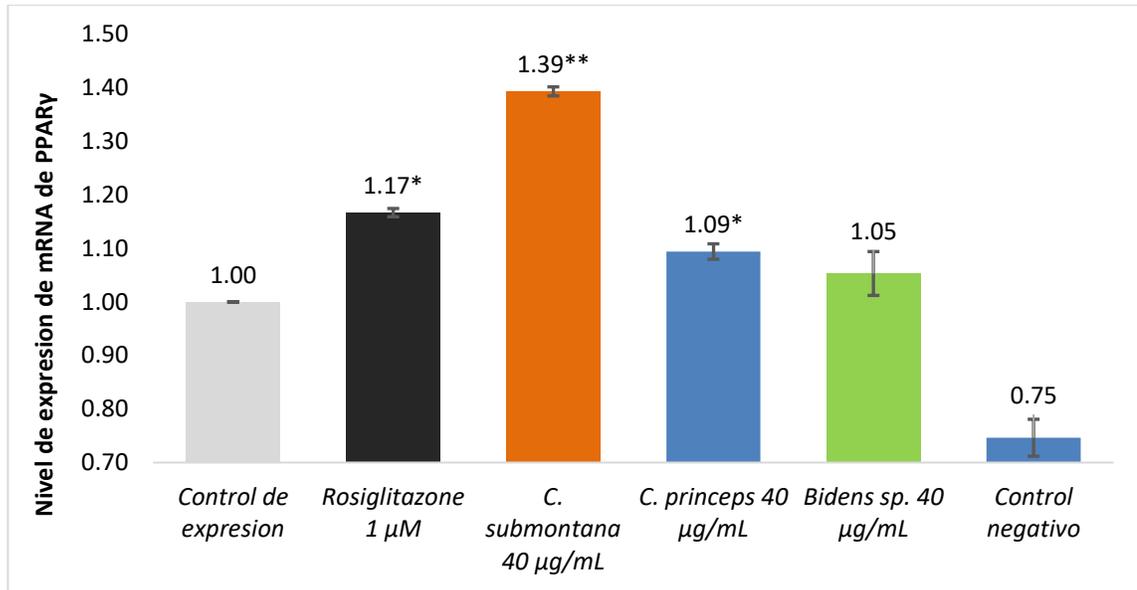


Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos de *C. submontana*, *C. princeps* y *Bidens sp* a 40 mg/mL y rosiglitazona a 1 μM sobre el nivel de expresión del mRNA de PPARγ en adipocitos murinos. * $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre el tratamiento y el control de expresión. ** $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre el tratamiento y el control positivo (fármaco Rosiglitazona).

Como se describió, el extracto de *C. submontana* es el único con actividad biológica relevante en la evaluación enzimática y en la expresión del gen PPARγ, por lo que se decidió trabajar únicamente con este extracto para las pruebas posteriores.

8.6 Acumulación de lípidos en adipocitos

En la prueba de acumulación de lípidos durante la adipogénesis con los diferentes tratamientos, el Grupo 1 (MD) presentó una absorbancia de 0.137, dicho valor representó los lípidos acumulados durante el proceso de adipogénesis inducida con un medio de diferenciación ya establecido; el Grupo 2 (MD + *C. submontana* a 40 μg/mL) mostró una

absorbancia de 0.184; el Grupo 3 (MD + rosigitazona 1 μ M) mostró un valor de absorbancia de 0.177. Si se toma el valor de absorbancia del grupo 1 como el 100 % de acumulación de lípidos, cuando se adiciona extracto de *C. submontana* al medio de diferenciación, la acumulación de lípidos se ve incrementada en un 34.57 % respecto al Grupo 1. Al igual que el extracto de *C. submontana*, la adición del fármaco rosigitazona al medio de diferenciación provoca un aumento del 29.55 % respecto al Grupo 1. El incremento de absorbancias del extracto y del fármaco es significativo usando como referencia MD; *C. submontana* presentó un comportamiento muy similar al de la rosigitazona cuya diferencia entre ambos resultados no es significativa (figura 9). En la figura 10 se presentan imágenes del cultivo de adipocitos teñidos y expuestos a los diferentes tratamientos, en dicha figura se observa la cantidad de colorante que se acumula en el interior de las células es mayor en aquellos cultivos a los que se les aplicaron *C. submontana* y rosigitazona; que en el cultivo donde solo se utilizó el medio de diferenciación.

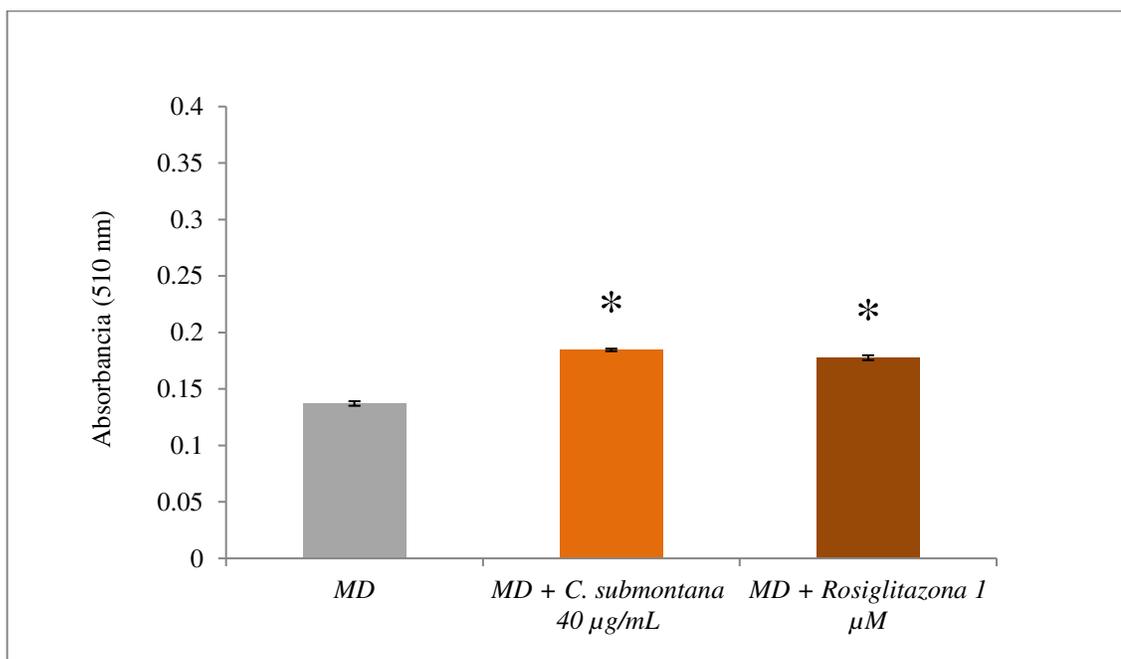


Figura 9. Efecto de *C. submontana* (40 mg/mL) y rosigitazona (1 μ M) en la acumulación de lípidos durante la adipogénesis sobre células 3T3-L1. Los tratamientos se aplicaron al día 0 de diferenciación y se retiraron al día 2. La tinción se realizó al día 10 cuando los adipocitos alcanzaron su madurez. * $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre el tratamiento y el MD (n=3).

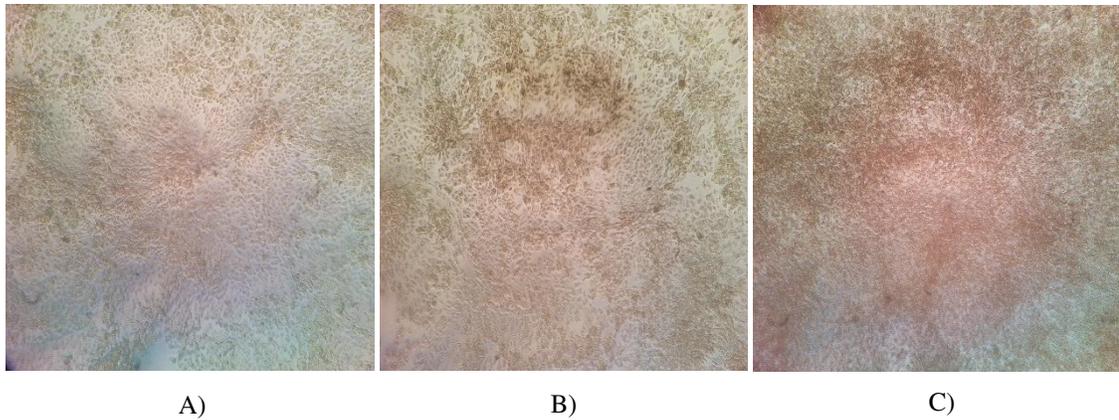


Figura 10. Tinción de adipocitos murinos (línea 3T3-L1) con Oil red O. Las células fueron tratadas con A) MD; B) MD + rosiglitazona (1 μ M); C) MD + *C. submontana* (40 mg/mL), la exposición fue solo durante el día 0 y 1 de diferenciación. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de campo claro, utilizando el objetivo 25x.

8.7 Ensayo de proliferación celular

En la determinación de la proliferación sobre la línea celular VERO, se obtuvo una CI_{50} de $314.54 \pm 45.40 \mu\text{g/mL}$ para *C. submontana*. Los porcentajes de proliferación y la CI_{50} se muestran en la figura 11.

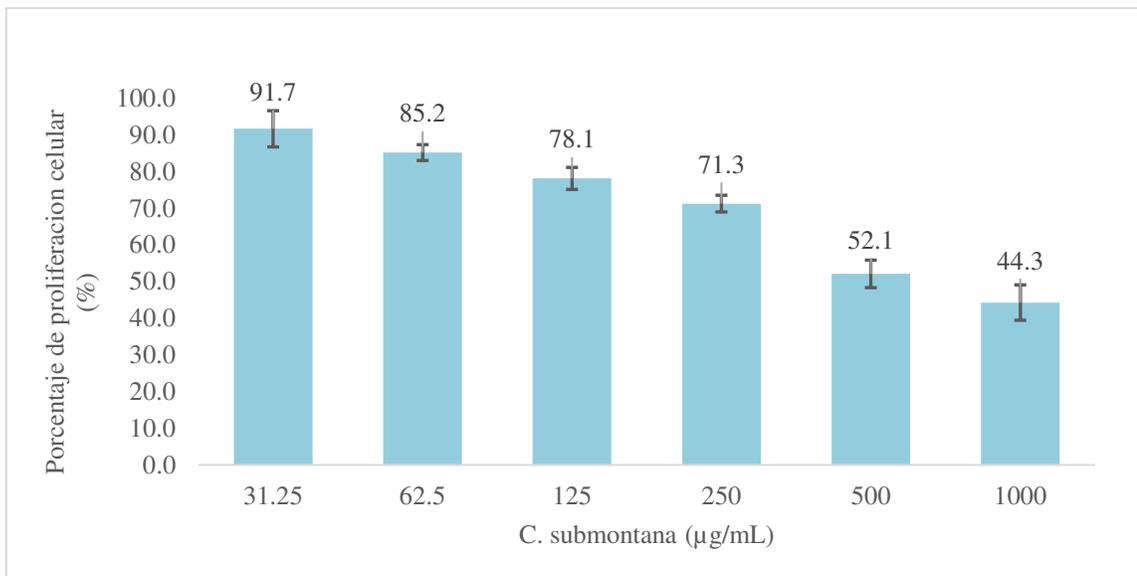


Figura 11. Efecto de la concentración de *C. submontana* en la proliferación de células VERO (n=3).

8.8 Actividad anti radical: capacidad de captura de radical libre

En la tabla 3 se muestran los resultados de esta prueba, en la cual se puede observar que los extractos de las plantas en estudio tienen una CE_{50} mayor a la del tocoferol. De los tres extractos el de *C. submontana* es el que se muestra con una mayor capacidad de captura, pero al igual que el resto sigue siendo estadísticamente diferente al control positivo.

Tabla 3. Capacidad de captura de DPPH de los extractos etanólicos de las plantas en estudio y el tocoferol

Muestra	CE_{50} μ g/mL
<i>C. submontana</i>	21.52 \pm 1.75 *
<i>Bidens sp.</i>	66.44 \pm 4.80 *
<i>C. princeps</i>	252.05 \pm 8.84 *
Tocoferol	9.44 \pm 0.07

\pm DE: Desviación estadística, * $P \leq 0.05$ diferencia significativa entre

8.9 Fraccionamiento del extracto de *C. submontana*

El extracto con mayor actividad biológica fue *C. submontana*, este se fraccionó en una columna cromatográfica de sílica gel (figura 12) y como resultado se obtuvieron un total de 97 fracciones, a las cuales se les corrió una cromatografía en capa delgada, se unieron aquellas que mostraron un patrón similar, quedando 18 fracciones (f1, f2, f3...f18). A las 18 fracciones se les evaluó la inhibición de α -glucosidasa a una concentración de 100 μ g/mL, la fracción f12 con cloroformo/hexano (C/H 0.5:9.5) y la f18 con metanol inhibieron la actividad enzimática en un 100 % (figura 13).

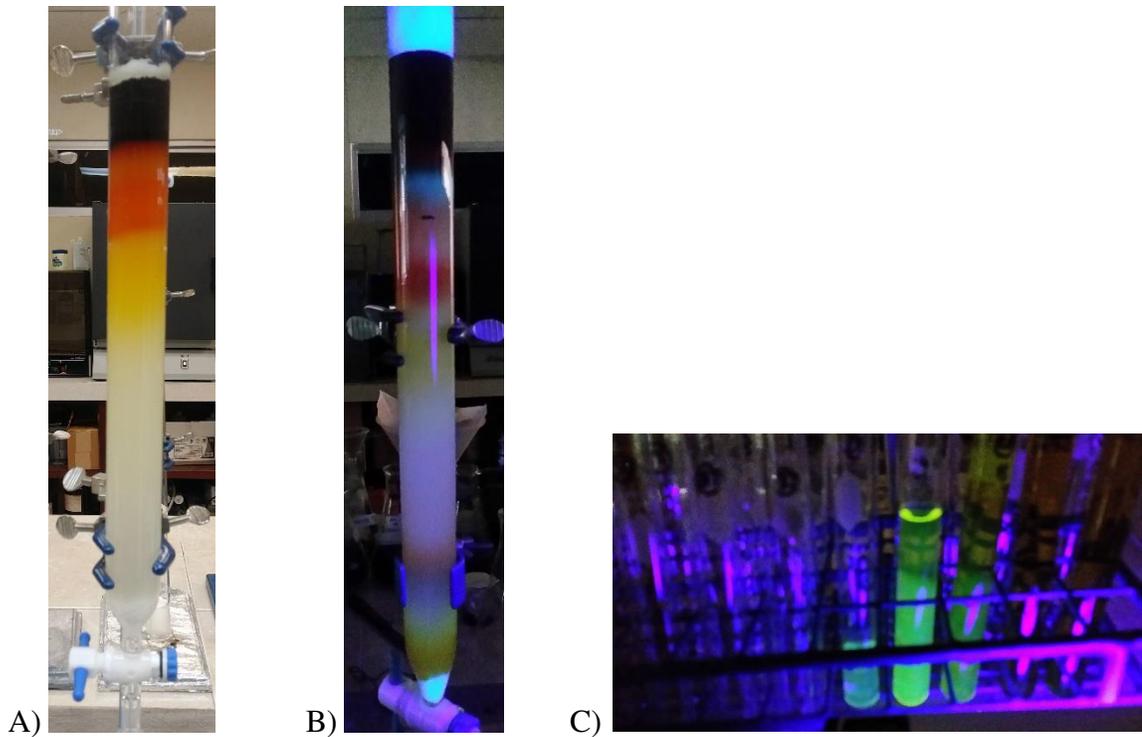


Figura 12. Elución del extracto de *C. submontana* en cromatografía en columna de sílica gel. A) observación durante la elución en el sistema Hexano. B) observación con luz ultravioleta durante la elución con el sistema H/C 6:4. C) fracciones colectadas en tubos de ensayo.

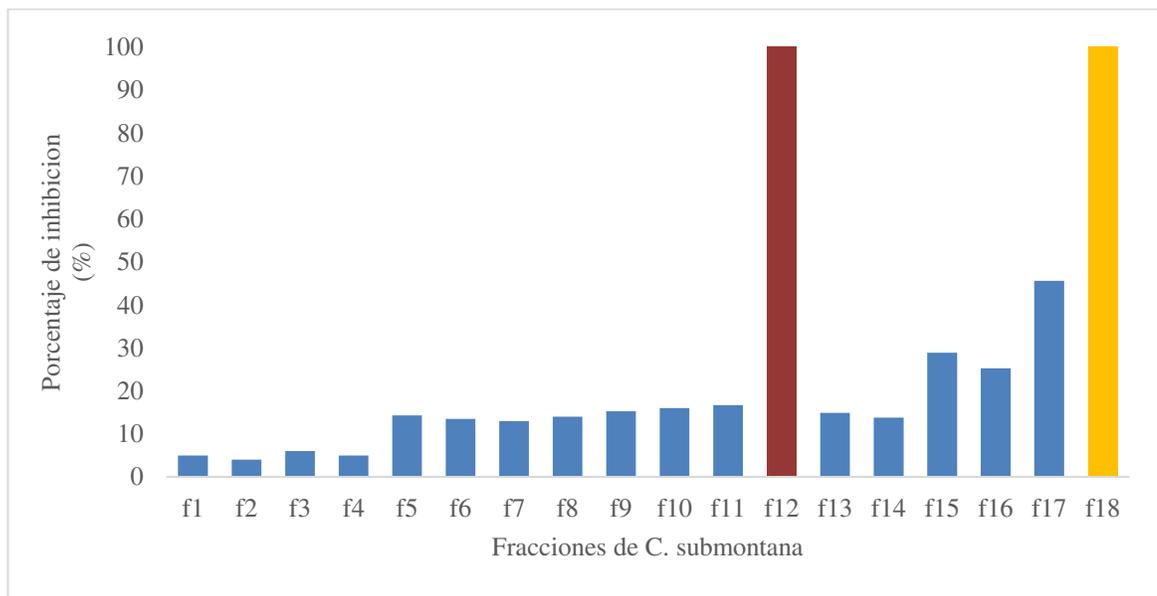


Figura 13. Porcentaje de inhibición de α -glucosidasa de las diferentes fracciones de *C. submontana* a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel (n=3).

8.10 Perfil fitoquímico de las plantas en estudio

En la tabla 3 se puede observar que el extracto completo dio positivo para la presencia de taninos, flavonoides, quinonas, carbohidratos y sesquiterpenlactonas; la fracción f12 es similar al extracto con excepción en la f12 da negativo para taninos y sesquiterpenlactonas y positivo en la prueba de esteroides. En la fracción f18 muestra la presencia de cumarinas y ausencia de flavonoides y quinonas.

Tabla 4. Perfil fitoquímico de del extracto metanólico de *C. submontana* y las fracciones bioactivas.

	Extracto de <i>C. submontana</i>	f12	f18
Taninos	+	-	+
Esteroides/triterpenos	-	Esteroides +	-
Cumarinas	-	-	+
Flavonoides	+	+	-
Quinonas	+	+	-
Carbohidratos	+	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	-	+
Saponinas	-	-	-
Alcaloides	-	-	-

(+) Presencia en la prueba; (-) Ausencia en la prueba

9. DISCUSIÓN

El incremento de la glucosa postprandial es un gran problema en pacientes diabéticos y se considera de gran importancia contrarrestar este efecto después del consumo de alimentos con la finalidad de mantener bajos los niveles de glicemia en personas con este padecimiento. Esto se podría alcanzar inhibiendo la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa presente en el tracto gastrointestinal. Existen fármacos inhibidores de estas enzimas, como acarbosa, miglitol, voglibosa, nojirimicina y 1-deoxinojirimicina, que permiten disminuir la absorción de carbohidratos (Ganiyu Oboh, 2016; Consoli et al. 2018; Zaharudin et al. 2018). El extracto etanólico completo de *C. submontana* inhibe la actividad de α -amilasa *in vitro* en un 50 % a una concentración menor que el fármaco acarbosa; los extractos etanólicos de *C. prínceps* y *Bidens sp* no tienen la capacidad de inhibir las enzimas utilizadas. La enzima α -amilasa salival y pancreática hidrolizan las moléculas de almidón para producir oligosacáridos y disacáridos, por lo que inhibir esta enzima impediría que se lleve a cabo la asimilación de los carbohidratos (Ortiz M. et al 2016). La enzima α -glucosidasa hidroliza los disacáridos y oligosacáridos hasta obtener monosacáridos como la glucosa, lo que provoca un incremento en la concentración de glucosa ya que únicamente los monosacáridos pueden ser absorbidos en el lumen intestinal y posteriormente ser transportados en la circulación sanguínea (De et al. 2013; Kumar et al. 2017; Rynjah et al. 2017). La actividad hidrolítica de carbohidratos se inhibe cuando se aplica *C. submontana* como tratamiento en experimentos *in vitro*, por lo tanto, se presume la presencia de moléculas con posible efecto anti-hiperglucémico en un modelo *in vivo*, estos compuestos podrían ser una alternativa a los tratamientos existentes o como coadyuvante a los mismos, los cuales presentan efectos secundarios no deseados.

PPAR γ es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción, éste mejora la sensibilidad a la insulina por parte de las células e incrementa la utilización de glucosa (Thiruchelvam et al. 2014; Yoshioka et al. 2018; Skochko y Kaidashev 2017). Un conjunto de diversas moléculas tanto naturales como sintéticas, son clasificadas como ligandos que pueden inducir la activación y expresión de PPAR γ . Estos ligandos incluyen nutrientes, ligandos endógenos y fármacos (Lewis et al. 2010); algunos de estos fármacos

son las tiazolidinedionas (TZD), por ejemplo, la rosiglitazona que a pesar de reducir significativamente la resistencia a la insulina y lograr que la concentración de glucosa en sangre de pacientes diabéticos disminuya; este fármaco produce diversos efectos no deseados al grado de ser prohibido en los Estados Unidos. *C. submontana* mostró tener una mayor capacidad que la rosiglitazona de incrementar la expresión del gen de PPAR α , lo que podría derivar en un cambio en el metabolismo de carbohidratos y lípidos y a su vez en un efecto positivo en la resistencia a la insulina (RI). PPAR α afecta el proceso inflamatorio y a la cascada de señalización de la insulina por varios mecanismos, en uno de ellos PPAR γ puede intervenir disminuyendo la producción de mediadores pro-inflamatorios, disminuyendo las actividades transcripcionales de NF-kB y regulando positivamente las proteínas sustrato del receptor de insulina, induciendo la expresión del gen de los acarreadores de glucosa GLUT4, la actividad tirosin-quinasa de los receptores de insulina y reducción en la expresión de mRNA de IL-6 (Aleman al. 2016; Zand et al. 2017).

El tejido adiposo blanco (TAB) tradicionalmente ha sido considerado un tejido poco activo, pero hoy se sabe que es altamente dinámico sintetizando y secretando numerosos factores, no solo lipídicos sino también proteicos, que intervienen en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y metabólicos. Este tejido secreta un número considerable de factores proteicos (se han descrito más de 50) que se designan bajo la denominación común de adipocinas, las cuales son muy diversas en cuanto a su estructura química y función fisiológica. Es bien conocido que PPAR α es el regulador maestro de la diferenciación adipocitaria, y éste es inducido durante la adipogénesis (Wang et al. 2014; Klingelutz et al. 2018; Hung et al 2018; Hasegawa t al. 2018). La activación de PPAR α en adipocitos garantiza un balance y adecuada secreción de adipocinas, como la adiponectina y leptina; que son mediadoras en la acción de la insulina en tejidos periféricos; lo que provoca una sensibilidad a la insulina en todo el organismo (Janani y Ranjitha 2015; Nie et al. 2018; Gundala et al. 2018). Por lo antes mencionado los productos que estimulen un incremento en la adipogénesis y en la producción de PPAR α , son candidatos para inducir el correcto funcionamiento y reconocimiento de la insulina, considerándolos como posibles agentes antidiabéticos. Como se muestra en los resultados,

el extracto de *C. submontana* estimuló el almacén de lípidos durante el proceso de diferenciación celular hasta adipocitos en la línea celular 3T3- L1. Estos resultados son consistentes si se relacionan con el incremento *in vitro* de la expresión del gen de PPAR α .

Los resultados sugieren la presencia de metabolitos secundarios en *C. submontana* que podrían estar involucrados en la regulación positiva del gen de PPAR α . En algunas especies de la familia *Melastomataceae* se ha confirmado la presencia de quercetina, kaemferol y catequina; moléculas aisladas de distintos géneros vegetales que pueden actuar como ligandos de PPAR α al igual que la rosiglitazona (Wang et al. 2014). Al ser *C. submontana* un miembro de esta familia podemos relacionar la presencia de moléculas como las ya mencionadas, con la actividad *in vitro* que se obtuvo en este trabajo.

Como ya se ha mencionado, en los recursos naturales se pueden encontrar alternativas para hacer frente a diversas enfermedades. En las diferentes familias de los organismos vegetales, se pueden encontrar metabolitos secundarios que al ingresar al organismo humano pueden provocar algunos cambios tanto positivos como negativos. En la literatura se mencionan diversos metabolitos vegetales, tales como taninos, flavonas, triterpenóides, esteroides, saponinas y alcaloides; los cuales mediante estudios científicos se ha comprobado que poseen la capacidad de inhibir enzimas involucradas con DM, así como lograr disminuir los niveles de glucosa en sangre de diferentes modelos de estudio mediante diversos mecanismos (Ortiz M. et al 2016). Se determinó mediante pruebas rápidas la presencia de compuestos que pertenecen a algunos de los grupos ya mencionados con actividad antidiabética, tanto en el extracto de *C. submontana*, en f12 y f18. Se ha demostrado que en otras especies del género *Clidemia* existen moléculas con actividad biológica antibacteriana y antioxidante.

Los organismos vivos están constantemente expuestos a la oxidación por productos endógenos o exógenos como la radiación ultra violeta y otras radiaciones de alta energía, permitiendo la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Brewer 2011; Wei et al. 2018; Bhansali et al. 2017). Bajo condiciones normales, un incremento en los niveles de glucosa en sangre provoca una mayor secreción de insulina y con esto una regulación positiva de los acarreadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) para que la glucosa sea metabolizada. Pero si los niveles de insulina están crónicamente elevados, la expresión de

GLUT 4 se disminuye. Las ROS son un factor importante en el desarrollo de la Resistencia a la insulina. Los altos niveles de insulina perturban algunas señalizaciones en el metabolismo a través de la NADPH oxidasa 4 (NOX4), una poderosa enzima oxidativa que produce ROS (Walton 2017; Yan et al. 2017; Kido et al. 2017). El uso de fuentes naturales de antioxidantes es cada vez más frecuente, por lo que los estudios de investigación sobre nuevas moléculas con una actividad antioxidante relevante son cada vez más. Los resultados de este trabajo revelan que el extracto etanólico de *C. submontana* posee una buena capacidad de atrapamiento de radicales libres. En otros trabajos ya se ha evaluado la capacidad de captura de radicales libres de extractos de especies del género *Clidemia*, por ejemplo; extractos etanólicos (etanol 80%) de *C. hirta* cultivada en laboratorio, mostró buenos resultados en el ensayo de captura del radical libre DPPH (Lopez et al. 2016). Otro trabajo presenta resultados similares para un extracto acuoso de fruto de *C. rubra* (Gordon et al. 2011). Como ya se mencionó, de las tres plantas utilizadas en este trabajo el extracto de *C. submontana* fue el de mayor relevancia ya que se obtuvo una CE₅₀ baja de esta planta en comparación con *Bidens sp* y *C. princeps*. La presencia de especies reactivas del oxígeno en el organismo a concentraciones que no se pueden controlar de manera natural, provocará un incremento de la Resistencia a la insulina, además del daño directo a diversos órganos y moléculas del cuerpo; por todo esto, los productos antioxidantes podrían ayudar a prevenir o combatir la diabetes mellitus (Walton 2017; Xu et al. 2018).

C. submontana mostró citotoxicidad en células VERO a una concentración mayor que la necesaria para incrementar la expresión de PPAR α , incrementar la acumulación de lípidos, inhibir α -amilasa y α -glucosidasa e inclusive a concentraciones mayores que la CE₅₀ antioxidante. Existen reportes de la existencia de taninos tóxicos en *C. hirta* que pueden provocar hepatotoxicidad. También se demostró que la abundancia de estos taninos hidrolizables era de 19 % (Murdiati et al. 1990). Sin embargo, esta información no es suficiente para considerar peligroso el uso de *C. submontana* como fuente de metabolitos secundarios con potencial antidiabético.

10. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los extractos etanólicos de las plantas en estudio en la presente investigación se concluye que:

- El mayor rendimiento de los extractos etanólicos de las plantas en estudio fueron los de *C. prínceps* y *Bidens sp* con un 7.5%.
- La capacidad en la inhibición de la actividad enzimática de α -amilasa y α -glucosidasa de los extractos etanólicos de *C. submontana* fue superior a la del fármaco (acarbose).
- El extracto etanólico de *C. submontana* mostró mayor actividad que el fármaco (rosiglitazona) en cuanto al nivel de expresión del mRNA de PPAR α en adipocitos maduros de ratón.
- La acumulación de lípidos durante la adipogénesis sobre células 3T3-L1 del extracto etanólico de *C. submontana* fue semejante a la del fármaco (rosiglitazona).
- En el extracto etanólico de *C. submontana* presentó baja toxicidad sobre la línea celular VERO.
- La capacidad de captura de radical libre del extracto etanólico de *C. submontana* fue mayor respecto a las plantas en estudio, pero no superó al control positivo (tocoferol).
- Se obtuvieron 18 fracciones del extracto etanólico de *C. submontana* de las cuales f12 y f18 fueron las bioactivas inhibiendo α -glucosidasa en un 100% a una concentración de 100 μ g/mL.

Los compuestos presentes en el extracto etanólico de *C. submontana* pueden contribuir en el tratamiento y/o como coadyuvante en la Diabetes mellitus, este incrementó los niveles de expresión del gen de PPAR γ en adipocitos murinos mayor que la rosiglitazona, inhibió la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa superior al fármaco (acarbose), con actividad anti radical, baja toxicidad sobre la línea celular VERO. Por lo antes mencionado consideramos a *C. submontana* puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la diabetes.

11. PERSPECTIVAS

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que implica la alteración de diversas cascadas de señalización en el organismo, encontrar un producto nuevo que logre controlar los niveles de glucosa en sangre implica determinar el modo de acción para su óptima administración; por lo que este trabajo pone de manifiesto la importancia de determinar si existen riesgos de toxicidad por el uso del extracto de *C. submontana* o alguna de sus fracciones, así como identificar cuál es su mecanismo de acción hipoglucémico. Se recomienda evaluar el efecto de esta planta en la reparación y el buen funcionamiento de las células pancreáticas que en la diabetes mellitus tipo 1 se encuentran afectadas.

Es importante el aislamiento de el o los compuestos con actividad antidiabética, ya que esto haría posible implementar estrategias futuras para la síntesis de estos compuestos.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abdellaoui SE, Destandau E, Krolkiewicz-Renimel I, Cancellieri P, Toribio A, Jeronimo-Monteiro V, Landemarre L, André P, Elfakir C. 2014. Centrifugal partition chromatography for antibacterial bio-guided fractionation of *Clidemia hirta* roots. *Separation and Purification Technology* 123:221–8.

Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y. 2007. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(3):481–6.

Alcántara V, Pérez A. 2016. Tratamiento de la diabetes mellitus (I). Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. *Saudi Pharmaceutical Journal* 12(18):1001–12.

Alcántara V, Pérez A. 2016. Tratamiento de la diabetes mellitus (I). Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado 12(18):1001–12.

Alemán-González-Duhart D, Tamay-Cach F, Alvarez-Almazan S, Mendieta-Wejebe JE. 2016. Current Advances in the Biochemical and Physiological Aspects of the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus with Thiazolidinediones. *PPAR Reserch* 2016:14–7.

Ali M, Kim D, Seong S, Kim H-R, Jung H, Choi J. 2017. α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity of Plastoquinones from Marine Brown Alga *Sargassum serratifolium*. *Marine Drugs* 15(12):368.

Almeda F. 1993. Melastomataceae. In: *Flora del Bajío y de regiones adyacentes* 10; 1-36.

Alonso C, Maldonado M, Zarate M, Jacobo S, Fernández G, Figueroa Z, Rios R, Leon R, Medellín C, Reyes M, Mendez M, Carranza A. 2012. Plantas medicinales usadas en la Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 292–298.

Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. 2008. Growth and maintenance of Vero cell lines *Current Protocols in Microbiology* 1-10.

Ampudia-Blasco FJ, Perelló Camacho E. Tratamiento de la diabetes mellitus (II). 2016 Hipoglucemiantes no insulínicos. *Medicine* 12(18):1013–25.

Andrade CA, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325–348.

Ascaso JF. 2014. Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. *Medicina Clínica* 143(3):117–23.

Asmat U, Abad K, Ismail K. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm J* 24(5):547–53.

Baran AK, Demirci H, Budak E, Candar A, Akpınar Y. 2017. What do people with hypertension use to reduce blood pressure in addition to conventional medication? Is this related to adherence?. *European Journal of Integrative Medicine* 13; 49-53.

Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. 2004. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *Journal of endocrinology and metabolism*. 89(2):463–78.

Bhansali S, Bhansali A, Walia R, Saikia UN, Dhawan V. 2017. Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology* 8:347.

Biederman J, Yee J, Cortes P. 2004. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney International* 66(6):2308–14.

Boncler M, Rozalski M, Krajewska U, Podswdek A, Watala C. 2014. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 69(1):9–16.

Brewer MS. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4):221–47.

Candar A, Demirci H, Baran AK, Akpınar Y. 2018. The association between quality of life and complementary and alternative medicine use in patients with diabetes mellitus. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 31:1–6.

Chaiittianan R, Chayopas P, Rattanathongkom A, Tippayawat P, Sutthanut K. 2016. Anti-obesity potential of corn silks: Relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction. *Journal of Functional Foods* 23:497–510.

Chang CL, Lin Y, Bartolome AP, Chen YC, Chiu SC, Yang WC. 2013. Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evidence based in Complementary and Alternative Medicine* 378657.

Chen J, Wu Y, Zou J, Gao K. 2016. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives. *Bioorganic Med Chem* 24(7):1488–94.

Chen X, Yan L, Guo Z, Chen Y, Li M, Huang C, Chen Z, Meng X. 2017. Chenodeoxycholic acid attenuates high-fat diet-induced obesity and hyperglycemia via the G protein-coupled bile acid receptor 1 and proliferator-activated receptor γ pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* 5305–12.

Chen Z. 2016. Adapter proteins regulate insulin resistance and lipid metabolism in obesity. *Science Bulletin* 61(19):1489–97.

Cheon S-Y, Chung K-S, Roh S-S, Cha Y-Y, An H-J. 2017. Bee Venom Suppresses the Differentiation of Preadipocytes and High Fat Diet-Induced Obesity by Inhibiting Adipogenesis. *Toxins* 10(1):9.

Ching SM, Zakaria ZA, Paimin F, Jalalian M. 2013. Complementary alternative medicine use among patients with type 2 diabetes mellitus in the primary care setting: a cross-sectional study in Malaysia, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13; 148.

Consoli A, Formoso G, Baldassarre MPA, Febo F. 2018. A Comparative Safety Review between GLP-1 Receptor Agonists and SGLT2 Inhibitors for Diabetes Treatment. *Expert Opinion on Drug Safety* 0(0):14740338.2018.1428305.

De D, Bera TK, Ali KM, Mandal S, Barik B, Ghosh D. 2013. Inhibitory effects of n-hexane fraction from hydro-methanolic (2:3) extract on α -amylase and α -glucosidase activities of sepal of *Salmalia malabarica*: An approach through invitro study. *Biomarkers and Genomic Medicine* 5(1–2):48–5.

Dehghan H, Sarrafi Y, Salehi P. 2014. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. *Journal of Food and Drug Analysis* 4.

Gao H, Kawabata J. 2008. 2-Aminoresorcinol is a potent α -glucosidase inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18(2):812–5.

Ghosh S, Rangan L. 2014. Molecular docking and inhibition studies of α -amylase activity by labdane diterpenes from *Alpinia nigra* seeds. *Medicinal Chemistry Research* 23(11):4836–52.

Gleason HA. 1939. The Genus *Clidemia* in Mexico and central America. *Brittonia a series of botanical papers* 3: 97-140.

Gobert CP, Duncan A. 2008. Use of Natural Health Products by Adults with Type 2 Diabetes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 32(4):260–72.

Gordon A, Schadow B, Quijano CE, Marx F. 2011. Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). *Food Research International* 44(7):2120–7.

Gosh S y Rangan L. 2014. Molecular docking and inhibition studies of a -amylase activity by labdane diterpenes from *Alpinia nigra* seeds. *Medicinal Chemistry Research*.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice* 103(2):137–49.

Gundala NKV, Naidu VGM, Das UN. 2018. Amelioration of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats by arachidonic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* pii: S0006-291X(18)30007-X.

Hasegawa Y, Ikeda K, Chen Y, Alba DL, Stifler D, Shinoda K, Hosono T, Maretich P, Yang Y, Ishigaki Y, Chi J, Cohen P, Koliwad SK, Kajimura S. 2018. Repression of Adipose Tissue Fibrosis through a PRDM16-GTF2IRD1 Complex Improves Systemic Glucose Homeostasis. *Cell metabolism* 27(1):180-194.

Hung C, Bronec C, Napoli E, Graham J, Stanhope KL, Marsilio I, Giron MC, Havel PJ, Giulivi C. 2018. Adipose depot-specific effects of ileal interposition surgery in UCD-T2D rats: unexpected implications for obesity and diabetes pii: BCJ20170899.

Islam MN, Choi RJ, Jung HA, Oh SH, Choi JS. 2016. Promising anti-diabetic potential of capillin and capillinol isolated from *Artemisia capillaris*. *Archives of Pharmacal Research* 39(3):340–9.

Janani C, Ranjitha Kumari BD. 2015. PPAR gamma gene - A review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 9(1):46–50.

Jang BC. 2017. Erratum: “Tetrandrine has anti-adipogenic effect on 3T3-L1 preadipocytes through the reduced expression and/or phosphorylation levels of C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, perilipin A, and STAT-3”. *Biochemical and Biophysical Research Communications Res. Commun.* 476 (4) (2016) 481–486. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 494(1–2):422–3.

Kang J, Park J, Kim H-L, Jung Y, Youn D-H, Lim S, Song G, Park H, Jin J, Kwak HJ, Hum J. 2017. Secoisolariciresinol diglucoside inhibits adipogenesis through the AMPK pathway. *European Journal of Pharmacology*.

Kariharan T, Nanayakkara G, Parameshwaran K, Bagasrawala I, Ahuja M, Abdel-Rahman E, Amin AT, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V, Amin RH. 2015. Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression. *Neurobiology of Aging* 36(3):1451–61.

Kaul K, Tarr JM, Ahmad SI, Kohner EM, Chibber R. 2016. Introduction in diabetes mellitus. In: *Diabetes : an old disease, a new insight*. Springer Science+Business Media, LLC Landes Bioscience: New York, pp. 1-11

Kido D, Mizutani K, Takeda K, Mikami R, Matsuura T, Iwasaki K, Izumi Y. 2017. Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress. *Plos one* 12(12):e0189601.

Kim B, Choi KM, Yim HS, Park HT, Yim JH, Lee M. 2018. Adipogenic and Lipolytic Effects of Ascorbic Acid in Ovariectomized Rats. *Yonsei Medical Journal* 59(1):85–91.

Kim HL, Park J, Park H, Jung Y, Youn DH, Kang J, Jeong MY, Um JY. 2015. Platycodon grandiflorum A. de Candolle Ethanolic Extract Inhibits Adipogenic Regulators in 3T3-L1 Cells and Induces Mitochondrial Biogenesis in Primary Brown Preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(35):7721–30.

Kling B, Bücherl D, Palatzky P, Matysik FM, Decker M, Wegener J, Heilmann J. 2014. Flavonoids, flavonoid metabolites, and phenolic acids inhibit oxidative stress in the neuronal cell line HT-22 monitored by ECIS and MTT assay: A comparative study. *Journal of Natural Products* 77(3):446–54.

Klingelutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, Wadkins DA, Burand AJ, Markan KR, Idiga SO, Wu M, Potthoff MJ, Ankrum JA. 2018. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Science report* 8(1):523.

Kong C, Kim J, Bak S, Byun H, Kim S. 2011. Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22: 276–281.

Kumar M, Govindrajan J, Kumar N. 2017. Antihyperglycemic potential of saponin-enriched fraction from *Pithecellobium dulce* Benth. seed extract. 9(5): 23-26.

Laurent D, Vinet L, Lamprianou S, Daval M, Filhoulaud G, Ktorza A, Wang H, Sewing S, Juretschke, Glombik H, Meda P, Boisgard R, Nguyen DL, Stasiuk GJ, Long NJ, Montet X, Hecht P, Kramer W, Rutter GA, Hecksher-Sørensen J. 2016. Pancreatic β -cell imaging in humans: fiction or option?. *Diabetes, obesity and metabolism* 18: 6–15.

Lewis SN, Bassaganya-Riera J, Bevan DR. 2010. Review article: Virtual screening as a technique for PPAR modulator discovery. *PPAR Reserch* 2010.

Li ZP, Song YH, Uddin Z, Wang Y, Park KH. 2017. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and α -glucosidase by xanthenes from *Cratogeomys cochinchinense*, and their kinetic characterization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

Liu CW, Wang YC, Lu HC, Chiang WD. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry* 49(10):1601–5.

Lopez T, Corbin C, Falguières A, Doussot J, Montguillon J, Hagège D, Lainé E. 2016. Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of in vitro propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium. *Comptes Rendus Chimie* 19(9):1071–6.

Lopez T, Corbin C, Falguières A, Doussot J, Montguillon J, Hagège D, Lainé E. 2016. Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of in vitro propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium. *Comptes Rendus Chimie* 19(9):1071–6.

Luz AL, Kassotis CD, Stapleton HM, Meyer JN. 2018. The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR γ activation, in 3T3-L1 cells. *Toxicology* 393.

Mara J, Mazzaron GR, Prates M, Yanagui K, Vilegas W, Aparecida E. 2011. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63(5):499–504.

Medagama AB, Bandara R. 2014. The use of Complementary and Alternative Medicines (CAMs) in the treatment of diabetes mellitus: is continued use safe and effective?. *Nutrition Journal* 13; 102.

Mediavilla JJ. 2014. Guías en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2. *Semergen* 40(S4):11–8.

Murdiati TB, Mcsweeney CS, Lowry JB. 1991. Complexing of Toxic Hydrolyzable Tannins of Yellow-Wood (*Terminalia-Oblongata*) and Harendong (*Clidemia-Hirta*) with Reactive Substances - an Approach to Preventing Toxicity. *Journal of Applied Toxicology* 11(5):333–8.

Nie T, Zhao S, Mao L, Yang Y, Sun W, Lin X, Liu S, Li K, Sun Y, Li P, Zhou Z, Lin S, Hui X, Xu A, Ma CW, Xu Y, Wang C, Dunbar PR, Wu D. 2018. A Natural Compound Formononetin Derived From *Astragalus Membranaceus* Increase Adipocyte Thermogenesis by Modulating PPAR γ Activity. *British Journal of Pharmacology*.

Nyambe-Silavwe H, Villa-Rodriguez JA, Ifie I, Holmes M, Aydin E, Jensen JM, Williamson G. 2015. Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods* 19:723–32.

Oboh G, Ogunsuyi OB, Ogunbadejo MD, Adefegha SA. 2016. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *Journal of Food and Drug Analysis* 24(3):627–34.

Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. 2017. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice* 128:40–50.

Ohata M, Uchida S, Zhou L, Arihara K. 2016. Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. *Food Chemistry* 194:1034–9.

Ortíz-martínez DM, Cordero-Perez P, Leos-Rivas C. 2016. Actividad Antidiabética. In: *Investigacion en Plantas de Importancia Medica* 215–68.

Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. 2012. Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *AsianPacificJournal of Tropical Biomedicine* 411-420.

Quiong L, Lili C, Lihong H, Yuewei G, Xu S. 2010. Small molecules from natural sources, targeting signaling pathways in diabetes. *Biochimicaet Biophysica Acta* 1799: 854-865.

Ràfols M. 2014. Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinologia y Nutricion*. 61(2):100–12.

Richard AJ, Burris TP, Sanchez-Infantes D, Wang Y, Ribnicky DM, Stephens JM. 2014. *Artemisia* extracts activate PPAR γ , promote adipogenesis, and enhance insulin sensitivity in adipose tissue of obese mice. *Nutrition* 30: 7–8.

Rojas A. 2005. Nuevos taxa de helechos arborescentes (filicales: *Cyatheaceae*) en costa rica. *Lankesteriana* 5(3):191-200.

Rynjah CV, Devi NN, Khongthaw N, Syiem D, Majaw S. 2017. Evaluation of the antidiabetic property of aqueous leaves extract of *Zanthoxylum armatum* DC. using in vivo and in vitro approaches. *Journal of traditional and complementary Medicine* 8(1):134-140.

Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. 2016. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports* 68(6):1165–77.

Saldaña S, Garcia M. 2016. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana in vitro de *Clidemia hirta* L don “mullaca morada” por el método de disco difusión, frente a microorganismos patógenos. Repositorio Institucional Digital UNAP.

Siraj FM, Natarajan S, Huq MA, Kim YJ, Yang DC. 2015. Structural investigation of ginsenoside Rf with PPAR α major transcriptional factor of adipogenesis and its impact on adipocyte. *Journal of Ginseng Research* 39(2):141–7.

Skochko OV, Kaidashev IP. 2017. Effect of pioglitazone on insulin resistance, progression of atherosclerosis and clinical course of coronary heart disease. *Wiadomosci Lekarskie* 70(5):881-890.

Tan XC, Chua KH, Ravishankar Ram M, Kuppusamy UR. 2016. Monoterpenes: Novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chemistry* 196:242–50.

Tauchen J, Doskocil I, Caffi C, Lulekal E, Marsik P, Havlik J, Damme PV, Kokoska L. 2015. In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of Ethiopian medicinal plant extracts. *Industrial Crops and Products* 74:671–9.

Thompson GM, Trainor D, Biswas C, LaCerte C, Berger JP, Kelly LJ. 2004. A high-capacity assay for PPAR γ ligand regulation of endogenous aP2 expression in 3T3-L1 cells. *Analytical Biochemistry* 330(1):21–8.

Tsave O, Kavakiotis I, Vlahavas I, Salifoglou A. 2018. Metabolic abnormalities Clinical biomarkers Data mining. 105–8.

van Gameren E. 2010. Health insurance and use of alternative medicine in Mexico. *Health Policy (New York)* 98(1):50–7.

Wagner H, Bladt S. 1996. Thin-Layer Chromatography Analysis of Herbal Drug Mixtures. In: *Plan Drug Analysis*. Springer: Munich, pp. 355-359.

Walton EL. 2017. Oxidative stress and diabetes: Glucose response in the cROSfire. *Biomedical Journal* 2–5.

Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, Blacevic T, Schwaiger S, Rollinge JM, Heiss EH, Schuster D, Kopp B, Bauer R, Stupner h, Dirsch VM, Aatanasov AG. 2014. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. *Biochemical Pharmacology* 92(1):73–89.

Wang X, Chen G, Pan C, Deng Z, Ge J, Li N. 2014. Polyacetylenes From *Bidens Bipinnata* L. And their biological activities. *Phytochemistry Letters* 7:198–201.

Wei J, Wu H, Zhang H, Li F, Chen S, Hou B, Shi Y, Zhao L, Duan H. 2018. Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice. *International journal of molecular medicine*.

Xu H, Wang Z, Sun Z, Ni Y, Zheng L. 2018. GATA4 protects against hyperglycemia-induced endothelial dysfunction by regulating NOX4 transcription. *Molecular medicine reports* (1):1485-1492.

Yan J, Wang C, Jin Y, Meng Q, Liu Q, Liu Z, Liu K, Sun H. 2017. Catalpol ameliorates hepatic insulin resistance in type 2 diabetes through acting on AMPK/NOX4/PI3K/AKT pathway. *Pharmacological Research* pii: S1043-6618(17)31200-8.

Yasmin S, Jayaprakash V. 2017. Thiazolidinediones and PPAR orchestra as antidiabetic agents: From past to present. *European Journal of Medicinal Chemistry* 126:879–93.

Yoshioka H, Mizuno Y, Yamaguchi T, Ichimaru Y, Takeya K, Hitotsuyanagi Y, Nonogaki T, Aoyagi Y. Methyl dehydroabietate counters high fat diet-induced insulin resistance and hepatic steatosis by modulating peroxisome proliferator-activated receptor signaling in mice. *Biomedic Pharmacotherapy* 99:214-219.

Zahara K, Bibi Y, Tabassum S, Mudrikah, Bashir T, Haider S, Araa A, Ajmal M. 2015. A review on pharmacological properties of *Bidens biternata*: A potential nutraceutical. *Asian Pac J Trop Dis* 5(8): 595-599.

Zaharudin N, Salmeán AA, Dragsted LO. 2018. Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic α -amylase. *Food Chemistry* 15;245:1196-1203.

Zand H, Morshedzadeh N, Naghashian F. 2017. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews (2016):2016–8.

Zeng J, Hu J, Lian Y, Jiang Y, Chen B. 2018. SFRP5 is a target gene transcriptionally regulated by PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes. Gene 641:190–5.

Zhang L, Thurber GM. 2018. Imaging in Diabetes. Imaging and Metabolism 8; 175-197.

Zhang X, Xu JK, Wang J, Wang NL, Kurihara H, Kitanaka S, Yao XS. 2007. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile*. Journal of Natural Products 70(1):24–8.

Zhang Y, Sun J, Li F, Grogan TR, Vergara JL, Luan Q, Park M, Chia D, Elashoff D, Joshipura K. 2017. Salivary extracellular RNA biomarkers for insulin resistance detection in hispanics. Diabetes Research and Clinical Practice 132:85–94.

Zhang, WX, Fan J, Ma J, Rao YS, Zhang L, Yan YE. 2016. Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Three Types of Rat Adipose Tissue. International Journal of Molecular Science 17; 968.

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2016, Article ID 5123519, 6 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/5123519>



Research Article

***Miconia* sp. Increases mRNA Levels of PPAR Gamma and Inhibits Alpha Amylase and Alpha Glucosidase**

David Mizaël Ortíz-Martínez,¹ Catalina Rivas-Morales,¹
Myriam Angelica de la Garza-Ramos,² Maria Julia Verde-Star,¹
Maria Adriana Nuñez-Gonzalez,¹ and Catalina Leos-Rivas¹

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba, s/n, Ciudad Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

²Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Eduardo Aguirre Pequeño y Silao, s/n, Mitras Centro, 64460 Monterrey, NL, Mexico

Correspondence should be addressed to Catalina Leos-Rivas; catalinaleosrivas@yahoo.com

Received 8 April 2016; Revised 2 June 2016; Accepted 12 June 2016

Academic Editor: Menaka C. Thounaojam

Copyright © 2016 David Mizaël Ortíz-Martínez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Diabetes mellitus is a public health problem worldwide. For this reason, ethanolic extract of *Miconia* sp. from Oaxaca, Mexico, was selected in search of an alternative against this disease. The effect of *Miconia* sp. on mRNA expression of PPAR γ on cell line 3T3-L1, its effect on alpha amylase and alpha glucosidase, lipid accumulation during adipogenesis, and cell viability on VERO cells were evaluated. The mRNA levels of PPAR γ increased on 1.393 \pm 0.008 folds, lipid accumulation was increased by 29.55% with *Miconia* sp. extract and 34.57% with rosiglitazone, and α -amylase and α -glucosidase were inhibited with IC₅₀ values from 28.23 \pm 2.15 μ g/mL and 1.95 \pm 0.15 μ g/mL, respectively; the IC₅₀ on antiproliferative activity on VERO cells was 314.54 \pm 45.40 μ g/mL. In case of α -amylase and α -glucosidase assays, IC₅₀ (inhibitory concentration 50) refers to necessary extract amounts to inhibit 50% of enzymatic activity. On the other hand, on antiproliferative activity, IC₅₀ (inhibitory concentration 50) refers to necessary extract amounts to inhibit 50% of cell proliferation. It was concluded that the compounds present in *Miconia* sp. ethanolic extract increase mRNA expression of PPAR γ , inhibit α -amylase and α -glucosidase, and increase lipid accumulation. It constitutes an alternative as adjuvant in diabetes mellitus treatment; therefore, we recommend continuing identifying the compounds responsible for its promising in vivo antidiabetic activity.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease considered a serious global public health problem. In 2010, approximately 285 million people suffered from this disease and this amount is expected to double up within the next 20 years [1]. Diabetes mellitus type 2 (DM2) is the most common form of diabetes. It is a complex metabolic alteration characterized by an insulin combination resistance (IR, low sensitivity of one or multiple tissues to insulin) and insulin secretion alteration [2].

The search for new drugs that act against peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is very

important because ligands of these transcription factors exhibit multiple biological responses such as decreasing the IR and avoiding high levels of plasma glucose. It has been shown that the adipogenesis process is under the control of a complex cascade of transcriptional regulatory factors in which PPAR γ and other transcriptional factors of C/EBP family play a fundamental role [3, 4].

Enzymes α -amylase and α -glucosidase found in saliva and the brush border of the small intestine, respectively, act on hydrolysis oligosaccharides and disaccharides to produce easy absorption monosaccharides such as glucose. For the above mentioned, delaying absorption of glucose through inhibition of enzymatic hydrolysis of carbohydrates, carried

out by alpha amylase and alpha glucosidase, could be another form of combating DM [4].

About 80% of the population worldwide use medicinal plants to treat various diseases. These constitute a major source of drugs; about 25% of prescribed drugs worldwide originate from plant species [5].

A species of the genre *Miconia* in Mexican traditional medicine is used in south Mexico as an alternative for diabetes mellitus treatment. However, such fact has not been scientifically confirmed yet. *Miconia* is a genus of about 1000 species distributed in tropical America and belongs to the Melastomataceae family, which has about 4300 species distributed in 166 genera. Very few studies on biological activity have been performed on this genre, but it has been shown that extracts and compounds isolated from species of the genus *Miconia* have antibiotic, antitumor, analgesic, and anti-malarial activities. A phytochemical analysis of methanolic extract of *Miconia cabucu* reveals the presence of glycosylated flavonoids (quercetin, myricetin, and kaempferol all with different glycosides), a tannin, and rare bioflavonoid. The phytochemical research of *M. rubiginosa* extract led to the identification of several glycosylated forms such as quercetin, gallic acid, and epicatechin. Similarly, quercetin, myricetin, and catechin derivatives *M. stenostachya* were found [6].

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of the Extract. *Miconia* sp. aerial part was collected in Oaxaca, Mexico. The plant was dried in shade at room temperature and extraction with ethanol was performed by the Soxhlet method (PYREX) for 48 h; solvent was removed under reduced pressure using a rotary evaporator (Yamato RE-200). Extract yield was determined and then stored at room temperature until it was used.

2.2. Cell Culture Preparation and Adipocyte Differentiation. Murine cell line 3T3-L1 preadipocytes were used. DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) was used for propagation; it was incubated at 37°C at 5% CO₂ atmosphere, until reaching a confluence of 90%. The 100% confluency was used for adipocyte differentiation. It could be DMEM with 10% FBS, 1 μM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 μg/mL insulin (all brands from Santa Cruz Biotechnology). After 48 hours of incubation (day 2), the differentiation medium was removed and replaced every 48 hours until maturation of adipocytes (days 9–11), with maturation medium of adipocytes (DMEM with 10% FBS and insulin 10 μg/mL called MM). The maturation was confirmed by microscope observation of the typical morphology of an adipocyte [7–10].

2.3. Expression of PPAR γ in Adipocytes. The study was performed in the cell line 3T3-L1 differentiated, following the methodology described above, using microplate 6-well culture with an inoculum of 100,000 cells per well in a final volume of 2 mL with the corresponding culture medium. At day 10, adipocyte differentiation was observed and replaced in the medium (MM). The following treatments were added: Group 1: DMEM with 0.1% ethanol (expression

control group), Group 2: MM supplemented with 1 μM of rosiglitazone (positive control), Group 3: MM supplemented with *Miconia* sp. extract (40 μg/mL), and Group 4: MM only to observe the effect of the medium. After 24 hours of treatment application of the total RNA extraction, the retrotranscription (cDNA) and PCR were performed in real time to determine the effect on mRNA expression [8–10].

The total RNA isolation of treated adipocytes was performed with an extraction kit SV Total RNA Isolation System # Z3100, Promega (following the manufacturer's instructions) and stored at -80°C until use. Total RNA integrity, purity, and quantification analysis was made in NanoDrop 8000 Spectrophotometer with Thermo Scientific and an electrophoresis gel (1.5% agarose).

CDNA synthesis was done with the ImProm-II™ Reverse Transcription System kit Promega # A3800 with 500 ng of RNA isolated. The cDNA was stored at -20°C, until use.

Analysis of mRNA expression PPAR γ was performed by qRT-PCR using LightCycler 480 II Roche equipment, and 50 ng of cDNA, 0.5 μM of the primers, 12.5 μL of Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) # K0251 Thermo Scientific, and the proper amount of nuclease-free water to have a final volume of 25 μL. The 36B4 was used [Thomson] as reference gene. The sequence of the primers used is PPAR γ forward 5'-CTGGCCTCCCTGATGAATAAAG-3', reverse 5'-AGGCTCCATAAAGTACCAAAG-3', 36B4 forward 5'-ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3', and reverse 5'-TCAATGGTGCCTCTGGAGATT-3'. The relative mRNA expression was calculated based on the 2^{-ΔΔCt} method.

2.4. Lipid Accumulation in Adipocytes. Lipid accumulation was evaluated on the cell line 3T3-L1 using Oil Red O, with modifications to the method described by other authors. The method described above was used for cell differentiation. Microculture plates were used having 24 wells with an inoculum of 30,000 cells per well leading to a final volume of 500 μL with culture medium. At 48 h after confluence (day 0) the differentiation medium (Dm) was applied to stimulate adipogenesis, supplemented with the substances to be evaluated: treatment 1 [Dm (control reference)], treatment 2 [Dm supplemented with 40 μg/mL extract *Miconia* sp.], and treatment 3 [Dm supplemented with 1 μM rosiglitazone (positive control)]. Subsequently, the microplate was incubated for 48 h with the established conditions. After that, Dm was replaced by MM (day 2) and incubated for 8 d. The culture medium was removed, and formalin 10% was used for 1 h to fix monolayer cells. After monolayer cells had been washed twice with distilled water, the dye Oil Red O (0.5% in 60% isopropanol) was applied for 15 min at room temperature. The cells were washed three times with distilled water; the dye inside the cells was removed with 100% isopropanol and read the optical density at 540 nm [9–12].

2.5. Inhibitory Activity of α-Amylase. The enzyme inhibition was evaluated by the method of dinitrosalicylic acid 3,5- (DNS) with some modifications. The *Miconia* sp. extract was applied at different concentrations (25, 50, 75, 100, and 125 μg/mL) as a vehicle using phosphate buffer with

20 mM sodium 6.7 mM sodium chloride, at pH 6.9. α -Amylase enzyme (Sigma-Aldrich # A9857-250KU) was used at 0.5 U/mL concentration with the same buffer as a vehicle. Starch 0.5% in phosphate buffer was used as a substrate. Acarbose at different concentrations (312.5, 625, 1250, 2500, and 5000 μ g/mL) was used as a positive control. Additionally, DNS solution was used at 96 mM. In 1.5 mL conical tubes, 50 μ L of substances was placed to be evaluated: treatment 1: *Miconia* sp. extracts, treatment 2: buffer phosphate with 2% ethanol (negative control), and treatment 3: acarbose (positive control). Briefly, to the above treatments 50 μ L of the α -amylase was added and incubated at 37°C for 10 min. After that, to initiate the reaction, 50 μ L of the substrate was added immediately and incubated at 37°C for 15 min. Then, the reaction was stopped by adding 50 μ L of DNS and heated in a water bath at 95°C for 5 min; the tubes were left to cool at room temperature, and the optical density was measured at 540 nm. The absorbance rates were used to calculate the percent inhibition of each treatment using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs treatment})}{\text{Abs control}} \times 100. \quad (1)$$

In this equation, "Abs treatment" is the product's light absorption of the enzyme-substrate reaction in the presence of the *Miconia* sp. or negative control as appropriate. "Abs control" is the reaction product's light absorption of enzyme-substrate in the presence of phosphate buffer as a treatment. The percentage inhibition using the statistical package (SPSS v.20) allows us to calculate the inhibitory concentration: 50 (IC_{50}) is the amount required to inhibit 50% of the enzyme (Sigma-Aldrich # A8980-1G) [5, 13–15].

2.6. α -Glucosidase Inhibitory Activity. Inhibition of the enzyme was evaluated by the pNPG method (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) with some modifications. *Miconia* sp. extract at different concentrations (1, 2, 3, 4, and 5 μ g/mL) was used as a vehicle a buffer of sodium phosphate mentioned above. Acarbose at different concentrations (62.5, 125, 250, 500, and 1000 μ g/mL) is positive control, using buffer sodium phosphate as a vehicle. α -Glucosidase enzyme (Sigma-Aldrich # G5003-100UN) at a concentration of 0.2 U/mL using phosphate buffer as a vehicle. Additionally, a preparation of pNPG 2 mM (Sigma-Aldrich # N1377-1G) was used as a substrate in the same vehicle. After that, in a 96-well microplate, 25 μ L of the substances was mixed with the enzyme to the assay: treatment 1 [*Miconia* sp. extracts], treatment 2 [phosphate buffer with 1% ethanol (negative control)], and treatment 3 [acarbose (positive control)]. Besides the above treatments, 25 μ L of the enzyme suspension was added and incubated at 37°C for 15 min; immediately after that, 50 μ L of pNPG was added and incubated at 37°C for 10 min; then, the reaction was stopped by adding 50 μ L sodium carbonate (0.2 M).

Finally, the optical density at 405 nm was measured. The absorbance rates were used to calculate the percent inhibition of each treatment using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs treatment})}{\text{Abs control}} \times 100. \quad (2)$$

In this equation, "Abs treatment" is the product's light absorption of the enzyme-substrate reaction in the presence of the *Miconia* sp., acarbose or negative control as appropriate. "Abs control" is the product's light absorption of the enzyme-substrate reaction in the presence of phosphate buffer as a treatment. Percent inhibitions using a statistical package (SPSS v.20) were used to determine the inhibitory concentration 50 (IC_{50}) that is the amount of treatment necessary to inhibit the enzyme 50% [4, 13–15].

2.7. Cell Proliferation Assay. Cell proliferation with MTT colorimetric method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was evaluated. The VERO cell (monkey kidney epithelial) lines are widely used in research to evaluate the effect of chemicals and toxins in mammals [16]. 1×10^5 cells/well were seeded in a 96-well microplate and adjusted to a final volume of 200 μ L with culture medium (DMEM supplemented with 10% FBS) and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . After 24 h and until reaching a layer of 80% confluence, the culture medium was removed and cells were washed with phosphates (PBS), a buffered saline solution; further substances were added and evaluated: treatment 1 [extracts of *Miconia* sp. (62.5, 125, 250, 500, and 1000 μ g/mL)], treatment 2 [DMEM with 1% ethanol (negative control)], and treatment 3 [cells with culture medium (reference of proliferation)]. After that, the microplate was incubated for 24 h at the above conditions. Then, 10 μ L MTT (5 mg/mL) were added to each well and incubated again for 4 h; the culture medium was removed and cells were washed with PBS. Immediately afterwards, 200 μ L dimethyl sulfoxide (DMSO) was added; then the optical density was measured at 570 nm. By the following formula the percentage of cell proliferation was determined:

$$\% \text{ cell proliferation} = \frac{\text{Abs treatment}}{\text{Abs control}} \times 100. \quad (3)$$

In this equation, "Abs treatment" is the product's light absorption of the treated cells and "Abs control" is the product's light absorption of cells used as proliferation reference. The IC_{50} is calculated with the percentages of cell proliferation and with the support of SPSS v.20 [17, 18].

3. Results

In this study, different biological activities of ethanolic extract of *Miconia* sp. were evaluated in their effect on expression of mRNA PPAR γ , lipid accumulation during adipogenesis, the activity of α -amylase and α -glucosidase, and the effect on proliferation of VERO cell line.

In determining the expression level of mRNA of PPAR γ in mature mouse adipocytes, Group 1 was used as an expression control, which was normalized to a value of 1. Therefore, the

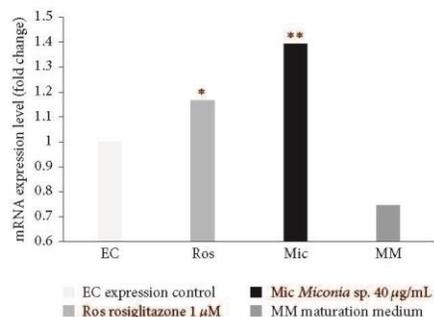


FIGURE 1: Effect of different compounds on the expression of mRNA PPAR γ . On day 10 the treatments were applied; Group 1: DMEM with 0.1% ethanol (EC), Group 2: MM and rosiglitazone (Ros) as a positive control, Group 3: MM and *Miconia* (Mic), and Group 4: MM. On day 11 of adipocyte differentiation the total RNA was isolated. * $P \leq 0.05$; there is a significant difference with the control of expression; ** $P \leq 0.05$; there is a significant difference with the control of expression and rosiglitazone ($n = 3$).

values above 1 indicate an overexpression or upregulation. In Group 2 the value in the expression levels was 1.166 ± 0.007 fold change; at the same time, in Group 3 a value was 1.393 ± 0.008 and finally Group 4 showed a value of 0.746 ± 0.034 fold change (Figure 1).

Miconia sp. 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produced upregulation in the expression of mRNA of PPAR γ with a value greater than that of the drug rosiglitazone, which increases the expression of PPAR γ as expected. The use of maturation medium with both extracts as rosiglitazone did not increase by itself the expression levels of the gene PPAR γ .

In the lipid accumulation test during adipogenesis with different treatments, Group 1 (Dm) showed absorbance of 0.137; this value represents the accumulated lipids during adipogenesis induced differentiation medium already established. At the same time, Group 2 (Dm + *Miconia* sp. 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed absorbance of 0.184; Group 3 (Dm + rosiglitazone 1 μM) showed an absorbance value of 0.177.

Taking the absorbance value from Group 1 as 100% lipid accumulation, when extract *Miconia* sp. was added to the differentiation medium, lipid accumulation was increased to 34.57% compared to Group 1. Like the *Miconia* sp. extract, adding the drug rosiglitazone to differentiation medium, it causes an increase of 29.55% compared to Group 1. The increased absorbance of the extract and the drug is significant compared with Dm; *Miconia* sp. presented a very similar result to rosiglitazone, difference between them not of great significance (Figure 2).

In the α -amylase inhibition assay, different treatments to the mixture of enzyme-substrate reaction were added, obtaining the following results: for treatment 1, *Miconia* sp. presented IC_{50} of 28.23 ± 2.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At the same time, for treatment 2, phosphate buffer and 2% ethanol (negative control) showed no inhibition by the vehicle used; for

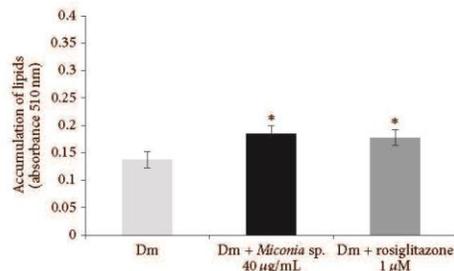


FIGURE 2: Effect of different substances in lipid accumulation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. The treatments were applied at day 0 of differentiation and withdrawn at day 2. On day 10 when adipocytes reached maturity, the staining was performed. * $P \leq 0.05$ significant difference between treatments and Dm ($n = 3$).

TABLE 1: Enzymatic inhibition from acarbose and *Miconia* sp. extract.

Treatment	α -Amylase ($\text{IC}_{50} \pm \text{DE}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	α -Glucosidase ($\text{IC}_{50} \pm \text{DE}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Miconia</i> *	28.23 ± 2.15	1.95 ± 0.15
Acarbose (positive control)	993.84 ± 15713	331.00 ± 72.08
Phosphate buffer with 1% ethanol (negative control)	NI	NI

Data are expressed as mean \pm the SD ($n = 3$). NI: no inhibition. * $P \leq 0.05$ significant difference with acarbose.

treatment 3: acarbose presented IC_{50} of 993.84 ± 15.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (positive control).

According to the results and despite being a complete extract, the extract of *Miconia* sp. reveals a greater capacity than acarbose to inhibit 50% of enzyme activity; this difference between the two treatments is statistically significant (Table 1).

In the inhibition assay of α -glucosidase, the following results were obtained: for treatment 1, *Miconia* sp. extract provided IC_{50} of 1.95 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At the same time, for treatment 2, phosphate buffer with 1% ethanol (negative control) did not show any inhibitory effect on the enzyme; for treatment 3, acarbose (positive control) showed IC_{50} of 331.00 ± 72.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 1).

Miconia sp. extract also has a greater inhibition than acarbose, and acarbose is used as a reference compound in the inhibition of these enzymes. The differences in the treatments are statistically significant.

In determining the proliferation on the VERO cell line, IC_{50} of 314.54 ± 45.40 mg/mL considered toxic was obtained for *Miconia* sp. extract.

4. Discussion

PPAR γ is a nuclear receptor that acts as a transcription factor; it improves insulin sensitivity by the cells and enhances

glucose utilization [19]. A diverse set of natural and synthetic molecules is classified as ligands and can induce activation and that expression of PPAR γ . These ligands include nutrients, endogenous ligands, and drugs [20]; one of those drugs is thiazolidinediones (TZDs), such as rosiglitazone. *Miconia* sp. showed an increased mRNA expression of PPAR γ , even more than rosiglitazone. Moreover, *Miconia* sp. was able to increase lipid accumulation during adipogenesis in 3T3 cell line L-1 similar to positive control rosiglitazone. It is known that PPAR γ is the master regulator of adipocyte differentiation, and during adipogenesis PPAR γ is induced [21]. PPAR γ activation in adipocytes ensures proper balance and secretion of adipokines, such as leptin and adiponectin; they are mediators in insulin action in peripheral tissues, which causes insulin sensitivity throughout the body [22]. The products mentioned above that stimulate the production of PPAR γ are candidates to induce the proper functioning of insulin and recognition, considering them as potential antidiabetic agents.

The results suggest that the presence of secondary metabolites could be involved in upregulation of PPAR γ gen. Quercetin, catechin, and kaempferol have been reported in some species of *Miconia* sp. and these compounds could act as ligands of PPAR γ [6, 21] just as rosiglitazone does. Some TZDs as rosiglitazone have been associated with a significant increase of cardiovascular diseases. For this reason, FDA restricted their prescription in the United States [23].

Avoiding the increase of postprandial glucose is important to keep the glycemic levels low in diabetic patients. The inhibition of α -amylase and α -glucosidase present in the gastrointestinal tract could keep the levels of glycemia low. Drugs inhibit these enzymes, such as acarbose, miglitol, voglibose, nojirimycin, and 1-deoxynojirimycin, which allow the slow absorption of carbohydrates [23]. The ethanolic extract of *Miconia* sp. inhibits α -amylase by 50% to a less concentration than the acarbose drug. Additionally, the α -glucosidase is inhibited by *Miconia* sp. at low concentrations, lower than the drug. Therefore, it is believed that in the presence of molecules with antihyperglycemic effect in *in vitro* model, these compounds could be an alternative to existing treatments or adjunctive to them, which may have undesired side effects.

Miconia sp. showed cytotoxicity at a greater concentration than necessary to increase expression of PPAR γ , increase lipid accumulation, and inhibit α -glucosidase and α -amylase. There are reports that the species of the genus *Miconia*, *M. stenostachya*, *M. cabucu*, *M. albicans*, and *M. rubiginosa*, lack cytotoxicity or mutagenicity at lower concentrations of 100 μ g/mL [6].

5. Conclusions

The ethanolic extract of *Miconia* sp. showed increase of the level of mRNA expression of PPAR γ at a significantly higher level than rosiglitazone (drug). Also, *Miconia* sp. showed inhibition of the enzymes α -glucosidase and α -amylase with IC₅₀ lower than acarbose (drug) and furthermore increase the capacity of lipid accumulation during adipogenesis, similar to the drug rosiglitazone. At the same time, *Miconia* sp. showed

cytotoxicity on VERO cells with a concentration higher than that presenting biological activity. For this reason, the compounds present in the ethanolic extract of *Miconia* sp. can be an alternative for the treatment of diabetes mellitus or like an adjunctive, with the recommendation of continuing with *in vivo* tests and elucidation of bioactive compounds.

Competing Interests

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

References

- [1] J. Chen, Y. Wu, J. Zou, and K. Gao, " α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 24, no. 7, pp. 1488–1494, 2016.
- [2] J. F. Ascaso, "Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos," *Medicina Clinica*, vol. 143, no. 3, pp. 117–123, 2014.
- [3] M. E. Ráfols, "Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional," *Endocrinología y Nutrición*, vol. 61, no. 2, pp. 100–112, 2014.
- [4] S. Ghosh and L. Rangan, "Molecular docking and inhibition studies of α -amylase activity by labdane diterpenes from *Alpinia nigra* seeds," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 23, no. 11, pp. 4836–4852, 2014.
- [5] A. Josabad Alonso-Castro, J. Jose Maldonado-Miranda, A. Zarate-Martinez et al., "Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 1, pp. 292–298, 2012.
- [6] J. M. Serpeloni, G. R. Mazzaron, M. Prates et al., "Experimental and toxicologic pathology cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an *in vitro* analysis," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 63, pp. 499–504, 2011.
- [7] A. J. Richard, T. P. Burris, D. Sanchez-Infantes, Y. Wang, D. M. Ribnicky, and J. M. Stephens, "Artemisia extracts activate PPAR γ , promote adipogenesis, and enhance insulin sensitivity in adipose tissue of obese mice," *Nutrition*, vol. 30, no. 7-8, pp. S31–S36, 2014.
- [8] C.-S. Kong, J.-A. Kim, S.-S. Bak, H.-G. Byun, and S.-K. Kim, "Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 22, no. 3, pp. 276–281, 2011.
- [9] R. Chaittitanan, P. Chayopas, A. Rattanathongkom, P. Tip-payawat, and K. Sutthanut, "Anti-obesity potential of corn silks: relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction," *Journal of Functional Foods*, vol. 23, pp. 497–510, 2016.
- [10] X. C. Tan, K. H. Chua, M. Ravishankar Ram, and U. R. Kuppusamy, "Monoterpenes: novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes," *Food Chemistry*, vol. 196, pp. 242–250, 2016.
- [11] H.-L. Kim, J. Park, H. Park et al., "Platycodon grandiflorum A. de candolle ethanolic extract inhibits adipogenic regulators in 3T3-L1 cells and induces mitochondrial biogenesis in primary brown preadipocytes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no. 35, pp. 7721–7730, 2015.

- [12] F. M. Siraj, S. Natarajan, M. A. Huq, Y. J. Kim, and D. C. Yang, "Structural investigation of ginsenoside Rf with PPAR γ major transcriptional factor of adipogenesis and its impact on adipocyte," *Journal of Ginseng Research*, vol. 39, no. 2, pp. 141–147, 2015.
- [13] H. S. Nyambe, J. A. Villa, I. Ifie et al., "Inhibition of human α -amylase by dietary polyphenols," *Journal of Functional Foods*, vol. 19, pp. 723–732, 2015.
- [14] C.-W. Liu, Y.-C. Wang, H.-C. Lu, and W.-D. Chiang, "Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves," *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 10, pp. 1601–1605, 2014.
- [15] H. Dehghan, Y. Sarrafi, and P. Salehi, "Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 24, no. 1, pp. 179–188, 2016.
- [16] N. C. Ammerman, M. Beier-Sexton, and A. F. Azad, "Growth and maintenance of Vero cell lines," *Current Protocols in Microbiology*, 2008.
- [17] B. Kling, D. Bücherl, P. Palatzky et al., "Flavonoids, flavonoid metabolites, and phenolic acids inhibit oxidative stress in the neuronal cell line HT-22 monitored by ECIS and MTT assay: a comparative study," *Journal of Natural Products*, vol. 77, no. 3, pp. 446–454, 2014.
- [18] M. Boncler, M. Różalski, U. Krajewska, A. Podsedek, and C. Watala, "Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 69, no. 1, pp. 9–16, 2014.
- [19] T. Kariharan, G. Nanayakkara, K. Parameshwaran et al., "Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression," *Neurobiology of Aging*, vol. 36, no. 3, pp. 1451–1461, 2015.
- [20] S. N. Lewis, J. Bassaganya-Riera, and D. R. Bevan, "Virtual screening as a technique for PPAR modulator discovery," *PPAR Research*, vol. 2010, Article ID 861238, 10 pages, 2010.
- [21] L. Wang, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig et al., "Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review," *Biochemical Pharmacology*, vol. 92, no. 1, pp. 73–89, 2014.
- [22] C. Janani and B. D. Ranjitha, "PPAR gamma gene—a review," *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, vol. 9, no. 1, pp. 46–50, 2015.
- [23] G. Oboh, O. B. Ogunshuyi, M. D. Ogunbadejo, and S. A. Adefeigha, "Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose," *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016.

Investigación en plantas de importancia médica

Catalina Rivas-Morales, María Azucena Oranday-Cárdenas,
María Julia Verde-Star (editoras)



 OmniaScience


open access
Monographs

Investigación en plantas de importancia médica

Editores:

Catalina Rivas-Morales, Mañá Azucena Oranday-Cárdenas, María Julia Verde-Star
Universidad Autónoma de Nuevo León, México



ISBN: 978-84-944673-7-0

DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>

© OmniaScience (Omnia Publisher SL) 2016

© Diseño de cubierta: OmniaScience

© Imágenes de cubierta: Pilule rouge plante, © DaMonk – Fotolia.com;

Molecule background, © Belkin & Co - Fotolia.com

OmniaScience no se hace responsable de la información contenida en este libro y no aceptará ninguna responsabilidad legal por los errores u omisiones que puedan existir.

ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA

**David Mizael Ortíz-Martínez¹, Paula Cordero-Pérez²,
Catalina Leos-Rivas¹**

¹Laboratorio Química Analítica Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

²Unidad de Hígado, Departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario «Dr. José Eleuterio González» de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

paucordero@yahoo.com.mx, dmizael_om@hotmail.com,
catalina.leosrs@uanl.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.342>

Ortíz-Martínez, D.M., Cordero-Pérez, P., & Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antidiabética. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 215-268.

13.3 Anexo 3



<p style="text-align: center;">INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisinal de Patentes</p> <p style="text-align: center;">OFICINA REGIONAL DEL NORTE</p> <p>Solicitud: MX/a/2017/007661 Expediente: MX/a/2017/007661 Fecha: 12/JUN/2017 Hora: 11:11:13 Folio: MX/E/2017/042375 687891</p>	<p>Uso exclusivo del IMPI</p> <p>No. de expediente</p> <p>No. de folio de entrada</p> <p>Fecha y hora de presentación</p>														
<p>Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso</p>															
<p>I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)</p>															
<p>El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/> El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>1) Nombre (s): A) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.</p> <p>2) Nacionalidad (es): A) MEXICANA.</p> <p>3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: A) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455. Población, Estado y País: A) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.</p> <p>4) Teléfono (clave): _____ 5) Fax (clave): _____</p>															
<p>II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)</p>															
<p>6) Nombre (s): A) CATALINA LEOS RIVAS; B) CATALINA RIVAS MORALES; C) DAVID MIZAEEL ORTIZ MARTÍNEZ; D) MARÍA AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS; E) MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS.</p> <p>7) Nacionalidad (es): A) MEXICANA; B) MEXICANA; C) MEXICANA; D) MEXICANA; E) MEXICANA;</p> <p>8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: A) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455; B) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455; C) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455; D) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455; E) AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455.</p> <p>Población, Estado y País: A) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO; B) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO; C) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO; D) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO; E) SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO.</p> <p>9) Teléfono (clave): _____ 10) Fax (clave): _____</p>															
<p>III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)</p>															
<p>11) Nombre (s): LIC. LORENA NOHEMÍ GONZÁLEZ PACHECO Y LIC. JAIME JAVIER GUTIÉRREZ ARGÜELLES. 12) R G P: RGP-DDAJ-27968.</p> <p>13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: AV. PEDRO DE ALBA S/N, TORRE DE RECTORÍA, PISO 4, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 66455. Población, Estado y País: SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO. 14) Teléfono (clave): (81) 83294021.</p> <p>15) Fax (clave): _____</p> <p>16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. ERICK FERNANDO MARTÍNEZ FLORES, LIC. DELTHA DEL CARMEN CABRIALES LÓPEZ, LBG. ANGELA GABRIELA CARRILLO RODRÍGUEZ, ING. ADRIAN GERARDO MARROQUÍN ORTEGA, LBG. FERNANDO FIGUEROA GARCÍA Y LBG. LUIS FERNANDO LEAL FLORES.</p>															
<p>17) Denominación o Título de la Invención:</p> <p>EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PLANTA <i>Cildemia submontana</i> Y SU USO COMO AGENTE HIPOGLUCEMIANTE.</p>															
<p>18) Fecha de divulgación previa</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> <td style="text-align: center;">06</td> <td style="text-align: center;">2016</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Día</td> <td style="text-align: center;">Mes</td> <td style="text-align: center;">Año</td> </tr> </table>		12	06	2016	Día	Mes	Año								
12	06	2016													
Día	Mes	Año													
<p>19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI</p>															
<p>20) División de la solicitud</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Número</td> <td style="text-align: center;">Figura jurídica</td> <td style="text-align: center;">Día</td> <td style="text-align: center;">Mes</td> <td style="text-align: center;">Año</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año									
Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año											
<p>21) Fecha de presentación</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Día</td> <td style="text-align: center;">Mes</td> <td style="text-align: center;">Año</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Día	Mes	Año											
Día	Mes	Año													
<p>22) Prioridad Reclamada:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th rowspan="2">País</th> <th colspan="3">Fecha de presentación</th> <th rowspan="2">No. de serie</th> </tr> <tr> <th>Día</th> <th>Mes</th> <th>Año</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		País	Fecha de presentación			No. de serie	Día	Mes	Año						
País	Fecha de presentación			No. de serie											
	Día	Mes	Año												
<p>Lista de verificación (uso interno)</p>															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">No. Hojas</th> <th style="width: 50%;">No. Hojas</th> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 1 Comprobante de pago de la tarifa</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> 4 Documento de cesión de derechos</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 13 Descripción y reivindicación (es) de la invención</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> 13 Constancia de depósito de material biológico</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 4 Dibujo (s) en su caso</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> 13 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 4 Resumen de la descripción de la invención</td> <td><input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 1 Documento que acredita la personalidad del apoderado</td> <td><input type="checkbox"/> Traducción</td> </tr> <tr> <td> </td> <td style="text-align: center;">65 TOTAL DE HOJAS</td> </tr> </table>		No. Hojas	No. Hojas	<input checked="" type="checkbox"/> 1 Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 4 Documento de cesión de derechos	<input checked="" type="checkbox"/> 13 Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 13 Constancia de depósito de material biológico	<input checked="" type="checkbox"/> 4 Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 13 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa	<input checked="" type="checkbox"/> 4 Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad	<input checked="" type="checkbox"/> 1 Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> Traducción		65 TOTAL DE HOJAS
No. Hojas	No. Hojas														
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 4 Documento de cesión de derechos														
<input checked="" type="checkbox"/> 13 Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 13 Constancia de depósito de material biológico														
<input checked="" type="checkbox"/> 4 Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 13 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa														
<input checked="" type="checkbox"/> 4 Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad														
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> Traducción														
	65 TOTAL DE HOJAS														
<p>Observaciones: <u>Atene hoja de dibujo.</u></p> <p>Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.</p> <p style="text-align: center;">LIC. LORENA NOHEMÍ GONZÁLEZ PACHECO MONTERREY, N. L. Nombre y firma del solicitante o su apoderado A 06 DE JUNIO DE 2017 Lugar y fecha</p>															

Consideraciones generales para su llenado:

- Este formato es de distribución gratuita. Se autoriza su libre reproducción, siempre y cuando éste no sea alterado y sea presentado impreso su anverso (Página 1) y reverso (Página 2) en una sola hoja de papel blanco y en tamaño oficial.
- Debe llenarse en idioma español, preferentemente a máquina. No obstante, podrá presentarse con letra de molde, siempre que la solicitud sea legible. La información de la solicitud debe ser requisitada toda por el mismo medio, sin tachaduras ni enmendaduras.
- El formato de solicitud por duplicado, debidamente requisitado y firmado en todos sus ejemplares, así como sus documentos anexos, deben presentarse en la Coordinación Departamental de Recepción y Control de Documentos de la Dirección Divisional de Patentes del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, con domicilio en Arenal # 550, Pueblo Santa María Tepepan, Delegación Xochimilco, C.P. 16020, México, D.F., con horario de atención de 8:45 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Oficinas Regionales del IMPI o las Delegaciones o Subdelegaciones Federales de la Secretaría de Economía.
- También podrá remitirse la solicitud por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes o, en su caso, presentarse por transmisión telefónica facsimilar, en los términos previstos en el artículo 5o. del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Los documentos anexos redactados en idioma distinto al español deberán acompañarse de la traducción correspondiente.
- Los documentos anexos provenientes del extranjero, cuando proceda, deberán acompañarse de la legalización o, en su caso, apostilla correspondiente.
- En el formato de solicitud marque con una X en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
 - País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
 - En el listado de documentos que se anexan mencione el total de hojas que comprende cada documento y al final el total de hojas

Trámite al que corresponde la forma: Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad.

Número de Registro Federal de Trámites y Servicios: IMPI-03-001, IMPI-03-002, IMPI-03-003.

Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión General Adjunta de Propiedad Industrial del IMPI: 2-XII-2011.

Fecha de autorización de la forma por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria: 8-XII-2011.

Fundamento jurídico-administrativo:

Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 38-47, 50, 52, 53-54, 55-61 (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 2-VIII-94, 25-X-96, 26-XII-97, 17-V-99, 26-I-04, 16-VI-05, 25-I-06, 06-V-09, 06-I-10, 18-VI-10 y 28-VI-10).

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial. Arts. 5-8, 16, 24-39, 43, 45 y 46 (D.O.F. 23-XI-94, reformas D.O.F. 10-IX-02, 19-IX-03 y 10-VI-11).

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 3-10 y 34 (D.O.F. 14-XII-94, reformas D.O.F. 22-III-99, 14-XII-00, 20-VI-03, 11-VII-03, 18-III-10 y 2-IV-10).

Acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Arts. 1 inciso a); 9, inciso a) y demás aplicables ((D.O.F. 23-VIII-95, reformas D.O.F. 28-XII-95, 10-XII-96, 2-V-97, 4-V-98, 23-II-99, 11-X-00, 17-X-01, 13-XI-01, 24-XII-01, 27-II-02, 14-III-02, 14-XI-02, 04-II-03, 8-X-03, 27-X-04, 23-III-05, 13-IX-07, 1-VI-09, 10-VIII-09, 24-VIII-09, 1-X-10 y 10-V-11).

Acuerdo por el que se da a conocer la lista de instituciones reconocidas por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para el depósito de material genético (D.O.F. 30-V-97).

Acuerdo por el que se establecen reglas y criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art. 4-18 (D.O.F. 9-VIII-04).

Acuerdo por el que se dan a conocer los horarios de trabajo del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Art. 1. (D.O.F. 31-III-99, reforma D.O.F. 20-I-11).

Documentos anexos:

Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (duplicado)
- **Solicitud de Registro de Diseño Industrial**
- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (duplicado)
- **Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:**
 - Constancia de depósito de material biológico
 - Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
 - Acreditación del poderante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
 - Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
 - Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia)
 - Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
 - Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

Criterios de resolución del trámite

- Presentar toda la documentación requerida y pagos de la tarifa conforme a la legislación nacional y convenios internacionales de los que México forma parte.
- Será suficiente el cumplir con los requisitos formales al momento de presentar su solicitud.

Tiempo de respuesta:

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses. No aplica la positiva ni la negativa ficta.

Número telefónico para quejas:

Órgano Interno de Control en el IMPI
5624-04-12 ó 13 (directo)
5624-04-00 (conmutador)
Extensiones: 11028 y 11234.
Fax: 56-24-04-35
Correo electrónico: quejanet@impi.gob.mx

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL a los teléfonos: 20002000 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01-800-11205-84 o desde Estados Unidos y Canadá al 1-800-475-23-93.

Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 53 34 07 00 extensiones 10098 y 10026.

14. RESUMEN BIOGRÁFICO

David Mizael Ortiz Martinez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *in vitro* DE PLANTAS MEDICINALES DE USO TRADICIONAL**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Guadalupe, Nuevo León el 08 de diciembre de 1986, hijo de Juan Antonio Ortiz Narváez y Martha Esthela Martínez Chantaca.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2011.

Experiencia Profesional: Maestra de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2016