



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

**“Efecto de una mezcla enantiomérica enriquecida con la estereoquímica  
*R,R* de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona para el tratamiento de la diabetes  
y/o obesidad”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

DOMÍNGUEZ MENDOZA ELIX ALBERTO

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO  
DR. ELEUTERIO BURGUEÑO TAPIA



CDMX, Julio del 2016.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 25 del mes de Mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH

para examinar la tesis titulada:  
Efecto de una mezcla enantiomérica enriquecida con la estereoquímica R,R de 3',4'-di-O-acetil-cis-quelactona para el tratamiento de la diabetes y/o obesidad

Presentada por el alumno:

<u>Domínguez</u>	<u>Mendoza</u>	<u>Elix Alberto</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	B	1	2	0	5	5	7

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red  
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

\_\_\_\_\_  
Dr. Eleuterio Burgueño Tapia

\_\_\_\_\_  
Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

\_\_\_\_\_  
Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Mendoza Herrera

\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN



## Prohibición de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional**

**Presente**

Bajo protesta de decir verdad, el que suscribe Elix Alberto Domínguez Mendoza, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales, conjuntamente con mis directores de tesis, de la obra titulada "Efecto de una mezcla enantiomérica enriquecida con la estereoquímica *R,R* de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona para el tratamiento de la diabetes y/o obesidad", en adelante llamada "La Tesis" y de la cual se adjunta copia para efecto de requisito académico de obtención de grado de Doctorado.

Por medio de la presente y con fundamento en el artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor, en sus fracciones I y II, se prohíbe el uso y/o explotación de "La Tesis" así como su reproducción, publicación, edición y comunicación pública en las formas y medios descritos en el fundamento legal citado, en virtud de que cualquier utilización por una persona física o moral distinta a los coautores puede afectar o violar los derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros distintos a los coautores de "La Tesis".

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de coautor de "La Tesis" y limitarse a su uso en la forma señalada anteriormente.

Ciudad de México a 25 de mayo del 2016

Atentamente



---

Elix Alberto Domínguez Mendoza

## Declaración de originalidad

“Declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y, en mi conocimiento, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona. Tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento a las personas que contribuyeron con su trabajo, principalmente a mis directores de tesis por su apoyo para realizar la concepción del proyecto, el estilo de la presentación y la expresión escrita.”

Atentamente



Elix Alberto Domínguez Mendoza

Vo. Bo.



Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Vo. Bo.



Dr. Eleuterio Burgueño Tapia

Ciudad de México a 25 de Mayo del 2016



Instituto Politécnico Nacional



Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía



"2015, Año del Generalísimo José Morelos y Pavón"

# CONSTANCIA

El que suscribe hace constar que el Proyecto de investigación:

**"Efecto de un análogo de Praeruptorina A en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina "**

Propuesto ante el Comité de Bioética, por:

**ELIX ALBERTO DOMÍNGUEZ MENDOZA**

El presente proyecto recibe una opinión favorable por parte del Comité de Bioética, por considerarlo seguro en el sentido de que las instalaciones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación cuenta con las condiciones de Bioseguridad para el desarrollo del mismo, además no implica ningún daño a los participantes, terceras personas, ni al medio ambiente en general.

Se emite este Acuerdo dentro del marco de la reunión del Comité de Bioética celebrada el día miércoles 30 de septiembre del 2015. (No. de registro:ENMH-CB-141-2015).

Se extiende la presente, para los fines legales que al(a) interesado(a) convengan, al día 01 del mes de octubre del año Dos Mil Quince.

**ATENTAMENTE**  
**"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"**

**DRA. VICTORINA ELIZABETH JIMENEZ SÁNCHEZ**  
**PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA**

COMITÉ DE BIOÉTICA  
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019"  
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2011/2016"  
Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México, D.F.  
Tels. 57-29-60-00 ext. 55512  
E-mail: [cnmh@ipn.mx](mailto:cnmh@ipn.mx)

*polm)*

**ESTE PROYECTO FUE REALIZADO EN LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (IPN) GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS SIP 20131784, 20140979 y 20150719. Y EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL IPN, GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS SIP 20151556 Y AL PROYECTO CONACYT 168066.**

**EL ALUMNO FUE BECARIO DE CONACYT EAD-M (240114) Y DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES (BEIFI) DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al CINVESTAV que fueron las instituciones donde llevé a cabo mis estudios de posgrado.

A la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo (Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, ENMH) por su dedicación, sus comentarios acertados y su tiempo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Eleuterio Burgueño Tapia (Laboratorio de Productos Naturales, ENCB) por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme trabajar con su grupo de trabajo.

A mi comité tutorial: Dra. Laurance Annie Marchat Marchau, Dra. Aracely Chávez Piña y Dr. Alberto Mendoza Herrera por su valioso tiempo y sugerencias durante cada etapa del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio que me acompañaron y me apoyaron en la realización de este trabajo de doctorado: Sergio Ivan Angles Falconi, Daniel Espinosa Paredes, Carla Elena Mezo, Ivan Arias, Lucero Pastelín.

Así como también al Dr. Cornejo por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Tlaloc, Xicotencatl, y Quetzalcóatl, no son dioses pero si muy buenos amigos.

Por último quiero agradecer a una persona muy importante en mi vida que a pesar, de que ya no está conmigo, su apoyo diario me motivó a trabajar arduamente todos los días.

Hay muchas personas a las que puedo agradecer pero son tantas que se haría otra tesis.

## DEDICATORIA

**A mi país, a mi familia y a todos los que me apoyaron.**

*La ciencia te da muchas tristezas, experimentos que no salen, noches de insomnio y te exige dedicación de tiempo. Es por eso que se debe de estar feliz y debes festejar cuando obtienes resultados, aunque sean pocos, aunque no sean lo que esperabas, tienes que quererlos y defenderlos porque es por lo que trabajaste, por lo que no dormiste, es tuyo, y algún día cuando tu trabajo sirva como antecedente para otros, te darás cuenta que no es solo tuyo sino de todos.*

*Elix Rose*

*La vida no es un arcoíris de colores y nubes rosas, es un mundo duro y hostil, debes de ir preparado a que te den golpes y nadie golpeará tan fuerte como la vida, ella te pondrá de rodillas y te dejará ahí postrado si la dejas, pero no importa cuántos golpes recibas, si no cuantas veces te levantes y sigas avanzando, cuanto resistirás y seguirás avanzando así es como se gana. Y no debes ir culpando a otros y decir, no soy lo que quiero ser por él, por ella, ni por nadie, los cobardes lo hacen y tú no lo eres, tú debes ser mejor.*

*Rocky Balboa*

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AMPK	Proteína quinasa
CAT	Catalasa
CC	Cromatografía en columna
DOAcQ	3',4'-di- <i>O</i> -acetil- <i>cis</i> quelactona
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FABP	Fatty acid binding protein
GHS	Glutati3n reducido
GPx	Glutati3n peroxidasa
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
H <sub>2</sub> O	Agua
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
OCDE	Organizaci3n para la cooperaci3n y el desarrollo econ3mico
OMS	Organizaci3n mundial de la salud
PCR	Reacci3n en cadena de la polimeraza
PPAR	Receptor activado por la proliferaci3n de peroxisoma
RMN	Resonancia magn3tica nuclear
SOD	Super3xido dismutasa
STZ	Estreptozotocina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xvi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>xix</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xxii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Diabetes	1
1.1.1 Estadísticas y costos de la diabetes	1
1.2 Insulina	3
1.2.1 Receptores de insulina	5
1.2.2 Señalización insulínica y el tráfico de GLUT4	5
1.3 Tipos de diabetes	7
1.3.1 Diabetes Mellitus tipo 1	7
1.3.2 Diabetes Mellitus tipo 2	7
1.3.3 Diabetes gestacional	7
1.4 Diagnóstico de la diabetes	8
1.5 Tratamiento de la diabetes	8
1.5.1 Sensibilizadores de insulina	9
1.5.1.1 Biguanidas	9
1.5.1.2 Tiazolidinedionas	9
1.5.2 Secretagogos	10
1.5.2.1 Sulfonilureas	10
1.5.2.2 Secretagogos no sulfonilureas	10
1.5.3 Inhibidores de la absorción de glucosa	10
1.5.4 Incretinas	10
1.5.4.1 Agonistas del receptor de GLP-1	11
1.5.4.2 Inhibidor de dipeptidil peptidasa	11
1.5.5 Inhibidores del transportador de glucosa-sodio	11
1.5.6 Terapia de insulina	11

	PÁGINA
1.6 Hiperglucemia, citocinas y la resistencia a insulina	12
1.7 Hiperglucemia, citocinas y disfunción en células- $\beta$	13
1.8 Estrés oxidativo	14
1.9 Modelos animales de diabetes	15
1.10 Diabetes y obesidad	17
1.10.1 Obesidad y citocinas inflamatorias	20
1.10.2 Obesidad y especies reactivas de oxígeno	21
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
2.1 Las plantas con potencial antidiabético	23
2.2 Estudios previos realizados en el Laboratorio	23
2.3 Estudios realizados a las cumarinas	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>31</b>
5.1 Objetivos específicos	31
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
6.1 Metodología general para la síntesis de DOAcQ	32
6.1.1 Síntesis de la mezcla de 3',4'-di- <i>O</i> -acetil- <i>cis</i> -quelactona	33
6.1.1.1 Procedimiento para la obtención de la piranocumarina <b>(1)</b>	33
6.1.1.2 Procedimiento para la obtención de la <i>cis</i> -quelactona <b>(2)</b>	33
6.1.1.3 Procedimiento para la síntesis de	
4'- <i>O</i> -( $\alpha$ -metilbutiril- <i>cis</i> -quelactona <b>(3)</b> )	34

	PÁGINA
6.1.1.4 Procedimiento para la síntesis de 3'-O-( $\alpha$ -metilbutiril- <i>cis</i> -quelactona <b>(4)</b> )	34
6.1.1.5 Procedimiento para la síntesis de 3'-O-tigloil-4'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)- <i>cis</i> -quelactona <b>(5)</b>	35
6.1.1.6 HPLC de los diastereómeros	35
6.1.1.7 Procedimiento para la obtención de la mezcla de 3',4'-di-O-acetil- <i>cis</i> -quelactona [DOAcQ] <b>(6)</b>	36
6.2 Experimentos biológicos	36
6.2.1 Modelos murinos	36
6.2.1.1 Ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina	36
6.2.1.1.1 Medición de peso y niveles de glucosa	38
6.2.1.2 Ratón obeso inducido por dieta	39
6.2.1.2.1 Medición de peso y niveles de glucosa	40
6.2.2 Sacrificio y obtención de muestras	41
6.2.3 Análisis histológico	41
6.2.4 Expresión de citocinas inflamatorias	42
6.2.4.1 Obtención de ADNc	43
6.2.4.2 PCR kit	43
6.2.4.3 PCR oligos independientes	43
6.2.5 Análisis de las enzimas antioxidantes	44
6.2.5.1 Preparación de homogenado	44
6.2.5.2 Actividad de catalasa (CAT)	45
6.2.5.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	46
6.2.5.4 Glutación peroxidasa (GPx)	47
6.2.6 Análisis de insulina en páncreas de los diferentes grupos experimentales por inmunofluorescencia	48
6.2.6.1 Preparación del tejido	48
6.3 Estudios de toxicidad	49
6.3.1 Ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> : Prueba de Ames	49
6.3.2 Ensayo de genotoxicidad <i>in vivo</i> : Ensayo de Micronúcleos	50
6.3.3 Ensayo de toxicidad aguda: Prueba TG 423	51



	PÁGINA
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>106</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>107</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>119</b>
11.1 Soluciones y reactivos para las mediciones antioxidantes	119
11.2 Soluciones para la inmunofluorescencia	119
11.3 Soluciones para la Prueba de Ames	120
<b>12. APÉNDICE</b>	<b>123</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Incremento de personas con diabetes a lo largo de los años	2
Figura 2. Señalización para la secreción de insulina en la células- $\beta$	4
Figura 3. Señalización de la insulina	6
Figura 4. Producción y eliminación de EROs	15
Figura 5. Posibles blancos para disminuir EROs en las células	15
Figura 6. Prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil en México	19
Figura 7. Tendencia en la prevalencia de sobrepeso (incluyendo obesidad) en adulto para determinados países De la OCDE	19
Figura 8. Modelo hipotético para el control de la repuesta inflamatoria en tejido adiposo e hígado	21
Figura 9. Diseño experimental general	32
Figura 10. Esquema de tratamiento para el modelo de rata diabética inducida con estreptozotocina	39
Figura 11. Esquema de tratamiento para el modelo de ratón obeso inducido con dieta alta en grasa	41
Figura 12. Curva de calibración usada para cuantificar la concentración de proteína	45
Figura 13. Ensayo de CAT	46
Figura 14. Ensayo de SOD	47
Figura 15. Ensayo de GPx	48
Figura 16. Ruta de síntesis para la obtención de DOAcQ	53
Figura 17. Síntesis de los regioisómeros <b>3</b> y <b>4</b>	55
Figura 18. Cromatograma de HPLC de la mezcla de diastereoisómeros	56
Figura 19. Síntesis del compuesto diesterificado	57
Figura 20. Diferencia en Peso (g) de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina	62
Figura 21. Perfil de lípidos de los diferentes grupos experimentales	65
Figura 22. Perfil hepático y renal de los diferentes grupos experimentales	65
Figura 23. Histología de hígado de los diferentes grupos experimentales	66

	PÁGINA
Figura 24. Histología de riñón de los diferentes grupos experimentales	67
Figura 25. Histología de bazo de los diferentes grupos experimentales	68
Figura 26. Histología de páncreas de los diferentes grupos experimentales	69
Figura 27. Inmunohistoquímica de Insulina en páncreas	71
Figura 28. Curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad de la CAT	72
Figura 29. Efecto de DOAcQ sobre la actividad de CAT	73
Figura 30. Efecto de DOAcQ sobre la actividad de GPx	74
Figura 31. Curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad de SOD	75
Figura 32. Efecto de DOAcQ sobre la actividad de SOD	75
Figura 33. Gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR	78
Figura 34. Peso corporal semanal de los diferentes grupos experimentales en el modelo de ratón obeso inducido con dieta	80
Figura 35. Fotos representativas de los diferentes grupos experimentales del modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica	82
Figura 36. Peso del páncreas de los diferentes grupos experimentales	83
Figura 37. Peso del bazo de los diferentes grupos experimentales	84
Figura 38. Peso del riñón de los diferentes grupos experimentales	85
Figura 39. Peso del hígado de los diferentes grupos experimentales	86
Figura 40. Peso del tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales	87
Figura 41. Fotografías de los órganos de los diferentes grupos experimentales del modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica	88
Figura 42. Cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales del modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica	89
Figura 43. Kilocalorías consumidas de los diferentes grupos experimentales	90

	PÁGINA
Figura 44. Niveles de glucosa en ayuno de los grupos experimentales	91
Figura 45. Expresión de ARNm de IL-6 en tejido adiposo	92
Figura 46. Expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ en tejido adiposo	93
Figura 47. Expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$ en tejido adiposo	94
Figura 48. Expresión de ARNm de IL-6 en el hígado	95
Figura 49. Expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ en el hígado	96
Figura 50. Expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$ en el hígado	97
Figura 51. Cuantificación de revertantes en la cepa TA 98, con y sin la fracción S9	100
Figura 52. Cuantificación de revertantes en la cepa TA 100, con y sin la fracción S9	100
Figura 53. Cuantificación de revertantes en la cepa TA 100, con y sin la fracción S9	101
Figura 54. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la piranocumarina angular	123
Figura 55. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la piranocumarina lineal	124
Figura 56. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la <i>cis</i> -quelactona	125
Figura 57. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del producto esterificado en la posición 4'	126
Figura 58. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del producto esterificado en la posición 3'	127
Figura 59. Espectro de HMBC del producto esterificado en la posición 4'	128
Figura 60. Espectro de HMBC del producto esterificado en la posición 4' (continuación)	129
Figura 61 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del producto diesterificado	130
Figura 62. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de DOAcQ	131
Figura 63. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de DOAcQ	132
Figura 64. Espectro de masas de alta resolución de DOAcQ	133

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Mortalidad en México por diabetes	2
Tabla 2. Costos directos, costos indirectos y costos totales anuales atribuibles a la diabetes en México	3
Tabla 3. Eficacia clínica de la terapia farmacología para el tratamiento de DM2 cuando se usa monoterapia	9
Tabla 4. Modelos animales para diabetes mellitus	16
Tabla 5. Clasificación del IMC	18
Tabla 6. Sistemas isocráticos	35
Tabla 7. Sistemas no isocráticos	36
Tabla 8. Grupos experimentales y tratamientos	38
Tabla 9. Composición de las dietas	40
Tabla 10. Modelos murinos de obesidad	40
Tabla 11. Oligos utilizados para la PCR punto final	44
Tabla 12. Soluciones para desparafinar las muestras	48
Tabla 13. Peso después de 15 dosis de administración (15 mg/kg) en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina	61
Tabla 14. Efecto de la administración de 15 dosis de DOAcQ (15 mg/kg) en la glucosa de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina en ayuno	64
Tabla 15. Efecto de la administración de DOAcQ (15 mg/kg) en la actividad de enzimas antioxidantes de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina	77
Tabla 16. Expresión relativa de los genes	79
Tabla 17. Índice de mutagénico	101
Tabla 18. Efecto del compuesto DOAcQ en la Formación de Micronúcleos	103
Tabla 19. Peso de los diferentes grupos experimentales en la prueba TG 423	103

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) y la Obesidad son trastornos metabólicos que tienen características en común entre las cuales tenemos inflamación crónica, hiperglucemia y resistencia a insulina. La exposición crónica a hiperglucemia genera problemas en el organismo como la destrucción de las células- $\beta$  del páncreas. Se han postulado diferentes mecanismos que exponen a la lipotoxicidad y a la glucotoxicidad como factores importantes en la apoptosis y deterioro del páncreas. Las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$  son identificadas como probables blancos terapéuticos que mitigarían el progresivo deterioro de células- $\beta$  observado en la diabetes, de igual forma tanto TNF- $\alpha$ , IL-6 y PPAR- $\gamma$  son blancos importantes en el tratamiento de la obesidad. Otro factor que demuestra un vínculo entre diabetes y obesidad es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Debido a que hay un incremento en la actividad de las rutas metabólicas, la producción de EROs también se encuentran aumentados y estas especies elevadas participan de manera importante en el desarrollo de complicaciones diabéticas.

La OMS estima que existen 346 millones de personas con diabetes en el mundo y que esta cifra se incrementará en los años venideros. En nuestro país se estima que este ocupará entre el sexto y séptimo lugar en la prevalencia de diabetes en el mundo para el 2025. Por otro lado, en 2014 más de 1900 millones de adultos de 18 años o más tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos. Y dado que la obesidad es un factor de riesgo para desarrollar diabetes se debe de tener en consideración que México ocupa de los primeros lugares en obesidad a nivel mundial.

En México el uso de la medicina tradicional es muy ocupado, siempre es importante evaluar con rigor científico si estas plantas medicinales tienen las actividades farmacológicas que se les atribuye, la misma OMS recomienda la investigación de plantas para la obtención de nuevas moléculas de interés biológico.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una mezcla enantiomérica de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona (DOAcQ) enriquecida con la estereoquímica *R,R* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) y en un modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica, para buscar su efecto hipoglucemiante, antioxidante y a nivel molecular si es capaz de regular genes relacionados con diabetes y obesidad.

La mezcla enantiomérica 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona fue obtenida por medio de síntesis química que involucró diferentes etapas de reacción. Una vez se obtuvo a DOAcQ se formaron diferentes grupos de estudio de roedores, incluyendo controles y se compararon con fármacos de referencia.

Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la NOM-033-Z00-1995 y del suero se evaluó el perfil bioquímico; se realizó un análisis histopatológico con tinción de Hematoxilina y Eosina de distintos tejidos, así como se determinó la asociación de genes relacionados con diabetes y obesidad en hígado (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6).

Los resultados obtenidos mostraron que DOAcQ tiene efectos hipoglucemiantes, además disminuyó el estrés oxidativo por incrementar la actividad de enzimas antioxidantes, en el modelo de ratón obeso ayudó a disminuir su incremento en peso, además de regular moléculas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , y PPAR- $\gamma$  y por último no se encontraron efectos tóxicos. Por lo tanto, DOAcQ podría servir como un nuevo fármaco para el tratamiento del síndrome metabólico.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) and obesity are metabolic disorders groups that have common characteristics among which are chronic inflammation, hyperglycemia and insulin resistance. Chronic exposure to hyperglycemia causes problems in the body such as the destruction of  $\beta$ -cells in the pancreas. Different mechanisms have been postulated as important factors in apoptosis of  $\beta$ -cell and impairment of pancreas that expose lipotoxicity and glucotoxicity as main reason. The pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , are identified as likely therapeutic targets that would mitigate the progressive deterioration of  $\beta$ -cells observed in diabetes, both TNF- $\alpha$ , IL-6 and PPAR- $\gamma$  are targets in the treatment of obesity. Another factor demonstrating a link between diabetes and obesity is the overproduction of reactive oxygen species (ROS). Because there is an increase in the activity of metabolic pathways ROS production is increased and these ROS are involved significantly in the development of diabetic complications.

WHO estimates that there are 346 million people with diabetes worldwide and this figure will increase in the coming years. It is estimated that our country will occupy between the sixth and seventh in the prevalence of diabetes in the world by 2025. In 2014 more than 1900 million adults 18 years or older were overweight, of which more than 600 million were obese.

In Mexico the use of traditional medicine is very busy, it is always important to assess scientifically whether these medicinal plants have pharmacological activities attributed to them, the same WHO recommends research on plants for producing new molecules of biological interest.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the hypoglycemic effect of an enantiomeric mixture of 3',4'-di-*O*-acetyl-*cis*-quelactona enriched with the stereochemistry *R,R* in diabetic rats induced with streptozotocin (STZ) and in obese-induced model by diet, looking whether DOAcQ has hypoglycemic effect, antioxidant effect and if it is able to regulate genes that play a important rol in diabetes and obesity.

A enantiomerically enriched mixture of 3',4'-di-O-acetyl-*cis*-quellactone was obtained by chemical synthesis which involved different reaction steps. Once the compound was obtained, this was evaluated in the animal models, different groups were performed and was compared with reference drugs.

The animals were sacrificed and serum biochemical profile was assessed; histopathological analysis with hematoxylin and eosin staining of different tissues was performed, as well as the determination of genes in liver by PCR (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6).

The results showed that DOAcQ has hypoglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats, also decreased oxidative stress by increasing the activity of antioxidant enzymes and is able to reduce the increase in weight in obese mouse model, besides regulating molecules such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and PPAR- $\gamma$ . Therefore DOAcQ could serve as a new drug for the treatment of metabolic syndrome

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Diabetes

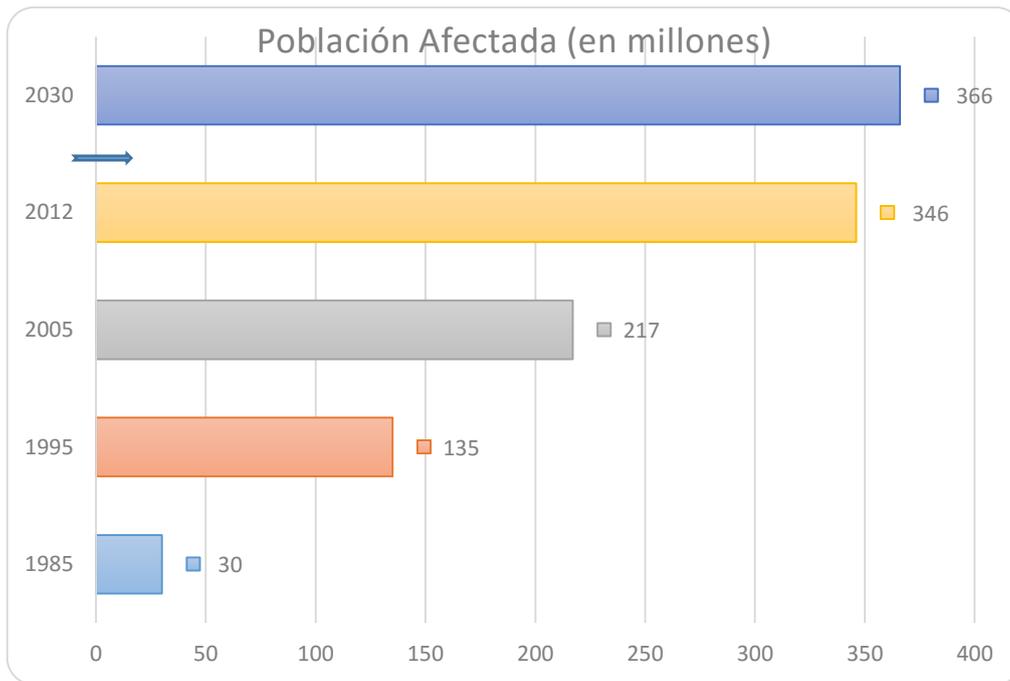
Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos que tienen como característica en común la hiperglucemia. La exposición crónica a la hiperglucemia aumenta los problemas en el organismo debido a la destrucción de las células- $\beta$  del páncreas y generando complicaciones diabéticas. Las células- $\beta$  pancreáticas y su producto de secreción la insulina, son importantes en la fisiopatología de la diabetes. La diabetes es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se estima que existen 346 millones de personas con diabetes alrededor del mundo, el 80 % de los diabéticos viven en países de bajos y medianos ingresos (OMS., 2015). Además se estima que hay millones de personas con intolerancia a la glucosa (Lo cual se define como hiperglucemia con valores intermedios entre normal y diabetes) las cuales tienen predisposición a desarrollar diabetes. En 2014, 4.9 millones de personas murieron por consecuencia de altos niveles de azúcar en sangre y se estima que para el 2030 esta cifra se duplicará. La OMS atribuye el aumento de casos de diabetes al crecimiento de la población, la dieta y al sedentarismo del estilo de vida.

### 1.1.1 Estadísticas y costos de la diabetes

En los Estados Unidos de América, la American Diabetes Association (ADA) ha estimado que el costo total de diabetes en 2002 fue de 132 billones de dólares.

En 2014, uno de cada 9 dólares gastado en el cuidado de salud fue gastado para alguien diagnosticado con diabetes (Leena y Jill, 2010).

Las cifras presentadas son alarmantes porque el incremento en la prevalencia de diabéticos es cada vez mayor (Figura 1). En 1985, un estimado de 30 millones de personas alrededor del mundo tenía diabetes. En 1995, esta cifra había incrementado a 135 millones y para el 2005 la cifra alcanzó un estimado de 217 millones (Simon *et al.*, 2005). Como ya se mencionó, a la fecha son alrededor de 347 millones de personas reportadas con diabetes.



**Figura 1.** Incremento de personas con diabetes a lo largo de los años

En México, la diabetes se ha mantenido como la segunda causa de mortalidad desde el 2004 hasta el 2013 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Mortalidad en México por diabetes

<u>Año</u>	<u>Porcentaje de Muertes</u>
<b>2004</b>	13.15
<b>2005</b>	13.56
<b>2006</b>	13.84
<b>2007</b>	13.71
<b>2008</b>	14.01
<b>2009</b>	13.76
<b>2010</b>	14.01
<b>2011</b>	13.68
<b>2012</b>	14.12
<b>2013</b>	14.34

México ocupaba el séptimo lugar mundial en la prevalencia de diabetes, es un dato alarmante y más aún cuando las proyecciones de los especialistas internacionales refieren que para el año 2025 ocupará el sexto lugar. El Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO) señala que, además del impacto de esta enfermedad en la mortalidad y la calidad de vida de los pacientes con diabetes, este padecimiento representa una enorme carga económica tanto para el individuo, su familia, el sistema de salud y la sociedad en general (Tabla 2) (Arredonde y De icaza, 2011).

**Tabla 2.** Costos directos, Costos indirectos y Costos totales anuales atribuibles a la diabetes en México, 2010.

ITEM	SSA <sub>1</sub>	IMSS <sub>2</sub>	ISSSTE <sub>3</sub>	USUARIOS <sub>4</sub>	Seguros P.	TOTAL
<b>COSTOS DIRECTOS (CD)</b>	325,172	443,279	175,607	249,619	NA	
<b>Consulta/ Diagnóstico</b>	7,101,113	16,029,089	3,750,300	31,061,914	1,792,032	59,734,448
<b>Medicamentos</b>	15,813,331	35,749,875	8,351,475	69,234,743	3,994,310	133,143,734
<b>Hospitalización</b>	4,747,670	10,716,748	2,507,381	20,767,414	1,198,118	39,937,331
<b>Complicaciones</b>	13,125,433	29,627,572	6,931,914	57,413,683	3,312,326	110,410,928
<b>SUBTOTAL CD</b>	40,787,547	92,123,384	21,541,070	178,477,754	10,296,786	343,226,541
<b>COSTOS INDIRECTOS (CI)</b>						
<b>Costos por mortalidad prematura</b>	2,267,624	5,326,703	1,217,070	10,811,632	NA	19,623,029
<b>Costos por discapacidad permanente</b>	47,188,661	110,847,272	25,326,919	225,842,994	NA	409,205,846
<b>Costos por discapacidad temporal</b>	712,395	1,673,432	382,353	3,603,879	NA	6,372,059
<b>SUBTOTAL</b>	50,168,680	117,847,407	26,926,342	240,258,505	NA	43,520,093
<b>COSTOS TOTALES</b>	90,956,227	209,907,791	48,467,412	429,033,045	NA	778,427,475

1= Secretaría de Salud; 2= Instituto Mexicano del Seguro Social; 3= Instituto de servicios y Seguridad Social para los trabajadores del Estado; 4= Gastos del bolsillo de usuarios en instituciones privadas de salud; NA= No Aplica.

El entendimiento de la función y las señales que son activadas y/o reprimidas en las células en respuesta a la actividad de insulina o aquellas señales que participan en la secreción de esta hormona, tanto en personas sanas y pacientes con DM ayudaría a entender más sobre la patología y los posibles blancos, que desempeñarían una función importante para la prevención y tratamiento de la diabetes.

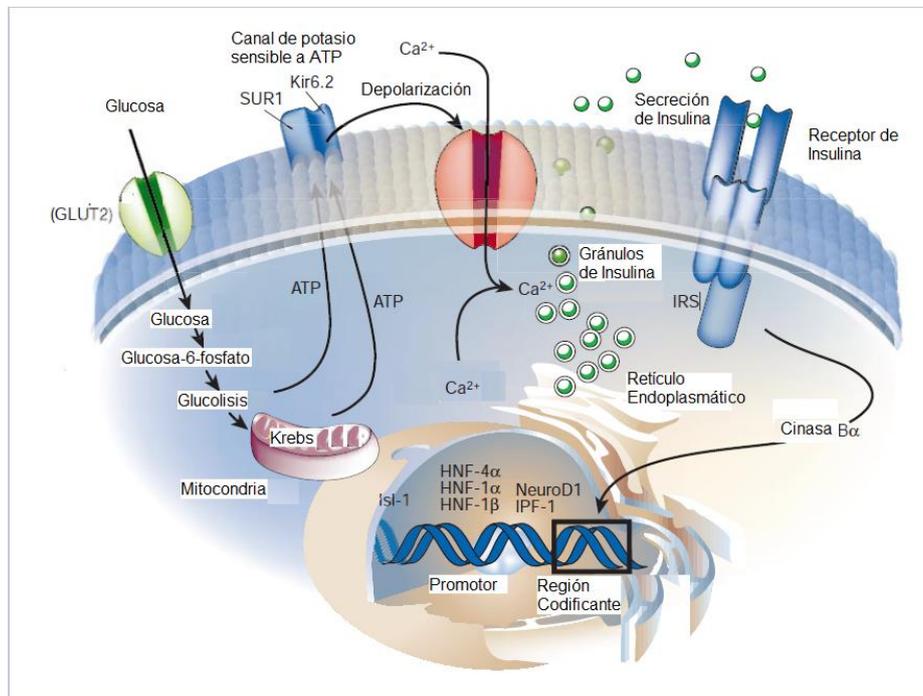
## 1.2 Insulina

La insulina es la hormona anabólica más potente conocida, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, mientras inhibe su degradación. La insulina estimula la entrada de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos a la célula, incrementa la expresión o actividad enzimática que cataliza la síntesis de glucógeno e inhibe la actividad o expresión de aquellas que catalizan su degradación.

Las células- $\beta$  del páncreas son las encargadas de censar los niveles de glucosa, por lo que son las células más activas encaminadas a la absorción de glucosa. La entrada de glucosa por los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2) conduce a un incremento de la cantidad de adenosina trifosfato (ATP), lo que lleva al cierre de canales de potasio sensible a ATP que provoca la

depolarización de la membrana y activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que incrementa los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y permite la secreción de insulina. En las células- $\beta$  existen receptores de insulina que sirven para modular la expresión de diferentes genes involucrados en la producción de la insulina y otros genes importantes para las células- $\beta$  (Figura 2).

Las concentraciones de insulina son normalmente determinadas por un control de retroalimentación, el cual es responsable para mantener los niveles de glucosa en un estado normal. La sensibilidad de las células- $\beta$  pancreáticas a la glucosa es determinada por la sensibilidad del tejido periférico a la acción de la insulina, sujetos con resistencia a la insulina presentan altos niveles de insulina y un incremento en la secreción de insulina, que aquellos sujetos insulino-sensibles.



**Figura 2.** Señalización para la secreción de insulina en las células- $\beta$

La secreción normal de insulina muestra una rápida respuesta a glucosa. El incremento en la secreción de insulina que ocurre después de una administración intravenosa de glucosa es virtualmente instantáneo; incluso después de una ingestión oral, el incremento en la secreción de insulina ocurre dentro de minutos. Manifestaciones tempranas de la disfunción en las células- $\beta$  incluyen retraso en

su secreción, una respuesta menor a la glucosa e irregularidades en los pulsos de la secreción de insulina (Graeme y Kenneth, 2001).

Cuando la insulina activa a su receptor incrementa la entrada de glucosa a las células por estimular la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) de sitios intracelulares a la superficie celular. Más del 75 % de la entrada de glucosa mediado por insulina ocurre en músculo esquelético, mientras que en tejido adiposo solo ocurre un 10 % donde la energía es almacenada como triglicéridos. A pesar de esto, ratones con knockout del receptor de insulina en músculo esquelético tienen una tolerancia a la glucosa normal, mientras aquellos ratones con knockout en adipocitos presentan intolerancia a la glucosa demostrando que el tejido adiposo participa de una forma importante en la homeostasis de la glucosa.

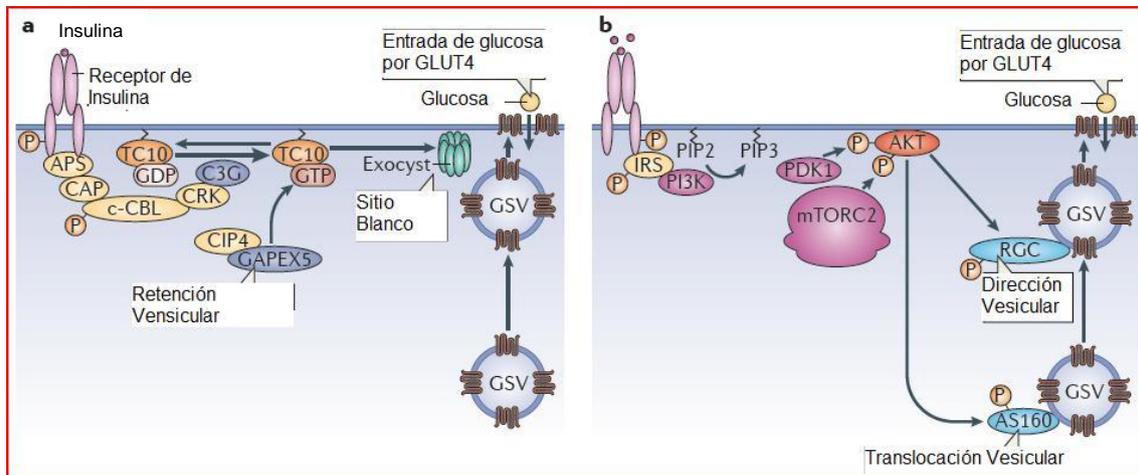
### **1.2.1 Receptores de insulina**

Los receptores de insulina pertenecen a una subfamilia de receptores tirosina cinasa, que incluyen al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) y al receptor relacionado al receptor de insulina (IRR). Estos receptores son proteínas tetraméricas que consisten de 2 alfa y 2 beta subunidades que funcionan como proteínas alostéricas, en las cuales la subunidad  $\alpha$  inhibe a la tirosina cinasa de la subunidad  $\beta$ . La unión de insulina a la subunidad  $\alpha$  conduce a la desaparición de la represión de la actividad cinasa de  $\beta$ , seguido de una transfosforilación y un cambio conformacional que incrementa la actividad cinasa de la subunidad  $\beta$ . Así es como da inicio la cascada de señalización de la insulina.

### **1.2.2 Señalización insulínica y el tráfico de GLUT4**

La insulina regula el metabolismo de energía por iniciar muchas cascadas de señalización que controlan el crecimiento celular y la sobrevivencia, así como la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos. En la Figura 3 se puede observar el mecanismo para que GLUT4 se fusione a la membrana celular, esto requiere de la movilización de compartimientos de vesículas intracelulares, en las cuales se encuentran estos transportadores. Todo esto se realiza mediante la regulación

de diferentes proteínas que son activadas en la células debido al estímulo de la insulina (Leto *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Señalización de la insulina. **a)** La activación del receptor de insulina genera una transfosforilación lo que promueve el reclutamiento de proteínas adaptadoras como APS (Proteína adaptadora con dominios de homología a pleckstrina (PH) y homología a Src 2 (SH2). CAP (Proteína asociada a c-CBL) y c-CBL, este último es fosforilado, lo que permite el reclutamiento de la proteína adaptadora CRK y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) C3G a la membrana plasmática, donde C3G activa a la pequeña GTPasa TC10. La unión de GTP a TC10 promueve la interacción con el complejo exocitótico, creando un sitio blanco para GLUT4, que están almacenados en vesículas (GSV). TC10 también activa a la proteína 4 que interactúa con CDC42 (CIP4), la cual está asociada con el GEF de RAB5 y RAB31 (GAPEX5). La translocación de GAPEX5 a la superficie celular modula la activación de sus GTPasas blancas, las cuales participan en la retención y translocación de los GSV.

**b)** Simultáneamente los receptores de insulina inician la cascada de señalización dependiente de fosfoinositido-3-cinasa (PI3K) por la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS), así produciendo sitios de anclaje para PI3K. Esta cinasa convierte el fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual sirve como una plataforma para el reclutamiento de la cinasa dependiente de fosfoinositidos 1 (PDK1) y AKT. Cuando AKT es fosforilado por PDK1 y mTORC2, pasa a una forma activa. AKT promueve la exocitosis de GSV por fosforilación e inactivación de 2 proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs), AS160 y el complejo RAL-GAP (RGC, que consiste de 1 subunidad regulatoria (RGC1) y una subunidad catalítica (RGC2)), los cuales regulan GTPasas que están participando en la retención y dirección de los GSV, respectivamente.

El defecto en la secreción y transmisión de señales insulínicas trae como consecuencia el problema de la hiperglucemia y dan origen a distintos tipos de diabetes.

### **1.3 Tipos de diabetes**

Existen 2 principales formas de diabetes. La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) y la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), en años recientes se han tenido que redefinir tanto sus nombres como sus definiciones ya que anteriormente se pensaba que cada tipo de diabetes afectaba solamente a una parte exclusiva de la población, pero no es de esta forma. Además de estos tipos de diabetes existen otras menos comunes como son la diabetes gestacional, diabetes debido a defectos genéticos, obtenida por infecciones, endocrinopatías, sustancias químicas, y por problemas inmunes, entre otros.

#### **1.3.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)**

La DM1 resulta de una deficiencia absoluta de insulina debido a una destrucción auto inmunológica de las células- $\beta$  productoras de insulina. Aunque la consecuencia de la destrucción autoinmunes de las células- $\beta$  pancreáticas son claras, las causas no lo son y la identificación de los factores ambientales que desencadenan la destrucción de estas células en niños, adolescentes y adultos genéticamente susceptibles permanece aún sin respuesta.

#### **1.3.2 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)**

La DM2 es un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizado por 2 defectos metabólicos interrelacionados: resistencia a la insulina, disfunción en la secreción de insulina por la células- $\beta$  del páncreas o ambos (Graeme y Kenneth, 2001). La DM2 tiene grados variables de resistencia a la insulina y disfunción celular, las cuales juntas conducen a la hiperglucemia.

#### **1.3.3 Diabetes gestacional**

Se caracteriza por presentar estados de hiperglucemia, que aparecen en el curso del embarazo. Esto aumenta el riesgo de presentar diabetes clínica (60 %

después de 15 años). La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo, persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.

#### **1.4 Diagnóstico de la diabetes**

Se establece el diagnóstico de prediabetes cuando la glucosa de ayuno es igual o mayor a 100 mg/dL y menor o igual de 125 mg/dL (personas en estos rangos muestran un alto riesgo a padecer diabetes) y/o cuando la glucosa 2 h post-carga oral de 75 g de glucosa anhidra es igual o mayor a 140 mg/dL y menor o igual de 199 mg/dL (intolerancia a la glucosa).

Se establece el diagnóstico de diabetes si se cumple cualquiera de los siguientes criterios: presencia de síntomas clásicos (poliuria, polifagia y polidipsia) y una glucemia plasmática casual  $\geq 200$  mg/dL; glucemia plasmática en ayuno  $\geq 126$  mg/dL; o bien glucemia  $\geq 200$  mg/dL a las 2 h después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, sin olvidar que en la prueba de ayuno o en ausencia de síntomas inequívocos de hiperglucemia, estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba en un día diferente (NOM-015-SSA2-2010). En caso de que se confirme el diagnóstico de diabetes se debe empezar con el tratamiento adecuado para contrarrestar los efectos negativos de la hiperglucemia.

#### **1.5 Tratamiento de la diabetes**

Aunque el ejercicio moderado, un cambio en la dieta y la pérdida de peso claramente muestran ser efectivos en el riesgo de diabetes, no todos los pacientes son capaces de adecuarse a este estilo de vida. Por lo que se utilizan los hipoglucemiantes. Estos son agentes que pueden incrementar la secreción de insulina, mejorar la acción de la insulina, o retrasar la absorción de carbohidratos. En el caso del tratamiento para DM1 se necesita de la administración de insulina para su control.

Los hipoglucemiantes orales son exclusivos para el tratamiento de la DM2. Estos medicamentos están compuestos de distintas clases de fármacos que incluyen a las sulfonilureas, no-sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de  $\alpha$ -glucósidos, inhibidores de SGL2 y numerosas combinaciones en el tratamiento.

La eficacia clínica de la monoterapia de fármacos para el tratamiento de la DM2, varía dependiendo de muchas variables, entre ellas peso, edad, y condición de salud, etc, (Tabla 3). A continuación se explicarán los fármacos utilizados para el tratamiento de la DM.

**Tabla 3.** Eficacia clínica de la terapia farmacológica para el tratamiento de DM2, cuando se usa una monoterapia

Tipo de Fármaco	Rango de Eficacia (A1c)	Lípidos	Peso	Mayor efecto adverso
<b>Secretagogos</b>				
<b>Sulfonilurea</b>	0.5-1.5	No afecta	Aumenta	Hipoglucemia
<b>Meglitinidas</b>	0.5-1.5	No afecta	Aumenta	Hipoglucemia
<b>Biguanidas</b>				
<b>Metformina</b>	1-1.5	↓ TG ↓ LDL ↑ HDL	Disminuye	Disturbios GI
<b>Tiazolidinedionas</b>	0.5-1.5		Incrementa	Retención F.
<b>Pioglitazona</b>		↓TG ↑DL ↑HDL		
<b>Rosiglitazona</b>		↓TG ↑DL ↑HDL		
<b>Inhibidor de α-glucosidasa</b>	0.4-1.0	No afecta	Neutral	Disturbios GI
<b>Agonista del receptor GLP-1</b>	0.5-1.5	↓TG ↑HDL	Disminuye	Disturbios GI
<b>Inhibidor de DPP-4</b>	0.6-1.5	Neutral	Neutral	URI
<b>Pramlintida</b>	0.5-1.0		Disminuye	Disturbios GI

## 1.5.1 Sensibilizadores de insulina

### 1.5.1.1 Biguanidas

Son agentes que tienen acciones múltiples y son consideradas como sensibilizadores de insulina. La metformina es el único agente en esta clase que está actualmente viable y ha disfrutado de un extenso uso por muchos años.

El mecanismo de acción de la metformina no está elucidado, pero se sabe que es requerida la activación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), para inhibir la producción de glucosa en el hígado mediante la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis, además la metformina mejora la sensibilidad a insulina en músculo esquelético.

### 1.5.1.2 Tiazolidinedionas

Han sido usadas clínicamente por 19 años. Se ha demostrado que las tiazolidinedionas (TZD) alteran la transcripción de genes en adipocitos por activación de los receptores PPAR-γ. Con la modulación de estos genes el

metabolismo de ácidos grasos libres es afectado. Lo cual es reflejado como en la reducción de los niveles de ácidos grasos libres, lo que aumenta la señalización de los receptores de insulina en músculo esquelético.

## **1.5.2 Secretagogos**

### **1.5.2.1 Sulfonilureas**

Estos fármacos son los primeros agentes orales introducidos para el tratamiento de DM2 y han sido usados desde 1950. El mecanismo por el cual aumentan la secreción de insulina es iniciado por la unión de los agentes al receptor de sulfonilureas en células- $\beta$  pancreáticas. Lo que promueve la depolarización celular y por lo tanto aumenta la secreción de insulina (Cefalu., 2007).

### **1.5.2.2 Secretagogos no sulfonilureas**

Entre los agentes no-sulfonilureas a la venta para uso clínico están repaglinida, mitiglinida y nateglinida, los cuales estimulan la liberación de la insulina por una rápida asociación-disociación al canal de  $K^+$  sensible a ATP. El bloqueo de los canales de  $K^+_{ATP}$  en el páncreas de las células- $\beta$  estimula la liberación de insulina.

## **1.5.3 Inhibidores de la absorción de glucosa**

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa son agentes que tienen como mecanismo de acción para retrasar la absorción de glucosa del tracto gastrointestinal. Acarbosa y miglitol son ejemplos de estos agentes, su efecto es por inhibir competitivamente la unión de oligosacáridos a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en el intestino delgado. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa disminuyen tanto la glucosa e insulina postprandrial. Son los fármacos que tienen menos control de la glucemia.

## **1.5.4 Incretinas**

Las incretinas son hormonas insulínótropas secretadas gastrointestinalmente que juegan un papel importante en la homeostasis de la

glucosa, participan en el aumento de la secreción de insulina de las células- $\beta$  y suprimen la secreción de glucagón por las células- $\alpha$ . El péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa son 2 de estas incretinas. La inyección intravenosa de GLP-1 ha mostrado a incrementar la liberación de insulina y normalizar los niveles de glucosa, inclusive en pacientes con DM2.

#### **1.5.4.1 Agonista del receptor de GLP-1**

Exenatida es un agonista para el receptor de GLP-1, además de que es resistente a dipeptidil peptidasa (DPP-4), enzima que degrada a GLP-1.

#### **1.5.4.2 Inhibidor de dipeptidil peptidasa**

GLP-1 es rápidamente degradado por la enzima DPP-4, por lo que la inhibición de DPP-4 atenúa la degradación de GLP-1 y gradualmente incrementa los niveles de GLP-1 endógeno. Sitagliptina es el único inhibidor de DPP-4 actualmente viable en la clínica.

#### **1.5.5 Inhibidores del transportador de glucosa-sodio**

Los inhibidores del transporte de glucosa-sodio fueron aprobados en Marzo de 2013. Existen pocos fármacos de este tipo. Su mecanismo de acción es sobre el riñón, este es un pieza clave en la homeostasis de la glucosa, principalmente por la reabsorción de glucosa filtrada especialmente por el transportador de sodio-glucosa 2 localizado en el túbulo proximal. Estos fármacos inhiben selectivamente a este transportador de glucosa (Safavi *et al.*, 2013).

#### **1.5.6 Terapia de insulina**

La insulina, hormona producida por las células- $\beta$  es blanco de mucha investigación tanto para el tratamiento de la diabetes como para entender los mecanismos que puedan mejorar su secreción y actividad. Es bien conocido que la fisiopatología de la DM1 involucra la destrucción autoinmune de las células- $\beta$  del páncreas, por lo que estos pacientes requieren la administración de insulina desde su inicio. En la DM2 la disfunción progresiva de las células- $\beta$  es una

característica clave de su fisiopatología, por lo que es común el uso de insulina en estos casos.

### **1.6 Hiperglucemia, citocinas y la resistencia a insulina**

Las citocinas son un grupo de proteínas con un peso entre 8 a 40,000 Da. Casi todas las células con núcleo son capaces de sintetizar estas proteínas y en consecuencia responder a ellas. Más de 200 citocinas han sido identificadas las cuales son divididas en subgrupos viz, interleucinas, factores de crecimiento, quimiocinas, interferones y hematopoyetinas. Tradicionalmente las citocinas han sido divididas en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Cuando se empezaba a estudiar la diabetes, la resistencia a la insulina y su papel en la patogénesis de la DM2, fue despreciada y como resultado la sensibilidad no fue considerada como un mecanismo potencial para la regulación de la glucosa. Recientemente se ha reinvestigado más acerca de la sensibilidad y el papel de las citocinas en la resistencia a la insulina. Este tema ha cobrado mucha fuerza, lo que ha permitido la identificación de blancos moleculares como el eje IKK (cinasa de I $\kappa$ B)/NF- $\kappa$ B para aumentar la sensibilidad de las células a la insulina. Debido a que citocinas pro-inflamatorias derivadas del tejido adiposo como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pueden causar resistencia a la insulina en modelos experimentales. Se ha señalado a la obesidad como un factor importante en la aparición de la resistencia a la insulina en DM2. Esto fue una idea revolucionaria, que una sustancia del tejido adiposo y sobreexpresada en obesidad tuviera un efecto local y sistémico en el metabolismo.

Mientras que la leptina y la adiponectina son producidas exclusivamente en adipocitos, el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, visfatin, PAI-1 son expresados en otras células. Estas citocinas y quimiocinas activan vías intracelulares que promueven el desarrollo de resistencia.

Se ha propuesto que el efecto de la hiperglucemia presentado en DM2 puede hacer que se incremente el metabolismo de glucosa que conduce a un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) mitocondrial, la cual causa un aumento en la activación de vías inflamatorias.

Las EROs y la activación de las vías inflamatorias causa resistencia a insulina debido a que muchas cinasas de serina/treonina son activadas por estímulos

inflamatorios o de estrés y contribuyen a la inhibición de señalización de insulina. Entre estas cinasas tenemos a JNK, cinasa del inhibidor de NF- $\kappa$ B (IKK), y PKC- $\epsilon$  (Kathryn y Gokhan, 2005).

Se ha mostrado que JNK promueve la resistencia a la insulina por la fosforilación de residuos de serina en IRS-1. La señalización del receptor de insulina ocurre por medio de una cascada de tirosina cinasa y es inhibido por una contra-regulación de fosforilación en residuos de serina/treonina que puede ser mediada por JNK. IKK $\beta$  causa resistencia a la insulina por medio de la activación de NF- $\kappa$ B. Este factor ha sido ligado con la disfunción celular (Steven *et al.*, 2006). Las ceramidas pueden activar vías inflamatorias incluyendo JNK y NF- $\kappa$ B. El exceso de lípidos incrementa la actividad de varias isoformas de PKC en músculo humano, lo que también puede activar al complejo IKK y por ende a NF- $\kappa$ B.

### **1.7 Hiperglucemia, citocinas y disfunción en células- $\beta$**

La hiperglucemia y la expresión de citocinas, suprimen la transcripción y secreción de la insulina además de conducir a las células- $\beta$  a apoptosis, como se ha mencionado antes en casos de DM2 aunado con obesidad, la producción de ERO y muchas citocinas pro-inflamatorias, están sobreexpresadas como son IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otras. La unión de IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  a sus receptores específicos reclutan proteínas y activan cascadas de cinasas y ligasas conduciendo a la activación del complejo IKK. Este complejo induce la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B, permitiendo la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Ortis *et al.*, 2012).

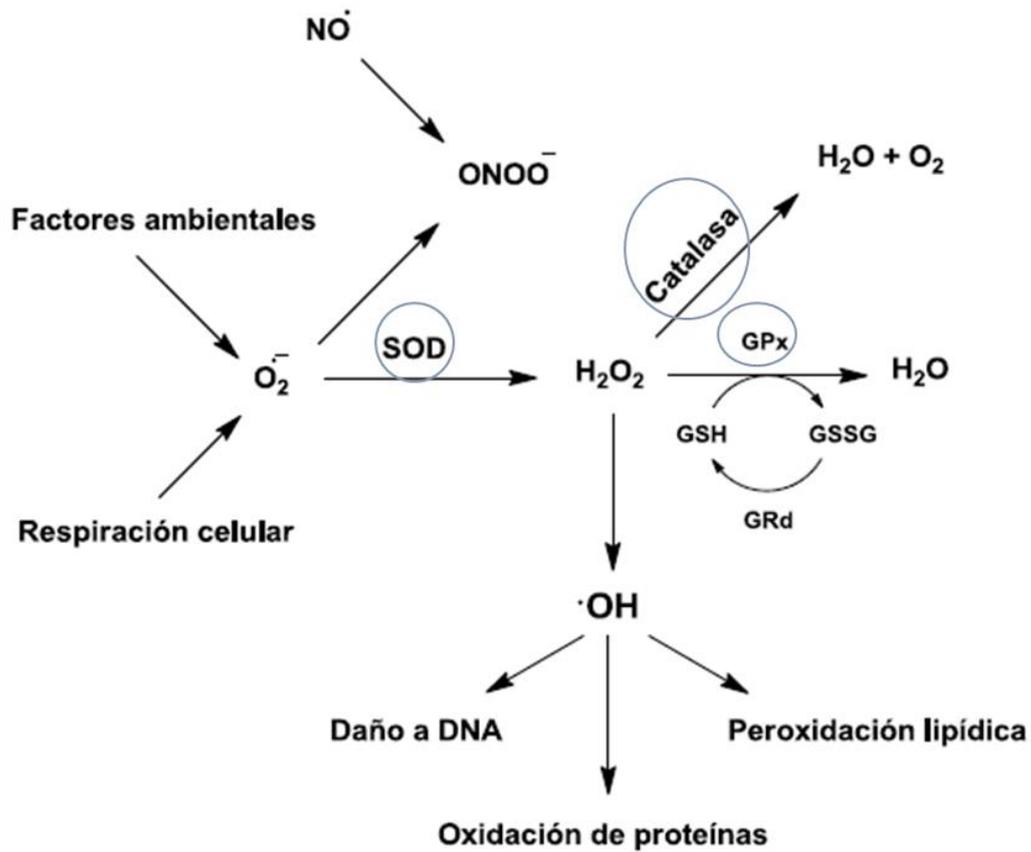
IL-1 $\beta$  a menudo sinergiza con TNF- $\alpha$  para la inducción de la muerte celular. El sinergismo de estas citocinas es un fenómeno comúnmente reportado. Lo que podría originar la apoptosis en las células- $\beta$ .

Se sabe que IL-1 $\beta$  activa la vía de la cinasa N-terminal de c-jun (JNK) en células- $\beta$ . JNK es un miembro de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés) las cuales son una familia de serina/treonina cinasas y están involucradas en la transmisión del estrés y apoptosis en muchas células. Por lo tanto, hay evidencia que JNK actúa como un regulador clave de la función celular y apoptosis de células- $\beta$ . En pacientes con DM2 la expresión

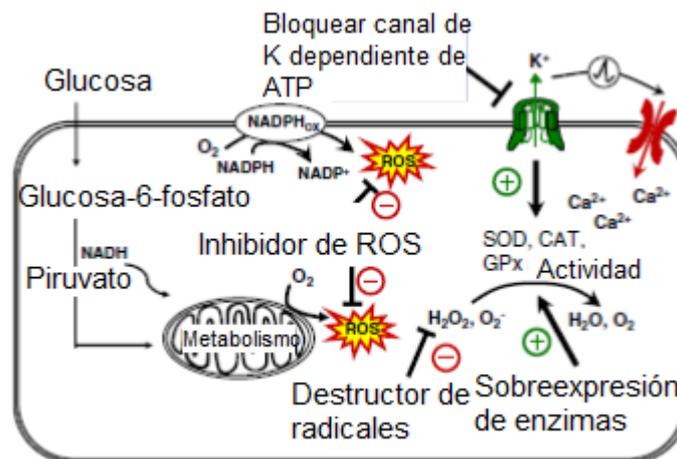
de IL-1Ra (antagonista del receptor IL-1) esta reducida y una alta concentración de glucosa induce la producción de IL-1 $\beta$  en células pancreáticas humanas, lo que lleva a la activación de NF- $\kappa$ B y a una regulación a la alza de la señalización de Fas denominado como un factor apoptótico autócrino (Monisha y Madhukar, 2012). Por lo tanto, el balance entre IL-Ra y IL-1 $\beta$  puede perderse y el funcionamiento de las células- $\beta$  en pacientes con DM2 se ve alterado.

### **1.8 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno están involucradas en la pérdida de la función de células- $\beta$  durante el desarrollo de diabetes. Debido a su baja capacidad antioxidante, las células- $\beta$  son extremadamente sensibles al estrés oxidativo. La cadena respiratoria en la mitocondria representa la principal fuente de producción de EROs. El radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> es generado por una simple reducción de electrones del oxígeno molecular en la mitocondria por el complejo I y III. El radical superóxido es una molécula reactiva que es convertida a una especie menos reactiva que es el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la Superóxido Dismutasa (SOD). Esta molécula es eliminada del organismo por la Catalasa (CAT) y la Glutación Peroxidasa (GPx). Las células producen especies reactivas de oxígeno porque son necesarias para la señalización sin embargo, los constituyentes celulares también son blancos para ser atacados por las EROs y producir estrés oxidativo (Drews *et al.*, 2010). El peróxido de hidrogeno puede ser enzimáticamente degradado a O<sub>2</sub>, sin embargo una pequeña porción puede escapar a este destino y en la presencia de metales de transición (hierro), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es transformado al radical hidroxilo (<sup>•</sup>OH) conocido como reacción de Fenton (Figura 4). La generación de <sup>•</sup>OH puede ser devastador para la célula, debido a su alta toxicidad (Reiter *et al.*, 2000). Las EROs se encuentran incrementadas en diabetes y participan en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, por lo tanto, fármacos que se encarguen en disminuir los niveles de EROs serían de gran interés en el tratamiento de la diabetes (Figura 5) (Hosseini y Abdollahi, 2012).



**Figura 4.** Producción y eliminación de EROs



**Figura 5.** Posibles blancos para disminuir EROs en las células

### 1.9 Modelos animales de diabetes

Aún persisten múltiples incógnitas acerca de los mecanismos patogénicos de una enfermedad tan prevalente hoy en día como es la DM2. El avance en la prevención y tratamiento de la misma dependerá en gran parte de la comprensión

de estos mecanismos y para ello es imprescindible seguir utilizando modelos animales.

La DM puede presentarse espontáneamente en los animales, puede también ser inducida de forma experimental y, en ocasiones, combinarse ambas causas. Tal como era de esperar, los modelos animales de diabetes son tan complejos y heterogéneos como lo es el propio síndrome metabólico en seres humanos. En el espectro patogénico de la DM2, se encuentra todo el rango de posibilidades, predominando en algunos animales la resistencia a la insulina, mientras que en el extremo opuesto, otros sufren sobre todo disfunción de las células-β. Todos pueden aportar información valiosa para la DM humana, aunque aquellos modelos donde la intolerancia a la glucosa es parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipidemia e hipertensión pueden ser de mejor utilidad.

En una primera clasificación, podemos dividir los modelos de diabetes según su mecanismo de producción en modelos espontáneos e inducidos (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

La estreptozotocina (STZ) y el aloxano son los fármacos más utilizados para el estudio de múltiples aspectos de la diabetes. Ambos fármacos ejercen su acción diabetogénica cuando ellos son administrados parenteralmente, intravenosamente, intraperitonealmente o subcutáneamente. La dosis de estos agentes requerida para la inducción de diabetes depende de la especie animal, ruta de administración y estado nutricional. De acuerdo a la dosis administrada de estos fármacos signos similares a DM1 o DM2 pueden ser inducidos (Tabla 4).

**Tabla 4.** Modelos animales para Diabetes Mellitus  
Clasificación de los modelos animales de diabetes mellitus

1. Modelos espontáneos	2. Modelos inducidos
<p><b>La rata goto-kakizaki (GK)</b>  <b>El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)</b>  <b>El ratón KK</b>  <b><i>Psammomys obesus</i> (rata israelí de la arena)</b>  <b>La rata OLETF</b>  <b>El ratón <i>db/db</i></b>  <b>El ratón <i>ob/ob</i></b>  <b>El ratón <i>Agouti</i></b>  <b>La rata Zucker (<i>fa/fa</i>)</b></p>	<p>Inducción hormonal  Administración de fármacos  Manipulación genética</p>

La citotoxicidad de estos fármacos diabetogénicos es mediada por especies reactivas de oxígeno, pero ambas drogas difieren en su mecanismo de acción. El aloxano y el producto de su reducción, ácido dialúrico establece un ciclo redox con la formación del radical superóxido. Estos radicales someten una disminución del peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$  con un simultáneo incremento de las concentraciones de calcio citosólico, lo cual causa una rápida destrucción de las células- $\beta$  pancreáticas. La dosis de aloxano más frecuente usada en ratas es 65 mg/kg (intravenosa), pero cuando es administrada intraperitonealmente (i.p.) o subcutáneamente su dosis efectiva debe ser más alta.

La estreptozotocina entra en las células- $\beta$  vía GLUT-2 y causa alquilación del ADN. Además STZ induce activación de ribosilación de poli adenosina difosfato y liberación de óxido nítrico. Como un resultado de la acción de STZ, las células- $\beta$  son destruidas por necrosis. En ratas adultas, 50 mg/kg es la dosis más común para inducir diabetes insulino dependiente. En general, las ratas son consideradas diabéticas si la concentración de glucosa en sangre en ayuno son más de 200-300 mg/dL, 2 días después de la inyección de STZ. Un modelo de DM2 puede ser inducido en ratas por una dosis intravenosa o intraperitoneal con STZ, en los primeros días de vida. A las 8-10 semanas de edad, ratas tratadas con STZ manifiestan un hiperglucemia basal moderada, una disfunción en las pruebas de tolerancia a la glucosa, y una pérdida de la sensibilidad de células- $\beta$  a la glucosa (Fröde y Medeiros, 2008).

### **1.10 Diabetes y obesidad**

Existen mucha evidencia y estudios que relacionan a la obesidad con diabetes, dado que el 90 % de los pacientes con diabetes son obesos, la obesidad es un factor de riesgo muy importante que conduce al desarrollo de padecimientos como enfermedades cardiacas, diabetes tipo 2, cáncer, entre otras enfermedades crónico degenerativas.

La Obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2015). El índice más utilizado para poder determinar si una persona está en obesidad es el índice de masa corporal o IMC, cuando el resultado es igual o superior a 30 una persona es considerada obesa, en caso de que una persona presente un IMC menor a 30 y mayor o igual

a 25 se considera en sobrepeso lo cual también es motivo de alarma porque estas personas son más vulnerables a ser obesas (Tabla 5).

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso de la persona (kg)}}{[\text{Altura de la persona (m)}]^2}$$

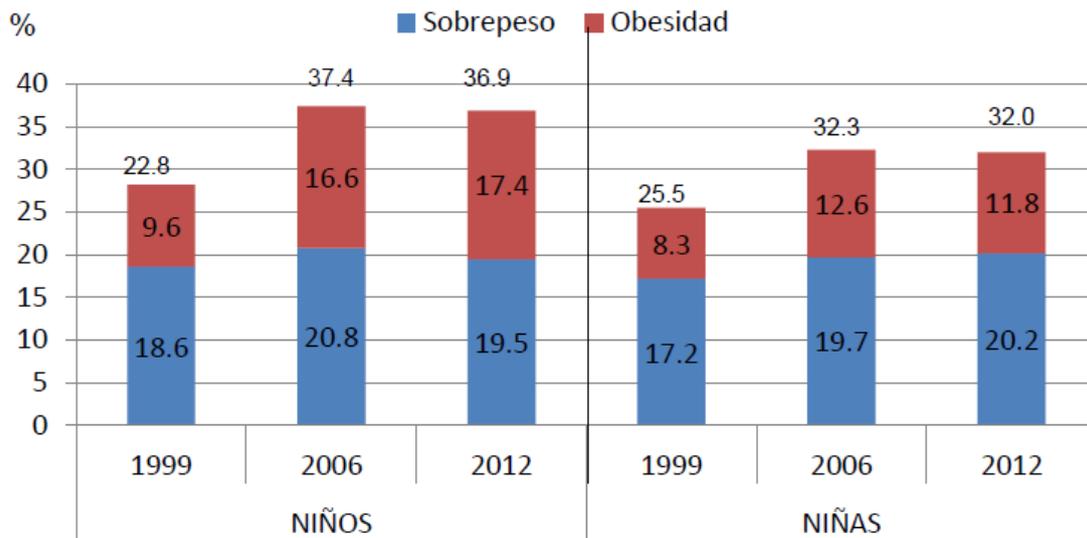
**Tabla 5. Clasificación del IMC**

<b>Insuficiencia ponderal</b>	< 18.5
<b>Intervalo normal</b>	18.5 – 24.9
<b>Sobrepeso</b>	≥ 25.0
<b>Preobesidad</b>	25.0 – 29.9
<b>Obesidad</b>	≥ 30.0
<b>Obesidad de clase I</b>	30.0 – 34.9
<b>Obesidad de clase II</b>	35.0 – 39.9
<b>Obesidad de clase III</b>	≥ 40.0

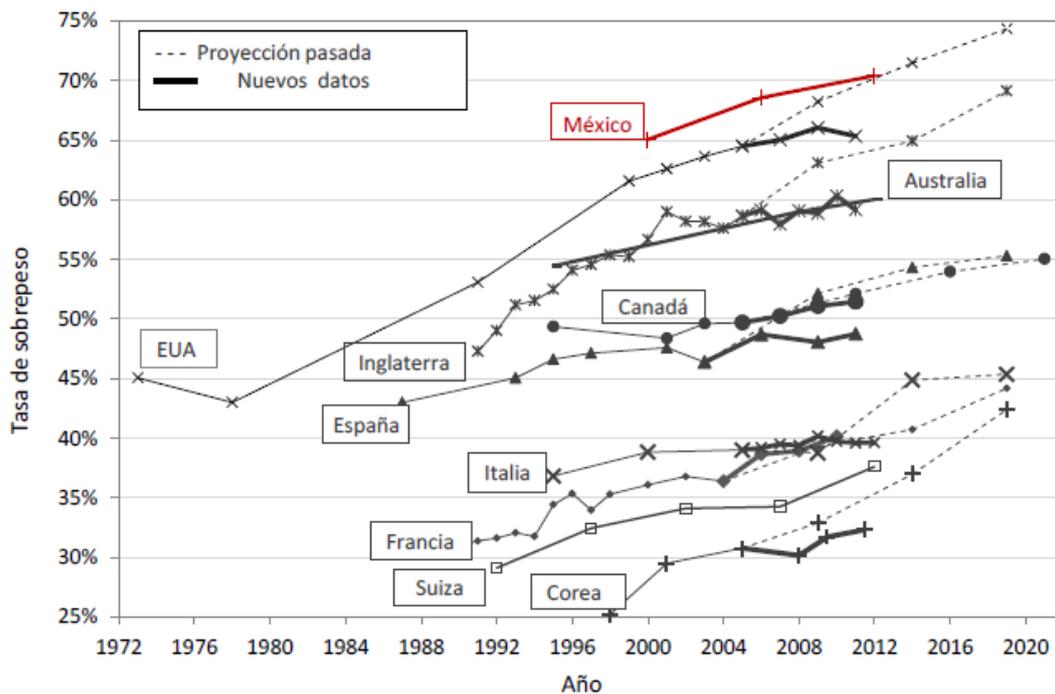
En 2008, más de 1400 millones de adultos tenían sobrepeso y más de 500 millones eran obesos. Cada año 2.8 millones de personas mueren por causa de obesidad o sobrepeso. Así también la obesidad infantil es el problema de salud pública más grave del siglo XXI, porque estos niños tienen más probabilidades de padecer enfermedades como diabetes y problemas cardiovasculares, por lo tanto están expuestos a muertes prematuras.

En México, la obesidad tiene un impacto muy importante sobre la salud pública y es que el país ocupa los primeros lugares de prevalencia en obesidad a nivel mundial. Además de la obesidad en adultos, México también ocupa el primer lugar en obesidad infantil, lo que como ya se mencionó es un factor de riesgo para su salud (Figura 6).

Más del 70 % de adultos tienen sobrepeso en México, una proporción mayor que en cualquier otro país de la OCDE (Figura 7).



**Figura 6.** Prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil en México (ENSANUT, 2012)



**Figura 7.** Tendencia en la prevalencia de sobrepeso (incluyendo obesidad) en adultos para determinados países de la OCDE

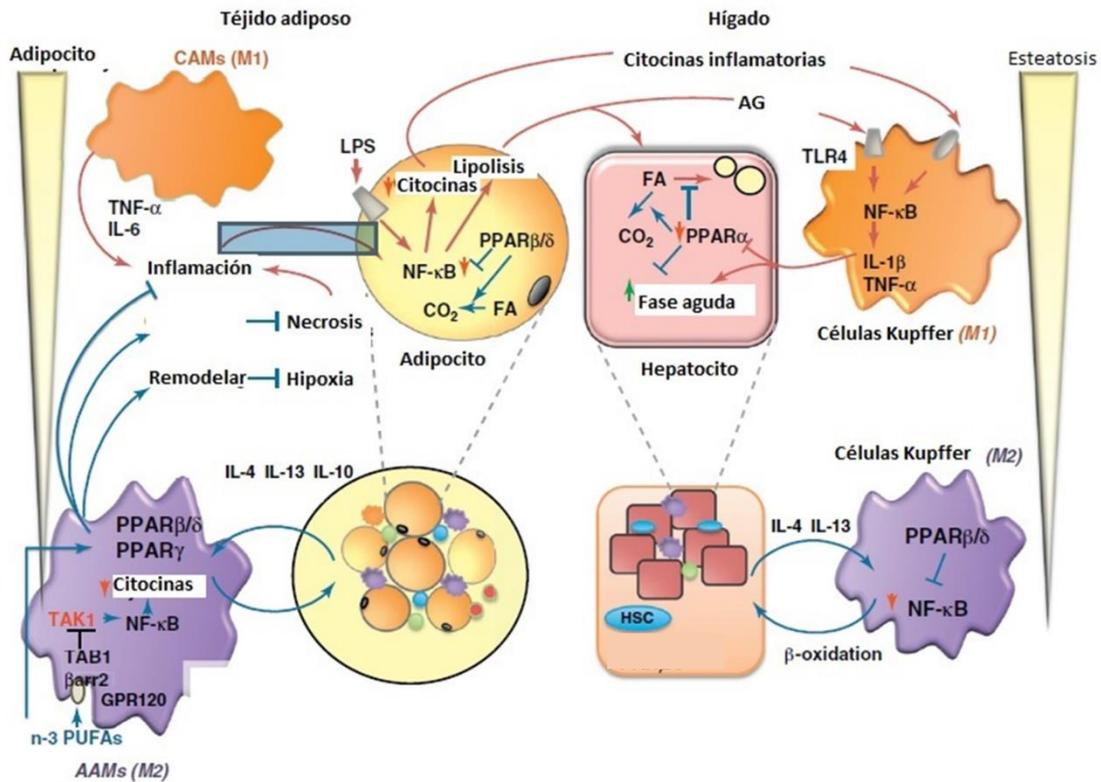
Los factores genéticos son de gran impacto en el desarrollo de la obesidad, pero para que estos sean expresados se necesita de un ambiente específico

para la expresión de obesidad. Un ejemplo claro de esto es la exposición de las personas a una dieta alta en grasa (West *et al.*, 1992).

Debido a que la diabetes y la obesidad forman parte del síndrome metabólico se encuentra una asociación muy estrecha entre ambas a nivel molecular, puesto que si existe una pérdida de balance en una de las rutas metabólicas relacionadas con diabetes u obesidad van afectar inherentemente al otro. Algunas de las relaciones moleculares son proteínas expresadas en diabetes, así también están en obesidad como por ejemplo las citocinas inflamatorias, incremento de especies reactivas de oxígeno y otros factores que participan en los problemas metabólicos.

### **1.10.1 Obesidad y citocinas inflamatorias**

La obesidad es un problema de salud caracterizado por inflamación de bajo grado. Los adipocitos y macrófagos producen citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, y expresan receptores tipo toll (TLRs). Los ácidos grasos libres están elevados durante la obesidad y sus efectos pueden ser mediados por los TLRs, cuando existe un exceso de alimentación crónica esto resulta en acumulación de lípidos hepáticos. Las lesiones en el hígado pueden ocurrir cuando los triglicéridos almacenados en los hepatocitos se sobrepasa, resultando en la activación de vías apoptóticas e inflamatorias, esto desarrolla resistencia a la insulina. Las células de Kupffer y las células de Ito se acumulan en el sitio de herida y la reparación de tejido y la fibrosis es iniciada. Las células de Kupffer tienen una participación importante en el desarrollo de hígado graso, estas células producen a la IL-1 $\beta$ , lo que resulta en la acumulación de lípidos a través de la supresión de la oxidación de ácidos grasos dependiente de PPAR- $\alpha$ , lo que agrava la esteatosis (Figura 8). Por lo tanto, la inhibición de las células de Kupffer o sus moléculas puede prevenir la esteatosis inducida por dieta, así como la resistencia a la insulina y ejerce efectos sobre la obesidad (Wahli y Michalik, 2012).



**Figura 8.** Modelo hipotético para el control de la respuesta inflamatoria en tejido adiposo e hígado.

### 1.10.2 Obesidad y especies reactivas de oxígeno

La peroxidación lipídica y la producción de  $H_2O_2$  en tejido adiposo blanco en modelos de obesidad en ratón se encuentra aumentado. Exposición *in vitro* de células 3T3-L1 a altos niveles de glucosa o ácidos grasos libres ha mostrado incrementar la producción de EROs. Muchos estudios han proporcionado evidencia que la disfunción mitocondrial está relacionada con obesidad por el incremento de la producción de EROs, lo que termina en resistencia a insulina.

Un número importante de efectos de la insulina en adipocitos puede ser mimetizado por  $H_2O_2$ . Por lo tanto, esta especie reactiva de oxígeno puede incrementar los transportadores de glucosa y consecuentemente la entrada de glucosa, así como la síntesis de lípidos. Mientras inhibe la lipólisis. Una producción controlada de EROs por estimulación de insulina puede ser benéfico, la producción sostenida de EROs puede generar una disfunción en la respuesta a la insulina. De hecho, una exposición a  $H_2O_2$  en concentraciones micromolares a los adipocitos 3T3-L1, afecta la expresión de transportadores de glucosa, lo

que reduce los transportadores de glucosa y la lipogénesis estimulada por insulina.

La sobreproducción de adipocinas inflamatorias es un rasgo del tejido adiposo disfuncional en obesidad, conduciendo a una inflamación sistémica en pacientes obesos. La inflamación y el estrés oxidativo están estrechamente interconectados, el estrés oxidativo sistémico también aparece como una huella del síndrome metabólico. El estrés oxidativo parece ser el agente principal en el desarrollo de muchas complicaciones metabólicas asociadas con obesidad. Por lo tanto, terapias diseñadas a disminuir la producción de EROs puede ser de efecto benéfico para la salud (Le Lay *et al.*, 2014).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Las plantas con potencial antidiabético

Existen muchas plantas para el tratamiento de la DM, las cuales son una riqueza oculta de productos naturales potencialmente útiles. Sin embargo, pocas plantas tradicionales antidiabéticas han recibido el estudio científico cuidadoso, a pesar de las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, que insta a que su estudio se lleve a cabo (Jung *et al.*, 2006).

En México se han documentado al menos 306 especies de 235 géneros y 93 Familias usadas como agentes hipoglucemiantes. Las familias más mencionadas son *Asteraceae* (47), *Fabaceae* (27), *Cactaceae* (16), *Solanaceae* (10) y *Lamiaceae* (9). Pero pocas de estas plantas han sido investigadas en pruebas preclínicas o clínicas. Actualmente se requiere de una investigación seria requerida para el desarrollo de nuevos medicamentos herbolarios que beneficien a la población mexicana que sufre de esta enfermedad crónica. A diferencia de Alemania y Francia, donde la fitomedicina mueve billones de dólares cada año; en México el desarrollo de medicamentos herbolarios sería aparentemente una oportunidad para los inversionistas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

### 2.2 Estudios previos realizados en el Laboratorio

En el Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales. García-Galicia realizó el estudio de la actividad hipoglucemiante de tres extractos (hexano, acetato de etilo y etanol) de *A. toluensis* en ratas diabéticas, donde encontró que la administración de extractos de *A. toluensis* tenían una tendencia a disminuir los niveles de glucosa en ratas diabéticas inducidas con STZ, a dosis de 250 mg/kg de cada extracto cada 48 h. En especial, el extracto de AcOEt disminuyó los niveles de glucosa a  $158.6 \pm 25$  mg/dL de una manera estadísticamente significativa en comparación de las ratas diabéticas de  $361.7 \pm 27.0$  mg/dL, además de acercarse a los valores de las ratas control de  $76.4 \pm 5.0$  mg/dL. La administración de estos extractos además disminuyó la expresión de citocinas pro-inflamatorias, donde nuevamente el extracto de AcOEt disminuyó la expresión de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que como ya se ha mencionado

anteriormente, participan en la disfunción y apoptosis de células- $\beta$ , así como en la resistencia a la insulina. La disminución en la expresión de estas citocinas inflamatorias también podría explicar la prevención del daño a los tejidos del páncreas que se reporte en este trabajo (García-Galicia *et al.*, 2014).

### **2.3 Estudios realizados a las cumarinas**

Las cumarinas son compuestos fenólicos presentes en frutas y vegetales de la dieta de seres humanos, son conocidos por tener propiedades antioxidantes y disminuir los lípidos. Más de 1300 cumarinas han sido identificadas como metabolitos secundarios de plantas, bacterias y hongos. Las cumarinas son principalmente clasificadas dentro de 6 tipos basados en su estructura química y se les atribuyen diferentes actividades biológicas como antivirales, anticoagulantes, antiinflamatorias, citotóxicas, antibacterianas, antidiabéticas, entre otras (Venugopala *et al.*, 2013).

La umbeliferona (UMB) (7-hidroxycumarina), un derivado de cumarina, es una benzopirona y está presente en las frutas comestibles, como la manzana Golden y la naranja amarga. La cumarina puede reducir los niveles de glucosa y se ha reportado también que la UMB tiene actividad antioxidante. En 2005, Ramesh y colaboradores en la India evaluaron a la umbeliferona una cumarina que se encuentra en la familia de Umbelliferae en un modelo de rata diabética inducido con estreptozotocina, demostraron que el tratamiento con umbeliferona disminuyó los niveles de glucosa de  $289.3 \pm 3.18$  mg/dL a  $114.3 \pm 5.71$  y aumentó los niveles de insulina cerca de los niveles normales de  $5.38 \pm 0.37$  a  $17.11 \pm 0.66$   $\mu$ U/mL en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Ramesh y Pugalendi, 2005). Un año más tarde el grupo de Ramesh encontró que la umbeliferona también puede disminuir el estrés oxidativo por medio de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes, por lo tanto la conclusión es que la umbeliferona es un potencial agente antidiabético (Ramesh y Pugalendi, 2006).

En 2009, Kumar y colaboradores en la India, evaluaron la actividad hipoglucemiante de diferentes piranocumarinas en un modelo de ratón diabético

*db/db*. Se encontró que diferentes derivados de piranocumarinas mostraron una actividad hipoglucemiante disminuyendo los niveles de glucosa de 414.37 a 252.22 mg/dL, la conclusión fue que algunos derivados tenían efecto hipoglucemiante en este modelo animal (Kumar *et al.*, 2009).

En 2009, Pari y colaboradores en la India, evaluaron el efecto de una cumarina en enzimas hepáticas claves para el metabolismo de la glucosa, en un modelo de rata diabética inducida con nicotinamida-estreptozotocina. La administración de la cumarina aumentó la actividad de enzimas como hexocinasa de  $116.21 \pm 10.36$  a  $141.57 \pm 11.11$  U/g de proteína y glucosa-6 fosfato deshidrogenasa de  $2.41 \pm 0.09$  a  $3.27 \pm 0.16$  mL U/mg de proteína. También disminuyó la actividad de la glucosa-6-fosfatasa de  $0.26 \pm 0.01$  a  $0.22 \pm 0.01$  U/mg de proteína. Se concluyó que la cumarina tiene una actividad antidiabética por regular la actividad de estas enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa (Pari y Rajarajeswari, 2009).

En 2010, Li y colaboradores en China, evaluaron el efecto de XLF-III-43 un derivado de cumarina, la administración de este compuesto prevenía la nefropatía diabética en un modelo de rata diabética inducida con estreptozotocina. La administración de XLF-III-43 disminuyó significativamente la excreción de albúmina en orina, además que previno la hipertrofia y glomerulosclerosis. Estos datos correlacionaron con la disminución de los productos finales de glicación avanzada, estos productos afectan las funciones normales de proteínas por medio de la unión no enzimática a glucosa, por lo tanto al inhibir estos productos se previenen disfunciones de muchas proteínas. Los autores concluyen que XLF-III-43 inhiben la formación de estos productos finales de glicación avanzada y por lo tanto disminuyen el desarrollo de complicaciones diabéticas (Li *et al.*, 2010).

En 2010, Rajarajeswari y colaboradores en la India, evaluaron el efecto de una cumarina en un modelo de rata diabética inducido con nicotinamida-estreptozotocina. Ellos encontraron que la administración de la cumarina re-estableció a un estado normal los cambios observados en los tejidos y por lo

tanto concluyeron que la cumarina tiene un efecto antioxidante en este modelo de rata diabética (Rajarajeswari y Pari, 2011).

En 2011, Jayashree y colaboradores en la India, sintetizaron y evaluaron nuevos análogos de cumarina. Los nuevos compuestos sintetizados poseían actividad antioxidante, esto fue demostrado con la prueba de DPPH. Los autores concluyen que estos compuestos tienen actividad antioxidante muy importante (Jayashree *et al.*, 2011).

En 2012, Ding y colaboradores en China, evaluaron extractos de *Citrus ichangensis* en un modelo murino de obesidad utilizando ratones de la cepa C57BL/6, Ellos encontraron que los principales metabolitos de esta planta son en su mayoría flavonoides y cumarinas, estos extractos disminuyen la ganancia de peso de estos animales de 30 g hasta 23 g, además de inhibir a los PPAR- $\gamma$  (Ding *et al.*, 2012).

En 2013, Choi y colaboradores en Korea, evaluaron diferentes cumarinas en un modelo de rata obesa inducido con dieta, se encontró que estos compuestos disminuyen el colesterol de  $154.0 \pm 4.5$  a  $88.1 \pm 2.1$  y previenen el daño hepático (Choi *et al.*, 2013).

En 2014, Nugara y colaboradores en Japón, evaluaron a la ( $\pm$ )-pteryxina en células 3T3-L1, estas células bajo condiciones específicas pueden diferenciarse a adipocitos, pero aquellas células tratadas con ( $\pm$ )-pteryxina no se diferenciaban por lo tanto este grupo de investigación concluye que la molécula ( $\pm$ )-pteryxina puede modular genes relacionados con la adipogénesis (PPAR- $\gamma$ , SREBP1c, FABP4) (Nugara *et al.*, 2014).

En 2014, Burgueño y colaboradores en México analizaron la parte aérea de la *Arracacia tolucensis*, una planta utilizada en México para el tratamiento de la diabetes, utilizando métodos de cromatografía en columna y espectroscopía encontraron que los principales metabolitos de esta planta son la Praeruptorina A y el 4'-O-angeloilvisaminol (Burgueño *et al.*, 2014).

En 2014, García-Galicia y colaboradores también, en nuestro grupo de investigación evaluaron extractos obtenidos de la parte aérea de la *A. toluensis* en un modelo de rata diabética inducido con estreptozotocina donde se encontró que estos extractos poseen efectos hipoglucemiantes disminuyendo los niveles de glucosa periférica de 361.7 a 158.6 mg/dL, así como también disminuyó la expresión de citocinas inflamatorias.

Por otro lado, en la literatura existen algunos documentos de patente que hablan sobre derivados de cumarina, por ejemplo el documento WO 2014084669, donde se menciona una composición farmacéutica que contiene a la Praeruptorina A para el tratamiento de la osteoporosis, sin embargo, en este documento no hacen ninguna mención a diabetes, ni que la molécula fue obtenida a partir de un extracto vegetal (Son y Kim, 2014).

En el documento CN 103006725 A se menciona de una formulación que contiene a la Praeruptorina A para el tratamiento de diabetes. En esta invención se habla de una mezcla de diferentes metabolitos que pueden ser utilizados para el tratamiento de la diabetes. Pero no se muestran evidencias de la actividad hipoglucemiante, ni del mecanismo de acción (Bing, 2013).

En el documento JP 2012-153625 mencionan el uso de un derivado de cumarina para el tratamiento de la diabetes y que la sucodorfina puede disminuir los niveles de glucosa. En esta patente se evaluó a la sucodorfina, la cual mostró efecto hipoglucemiante, pero no se muestra su mecanismo de acción (Murakami *et al.*, 2011).

En el documento CN 103690483 se menciona una microemulsión de Praeruptorina A para tratar enfermedades cardiovasculares, este documento no hace mención de diabetes (Xuan, 2013)

En el documento CN 101759705 se menciona un método para extraer la Praeruptorina A de *Peucedanum praeruptorum*, nosotros identificamos a la Praeruptorina A de *Arracacia toluensis* y luego sintetizamos su análogo, por lo que los documentos no son parecidos (Dongfeng y Chengdong, 2009)

### 3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes y la obesidad son un problema de salud en el mundo y México, debido a que gran parte de la población padece de estas enfermedades, nuestro país ocupa los primeros lugares en prevalencia de diabetes y obesidad. En 2014 4.9 millones de personas murieron por problemas relacionados a diabetes, así también la obesidad afecta a gran parte de la población infantil de nuestro país, y esto tiene un impacto importante en el desarrollo de estas personas, porque ellas están más expuestas a padecer enfermedades crónicas degenerativas y tengan muertes prematuras. Por lo que es de gran importancia realizar estudios en el tema. Los medicamentos actualmente utilizados todavía poseen inconvenientes en su eficacia y perfil de efectos adversos, por lo que la búsqueda y obtención de nuevas moléculas de origen natural surgen como una alternativa importante para encontrar compuestos con posible actividad terapéutica para el tratamiento de diabetes y/u obesidad. Por lo anterior, surge la necesidad de presentar una alternativa que no sea tóxica, dicha alternativa se basa en la evaluación de una molécula derivada de una piranocumarina de origen natural, proveniente de una planta que se ha venido investigando en nuestro grupo de investigación.

## 4. HIPÓTESIS

Si compuestos derivados de cumarina poseen efectos hipoglucemiantes y son capaces de regular factores adipogénicos, entonces la mezcla enantioméricamente enriquecida con la estereoquímica *R,R* de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona tendrá dicha acción en modelos animales de diabetes y/u obesidad.

## 5. OBJETIVO GENERAL

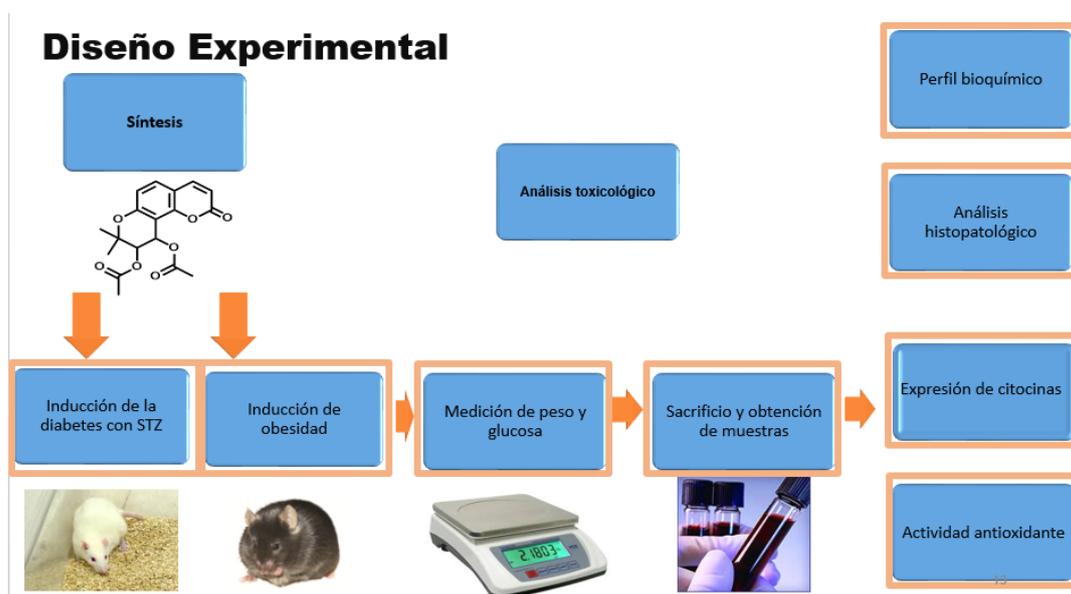
Evaluar el efecto hipoglucemiante y antiobesidad de la administración de una mezcla enantiomérica enriquecida con la estereoquímica *R,R* de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona, en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y en un modelo de obesidad en ratón inducido con dieta alta en grasa.

### 5.1 Objetivos específicos

1. Obtener mediante síntesis química a DOAcQ
2. Determinar el efecto hipoglucemiante de DOAcQ en el modelo de rata diabética y analizar el perfil bioquímico de los diferentes grupos experimentales
3. Analizar el efecto de DOAcQ en órganos como bazo, hígado, páncreas y riñón
4. Evaluar el efecto de DOAcQ en moléculas relacionadas con diabetes y analizar la actividad de enzimas antioxidantes
5. Determinar el efecto antiobesidad de DOAcQ en un modelo de ratón obeso inducido con dieta
6. Evaluar el efecto toxicológico *in vitro* e *in vivo* de DOAcQ

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 9 muestra el diseño experimental general que se llevó a cabo para la realización de este proyecto. En primer lugar se realizó la síntesis de DOAcQ. Una vez obtenido DOAcQ, éste fue evaluado en los modelos animales de diabetes y obesidad, a los cuales se les analizaron diferentes parámetros para, después del sacrificio, llevar a cabo la obtención de muestras para analizar el perfil bioquímico, el análisis histopatológico, la expresión de citocinas y la actividad antioxidante.



**Figura 9.** Diseño experimental general

### 6.1 Metodología general para la síntesis de DOAcQ

La separación y purificación de cada una de las reacciones se hizo por cromatografía en columna (CC), usando como soporte sílica gel (200-300 mallas, Natland international Corporation). El seguimiento de las reacciones y el análisis de la purificación en columna se hizo por cromatografía en capa fina (CCF), en placas de sílica-gel de 3 X 5 cm (sílica-gel, 1500 micrones, Analtech), revelando con luz ultravioleta (UV) de longitud de onda de 254 nm y revelando con sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$ ) en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calor en placas de sílica-gel 60 F254 Merck. Todos los disolventes utilizados fueron destilados antes de su utilización. Los datos físicos y espectroscópicos de los compuestos puros se obtuvieron de la siguiente manera: Los puntos de fusión, cuando fue necesario, se obtuvieron

de un equipo para punto de fusión Cole-Parmer. Los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron registrados en equipos Varian en soluciones de disolventes deuterados usando TMS como referencia interna. La masa exacta del ión molecular de DOAcQ se obtuvo en un equipo Joel GCmatell por impacto electrónico a 70 eV.

#### **6.1.1 Síntesis de la mezcla 3',4'-di-O-acetil-*cis*-quelactona**

A continuación se describe el proceso para llevar la obtención de la mezcla enantioméricamente enriquecida con la estereoquímica *R,R* de 3',4'-di-O-acetil-*cis*-quelactona.

##### **6.1.1.1 Procedimiento general para la obtención de la piranocumarina (1)**

En un matraz provisto de refrigerante y agitador, se adicionó 7-hidroxycumarina (6.2 mmol) y Xileno (20 mL). La mezcla se agitó hasta homogenización, se adicionó 1,1-dietoxi-3-metil-2-buteno (7.4 mmol) y picolina (0.2 mL). La mezcla se calentó bajo reflujo durante 30 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se agregaron 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se filtró en un embudo con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, silica gel y celita. Se enjuagó con AcOEt (3 x 15 mL), la fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash usando sílica gel como adsorbente y una mezcla de hexano-AcOEt (9:1) como eluyente, para dar un sólido amarillo pálido correspondiente a la seselina.

##### **6.1.1.2 Procedimiento para la obtención de la *cis*-quelactona (2)**

En un matraz bola provisto de agitador se colocó una mezcla de tert-butanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (5/5 mL), se adicionaron 1.4 g de AD-mix  $\alpha$  y se agitó hasta que se formó una mezcla amarilla translúcida. Entonces la mezcla se puso en baño de hielo hasta llegar a una temperatura entre 0-5  $^\circ\text{C}$  y se adicionó la seselina (1) (200 mg), se mantuvo la agitación durante 45 h, una vez concluida la reacción se agregó una solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (1 g/10 mL) para detener la reacción y se dejó llegar a temperatura ambiente con agitación durante 30 min. Posteriormente, se agregó AcOEt (10 mL) y se realizó una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 10 mL), la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó

sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó con cromatografía flash usando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3).

#### **6.1.1.3 Procedimiento para la síntesis de 4'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (3)**

En un matraz bola provisto de agitador se colocó la *cis*- quelactona (3) (120 mg, 0.45 mmol) y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL), se adicionó el ácido S-2-metil-3-butanoico (46  $\mu$ L, 0.45 mmol) y 4-(dimetilamino)-piridina (9.2 mg, 0.075 mmol), la mezcla se agitó y se llevó a baño de hielo por 10 min. Entonces se le adicionó el *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (235.9 mg, 1.1 mmol) este compuesto es el iniciador de la reacción por promover la generación de un anhídrido (Sheikh *et al.*, 2010). Se permitió a la reacción llegar a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 2 h, una vez concluida la reacción se agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y la mezcla se filtró por un embudo con algodón, posteriormente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó con cromatografía flash usando como eluyente hexano-AcOEt (8:2).

#### **6.1.1.4 Procedimiento para la síntesis de 3'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (4)**

En un matraz bola provisto de agitador se colocó la *cis*- quelactona (3) (120 mg, 0.45 mmol) y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL), se adicionó el ácido S-2-metil-3-butanoico (46  $\mu$ L, 0.45 mmol) y 4-(dimetilamino)-piridina (9.2 mg, 0.075 mmol), la mezcla se agitó y se llevó a baño de hielo por 10 min. Entonces se le adicionó el *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (235.9 mg, 1.1 mmol) este compuesto es el iniciador de la reacción por promover la generación de un anhídrido (Sheikh *et al.*, 2010). Se permitió a la reacción llegar a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 2 h, una vez concluida la reacción se agregó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) y la mezcla se filtró por un embudo con algodón, posteriormente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó con cromatografía flash usando como eluyente hexano-AcOEt (8:2).

### 6.1.1.5 Procedimiento para la síntesis de 3'-O-tigloil-4'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (5)

En un matraz bola provisto de agitador se colocó el monoesterificado 4 (45 mg, 0.13 mmol) y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL), se adicionó el ácido angélico (39 mg, 0.39 mmol) y 4-(dimetilamino)-piridina (5 mg, 0.04 mmol), la mezcla se agitó y se llevó a baño de hielo por 10 min. Entonces se le adicionó el *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (100 mg, 0.49 mmol) este compuesto es el iniciador de la reacción por promover la generación de un anhídrido (Sheikh *et al.*, 2010). Posteriormente se llevó la reacción a reflujo y se mantuvo en agitación durante 28 h, la mezcla se filtró por un embudo con algodón lavando con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó con cromatografía flash usando como eluyente hexano-AcOEt (8:2).

### 6.1.1.6 HPLC de los diastereómeros

Dado que los compuestos sintetizados son diastereoisómeros sus propiedades físicas son distintas y en principio deben de ser separables por métodos convencionales, por lo que se intentó una purificación por HPLC.

Las columnas utilizadas fueron una columna C18 y una columna de sílica, utilizándose diferentes medios de elución y a diferentes flujos. A una concentración de un 1 mg/mL. Los sistemas se muestran en las Tablas 6 y 7.

**Tabla 6.** Sistemas isocráticos

MeOH	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN	THF	Hex	CH <sub>3</sub> CN:THF (20:80)	Hex:Isopr opanol (50:50)
50	50	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
80	-	20	-	-	-	-
50	-	50	-	-	-	-
20	-	80	-	-	-	-
-	-	20	80	-	-	-
-	-	-	100	-	-	-
-	-	-	-	10	90	-
-	-	-	-	30	70	-
-	-	-	-	50	50	-
-	-	-	-	-	90	10
-	-	-	-	-	70	30

**Tabla 7.** Sistemas no isocráticos

MeOH	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN		THF	CH <sub>3</sub> CN:THF (20:80)	Hex:Isopro panol (50:50)
Inicio	100	-		0	-	-
Fin	0	-		100	-	-
Inicio	-	-		30	-	-
Fin	-	-		10	-	-
Inicio	-	-		-	100	0
Fin	-	-		-	80	20

### 6.1.1.7 Procedimiento para la obtención de la mezcla de 3',4'-di-O-acetil-*cis*-quelactona [DOAcQ] (6)

En un matraz bola provisto de agitador se colocó la *cis*-quelactona (50 mg, 0.19 mmol) y se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL), se adicionó 4-(dimetilamino)-piridina (4 mg) y cloruro de acetilo (29.6 µL, 1.7 eq), la mezcla se mantuvo con agitación mecánica durante 24 h. Posteriormente se agregaron 10 mL de H<sub>2</sub>O, la mezcla se extrajo con AcOEt 3 X 10 mL, se lavó con una solución saturada de NaCl y posteriormente se concentró bajo presión reducida. El crudo de reacción se purificó con cromatografía flash usando como eluyente hexano-AcOEt (8:2).

## 6.2 Experimentos biológicos

### 6.2.1 Modelos murinos

Es importante mencionar que todos los animales utilizados en esta investigación fueron manejados de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999 y bajo las normas del comité de ética de la ENMH.

#### 6.2.1.1 Ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Se empleó un modelo murino de diabetes inducido farmacológicamente (Fröde y Medeiros, 2008). Se utilizaron ratas Wistar macho de 250 ± 50 g de peso; para llevar a cabo la inducción a diabetes se administró una dosis de 50 mg/kg de STZ por vía intraperitoneal, diluida en agua inyectable libre de pirógenos. La toma de glucosa periférica a las 48 h se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: Se hizo una punción con lanceta en la porción distal de la cola, la gota colectada se colocó en tiras para glucómetro (Accu-check active®). Con este procedimiento se verificó que la glucemia sanguínea se

encontrara en valores superiores a los 150 mg/dL; los animales dentro de este rango fueron integrados en los grupos experimentales abajo mencionados. El día 1 fue considerado a partir de la inducción a DM con STZ. Se utilizaron 70 ratas que se dividieron en 7 grupos de 10 ratas cada uno, de la siguiente manera:

**Grupo 1 Sano:** Recibieron una dosis intraperitoneal (0.5 mL) de agua libre de pirógenos, el día 1 de experimentación, sin tratamientos posteriores.

**Grupo 2 Diabético:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación, sin tratamiento posteriores.

**Grupo 3 Diabético + Vehículo:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación, más la administración vía oral de 300 µL de vehículo (100 µL DMSO + 200 µL de H<sub>2</sub>O) a partir de día 7, se administró una dosis diaria durante 15 días vía intragástrica.

**Grupo 4 Glibenclamida:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación más la administración oral de Glibenclamida a 2.5 mg/kg de peso diluida en vehículo a partir del día 7, se administró una dosis diaria por 15 días vía intragástrica.

**Grupo 5 Metformina:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación más la administración oral de Metformina a 100 mg/kg de peso diluido en vehículo a partir del día 7, se administró una dosis diaria por 15 días vía intragástrica.

**Grupo 6 Pioglitazona:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación más la administración oral de Pioglitazona a 1 mg/kg de peso diluido en vehículo a partir del día 7, se administró una dosis diaria por 15 días vía intragástrica.

**Grupo 7 DOAcQ:** Ratas inducidas a Diabetes con una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de peso de STZ, el día 1 de experimentación más la administración oral del compuesto DOAcQ (15 mg/kg de peso) diluido en vehículo a partir del día 7, se administró una dosis diaria por 15 días vía intragástrica (Tabla 8).

**Tabla 8.** Grupos experimentales y tratamientos

Grupo	STZ	Tratamiento diario
Sano		
Diabético	50 mg/kg	
Diabético + Vehículo	50 mg/kg	DMSO 2:1 Agua
Diabético + Glibenclamida	50 mg/kg	Glibenclamida 2.5 mg/kg
Diabético + Metformina	50 mg/kg	Metformina 100 mg/kg
Diabético + Pioglitazona	50 mg/kg	Pioglitazona 1 mg/kg
Diabético + DOAcQ	50 mg/kg	DOAcQ 15 mg/kg

Después de 15 días de tratamiento diario los animales fueron sacrificados para medir diferentes parámetros. Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la NOM-033-Z00-1995, a través del diafragma se realizó una punción cardiaca, la sangre obtenida fue colectada en dos tubos previamente rotulados, uno con anticoagulante EDTA, y otro sin anticoagulante, para los análisis de laboratorio pertinentes. Posteriormente se realizó la disección de bazo, páncreas, hígado y riñón, todos los órganos fueron lavados con solución salina fisiológica y se expusieron todas sus caras, en busca de lesiones macroscópicas, al final se cortaron 3 porciones de cada órgano mencionado en una longitud aproximada de 0.5 a 1 cm y se almacenaron de la siguiente manera: La primera muestra fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se sumergió en nitrógeno líquido; la segunda muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 300 µL de RNAlater (solución libre de ARNasas) los tubos previamente rotulados fueron almacenados a -70 °C; y la última muestra fue colocada en viales de vidrio color ambar con 10 mL de solución de formaldehído al 10 % en PBS, rotulados y almacenados a temperatura ambiente. Los parámetros analizados fueron los siguientes: Alimento consumido, peso, glucosa, creatinina, colesterol, HDL, LDL, bilirrubina, triglicéridos y urea. Los resultados fueron analizados por medio de la prueba estadística del análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba *post-hoc* de *Dunnnett*. La significancia estadística fue considerada cuando \**p* es < 0.05. GraphPad Prism ver. 6 (GraphPad Software, Inc.).

#### 6.2.1.1.1 Medición de peso y niveles de glucosa

El peso fue monitoreado semanalmente en una balanza, los datos obtenidos fueron controlados en expedientes individuales y capturados para su análisis estadístico posterior. La glucosa periférica fue determinada el día 0 antes de la

inducción a diabetes, el día 2 y día 5 después a la inducción; a partir de esta última toma se inició el tratamiento oral el día 7 de experimentación, de acuerdo a los grupos ya mencionados. Los niveles de glucosa periférica se obtuvieron dos veces por semana de la porción distal de la cola de los animales como en el esquema de tratamiento de la Figura 10 durante todo el periodo experimental mediante un glucómetro (Accu-check active®).



**Figura 10.** Esquema de tratamiento para el modelo de rata diabética inducida con estreptozotocina.

### 6.2.1.2 Ratón obeso inducido por dieta

Para este modelo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 los cuales fueron alimentados con una dieta alta en grasa para generar obesidad en los ratones. Aunque existen diferentes modelos para evaluar obesidad se decidió utilizar este modelo debido a que tiene más semejanza con lo que pasa con los seres humanos, ya que entre ellos comparten muchos factores genéticos en común y por lo tanto esta cepa es capaz de engordar en un ambiente obesogénico (Surwit *et al.*, 1988). Para la inducción de la obesidad se suministró una dieta alta en grasa, la Tabla 9 muestra la composición de las dietas usadas.

La Tabla 10 muestra las características de los modelos murinos más utilizados (Kanasaki y Koya., 2010). La toma de glucosa periférica se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: Se hizo una punción con lanceta en la porción distal de la cola, la gota colectada se depositó en tiras para poder ser leídas por glucómetro. Con este procedimiento se verificó la glucemia sanguínea de los grupos experimentales. El peso de los animales se evaluó semanalmente en una balanza analítica siempre por la mañana. Se utilizaron 36 ratones machos de

cuatro semanas que se dividieron en 5 grupos de 8 animales cada uno de la siguiente manera:

**Grupo Sano:** Ratones alimentados con una dieta estándar.

**Grupo Obeso:** Ratones alimentados con una dieta alta en grasa.

**Grupo Obeso + Vehículo:** Ratones alimentados con una dieta alta en grasa y la administración diaria del vehículo (DMSO 1:2 AGUA) por vía intragástrica.

**Grupo Obeso + Xenical:** Ratones alimentados con una dieta alta en grasa y la administración diaria de Xenical (5.14 mg/kg) por vía intragástrica.

**Grupo Obeso + DOAcQ:** Ratones alimentados con una dieta alta en grasa y la administración diaria de DOAcQ (15 mg/kg) por vía intragástrica.

**Tabla 9.** Composición de las dietas

Composición	Dieta estándar (% kcal)	Dieta alta en grasa (% kcal)
Proteínas	27	18.4
Grasas	13.1	60.3
Carbohidratos	59.8	21.3

**Tabla 10.** Modelos murinos de obesidad

Características	Ob/Ob	db/db	Fa/Fa Zucker	DAG C57BL/6	Seres Humanos
Acceso a alimento alto en calorías	X	X	X	✓	✓
Tejido adiposo evidente	✓	✓	✓	✓	✓
Hiperleptinemia	X	✓	✓	✓	✓
Hiperinsulinemia	✓	✓	✓	✓	✓
Hiperglucemia	✓	✓	X	✓	✓
Hipertenso	✓	✓	✓	✓	✓
Sensible a fármacos	✓	✓	✓	✓	✓

#### 6.2.1.2.1 Medición de peso y niveles de glucosa

El peso fue monitoreado semanalmente, en una balanza, los datos obtenidos fueron controlados en expedientes individuales y capturados para su análisis estadístico posterior. Los niveles de glucosa periférica se obtuvieron de la porción distal de la cola de los animales al inicio y al final como en el esquema de tratamiento de la Figura 11 durante todo el periodo experimental con un glucómetro (Accu-check active®).



**Figura 11.** Esquema de tratamiento para el modelo de ratón obeso inducido con dieta alta en grasa.

### 6.2.2 Sacrificio y obtención de muestras

24 h después de la última dosis 4 semanas después, Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la NOM-033-Z00-1995, a través del diafragma se realizó una punción cardiaca, la sangre obtenida fue colectada en dos tubos previamente rotulados, uno con anticoagulante EDTA, y otro sin anticoagulante, para los análisis de laboratorio pertinentes. Posteriormente se realizó la disección de bazo, páncreas, hígado, riñón y tejido adiposo, todos los órganos fueron lavados con solución salina fisiológica y se expusieron todas sus caras, en busca de lesiones macroscópicas, al final se cortaron 3 porciones de cada órgano mencionado en una longitud aproximada de 0.5 a 1 cm y se almacenaron de la siguiente manera: La primera muestra fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se sumergió en nitrógeno líquido; la segunda muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 300  $\mu$ L de RNAlater (solución libre de ARNasas) los tubos previamente rotulados fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; y la última muestra fue colocada en viales de vidrio color ambar con 10 mL de solución de formaldehído al 10 % en PBS, rotulados y almacenados a temperatura ambiente.

### 6.2.3 Análisis histológico

Para el análisis histopatológico se hizo una disección de órganos de los distintos grupos experimentales, estos órganos fueron: Bazo, Hígado, Páncreas, Riñón y Tejido Adiposo. Las muestras después de haber sido extraídas se lavaron en una solución PBS 1X y se almacenaron en una solución fijadora de formaldehído al 10 % en PBS al menos 72 h, posterior a ello a los tejidos se les

realizó la tinción con Hematoxilina & Eosina de la siguiente manera: Se deshidrató la pieza con concentraciones crecientes de alcohol, se sumergió en xilol para el aclaramiento de la estructura celular, se impregnó con parafina para realizar cortes de 6-10 micras en el micrótopo, se fijó en un portaobjetos y se sumergió en xilol para eliminar la parafina, posteriormente se rehidrató con concentraciones decrecientes de alcohol hasta llegar a una solución de 100 % de agua, se tiñó con el colorante de Hematoxilina y con Eosina, finalmente se fijó en portaobjetos, para ser observadas al microscopio a 100 X.

#### **6.2.4 Expresión de citocinas inflamatorias**

Se obtuvieron muestras de hígado y tejido adiposo de los grupos experimentales. Las muestras fueron almacenadas en tubos eppendorf, con RNAlater. La extracción del ARN total se realizó bajo la técnica de trizol, la cual se describe a continuación:

Las muestras de hígado con un peso de 200 mg fueron maceradas con 250  $\mu$ L de trizol, se añadieron otros 250  $\mu$ L para extraer ARN, en un tubo eppendorf, y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. La muestra se separó en 3 fases: La grasa en la parte superior, la parte de en medio que contiene el ARN y las proteínas, y en la parte inferior están otras proteínas de alto peso. La parte a utilizar es la de en medio, esta se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente para aumentar la disociación. Entonces para separar el ARN se añadió 0.2 mL de  $\text{CHCl}_3$  por mL de trizol utilizado y se llevó la muestra a vortex 15 seg y se dejó reposar de 2-15 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo eppendorf sin mezclar con las otras 2 fases que contiene ADN (en medio) y proteínas (inferior). El ARN es precipitado agregando 0.5  $\mu$ L de alcohol isopropílico por mL de trizol utilizado. Se vortexeó por 15 seg y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y se adicionó 1 mL de etanol al 75 % por mL de trizol usado. Se vortexeó y se centrifugó a 7,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El ARN se disolvió en 50  $\mu$ L de DEPC. El ARN se cuantificó por espectrofotometría en Nanodrop (Thermo fisher scientific).

#### **6.2.4.1 Obtención de ADNc**

El ARN 0.5 µg (1-5 µL) se trató con 1 µL de oligo dT, 1 µL de DNTPs y se llevó la mezcla a un volumen de 12 µL con agua (Inyectable Pisa), la mezcla se puso en termociclador a 65 °C durante 5 min. Concluido el tiempo las muestras se enfriaron y se centrifugaron con un spin, entonces se adicionaron los siguientes reactivos: 4 µL de Amortiguador, 1 µL RNAasaOut, 2 µL de DTT y se incubó a 42 °C por 2 min, por último se añadió 1 µL de Superscript II y se incubó a 42 °C por 50 min y se inactiva la reacción a 70 °C por 15 min. Después de ello se cuantifica el ADNc por nanodrop.

#### **6.2.4.2 PCR kit**

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se siguieron las especificaciones del fabricante (Kit for rat inflammatory cytokine genes set-1).

12.5 µL MPCR amortiguador Mixture 2X

2.5 µL MPCR Oligos

0.5 µL Taq ADN polimerasa (5 U/µl)

500 ng ADNc

4.5 µL de H<sub>2</sub>O

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 94 °C por 1 min por 35 ciclos, 59 °C por 2 min por 35 ciclos, 70 °C por 10 min y 25 °C por 5 min.

Después de esto las muestras fueron puestas en un gel de agarosa al 2 % y fueron separadas mediante electroforesis a 90 V durante 1.5 h, el gel fue teñido con gelRed y se visualizó en un fotodocumentador.

#### **6.2.4.3 PCR oligos independientes**

La Tabla 11 muestra la secuencia de los oligos utilizados además de las Tms usadas para cada uno de ellos. Para realizar la PCR se realizó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: Amortiguador de PCR 1 µL, DNTP 0.4 µL, Oligo Forward 0.2 µL, Oligo Reverse 0.2 µL, TAQ 0.1 µL, MgCl<sub>2</sub> 0.3 µL. El volumen de esta mezcla fue de 2.2 µL, a esta mezcla se añadió el volumen de

ADNc necesario para tener 1 µg de la cadena molde y se agregó agua inyectable necesaria para un volumen total de 10 µL por muestra. La mezcla de reacción se preparó general para las muestras a realizar, el ADNc y el agua se agregaron al final para cada reacción.

Las condiciones del termociclador utilizadas fueron 94 °C por 3 min para la desnaturalización completa, se añadieron 35 ciclos por reacción que constaba de 94 °C por 45 seg, la  $T_M$  adecuada para cada par de oligos por 30 seg, temperatura de extensión de 72 °C por 90 seg, y una extensión final de 72 °C por 10 min después de lo cual las muestras se mantienen a 4 °C.

**Tabla 11.** Oligos utilizados para la PCR punto final

<b>Gen</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b><math>T_M</math> (°C)</b>
<b>Actina Forward</b>	GGACTCCTATGTGGGTGACGAG	65
<b>Actina Reverse</b>	CTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGG	65
<b>PPAR-γ Forward</b>	GCTGAATCACCCAGAGTCCTCTC	67
<b>PPAR-γ Reverse</b>	GCTCTGTGACGATCTGCCTGAG	67
<b>TNF-α Forward</b>	CACCGTCAGCCGATTTGCTATC	62
<b>TNF-α Reverse</b>	GCGAAGACTCCTCCCAGGTAT	62
<b>IL-6 Forward</b>	GCCTTCTTGGGACTGATGCTG	62
<b>IL-6 Reverse</b>	CAGGTCTGTTGGGAGTGGTATC	62

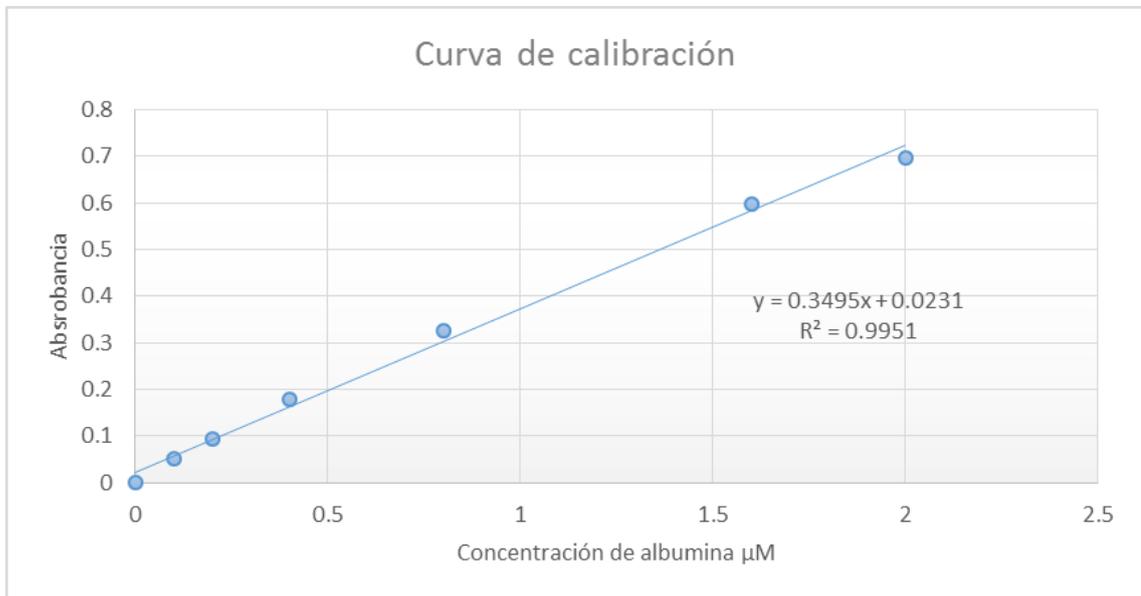
Después de este proceso las muestras se añadieron en un gel de agarosa al 2.5 % y fueron separadas mediante electroforesis a 90 V por 1.5 h, el gel fue teñido con gelRed y se visualizó en un fotodocumentador. La imagen obtenida se analizó con el programa imageJ para el análisis densitométrico por triplicado.

## **6.2.5 Análisis de las enzimas antioxidantes**

### **6.2.5.1 Preparación de homogenado**

Una vez hecha la extracción del hígado se mantuvo en baño de hielo en una solución al 0.9 % p/v de NaCl. Entonces el tejido fue homogenizado (10 % p/v) 100 mg/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y el homogenado se sometió a centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C por 10 min. Se utilizó el sobrenadante para las mediciones enzimáticas. Este se cuantificó por el método de BCA para que todas las muestras contuvieran la misma concentración de

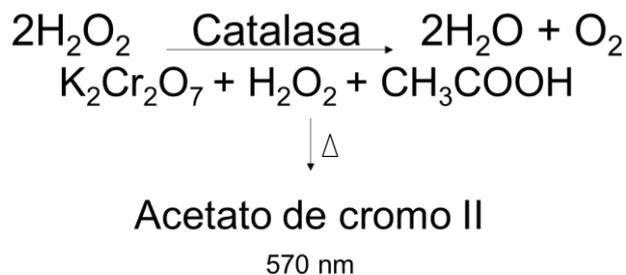
proteínas. La curva de calibración para la cuantificación de proteína se encuentra en la Figura 12.



**Figura 12.** Curva de calibración usada para cuantificar la concentración de proteína.

#### 6.2.5.2 Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa fue estimada de acuerdo al método de Sinha *et al.*, 1972. Este se basa en la formación de acetato de cromo II, la formación de este complejo va depender de la cantidad de peróxido en el medio, por lo tanto la formación de acetato de cromo II va ser inversamente proporcional a la actividad de la catalasa, la reacción se representa en la Figura 13. Se preparó una mezcla de reacción con un volumen total de 1.5 mL, esta mezcla contenía 1 mL de 0.01 M de amortiguador de fosfatos (pH 7.0), 0.4 mL de 0.2 M de  $H_2O_2$  y se añadió 0.1 mL de homogenado. La reacción fue detenida por la adición de 2 mL de una mezcla de ácido acético-dicromato de potasio (5 % de una solución de dicromato y ácido acético en una proporción de 1:3). La mezcla se calentó durante 10 min en Baño María y entonces la absorbancia fue medida a 530 nm; la actividad fue expresada como  $\mu M$  de  $H_2O_2$  consumidos/min/mg de proteína. La curva de calibración se hizo utilizando diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .



**Figura 13.** Ensayo de CAT. La enzima catalasa se encarga de eliminar el peróxido de hidrógeno. Cuando se expone el ácido acético con dicromato de potasio en presencia de peróxido de hidrógeno y calor se forma el acetato de cromo II.

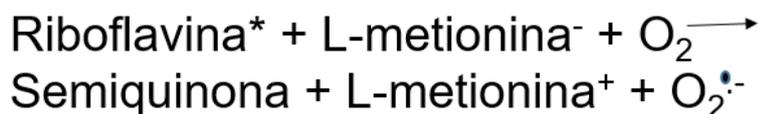
### 6.2.5.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La cuantificación de SOD se realizó por el método de Bayer y Fridovich, el cual se desarrolla mediante un ensayo competitivo con cloruro azul de nitrotetrazolio (NBT) (Chakrabarty et al., 2009) el cual reacciona y elimina el radical  $\text{O}_2^-$  en este ensayo; riboflavina es fotoquímicamente excitada; en dicho estado riboflavina es capaz de oxidar a un donante de electrones (L-metionina), luego el colorante se reduce a una semiquinona, (proceso en el cual reduce el  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^-$ ). En este punto el anión  $\text{O}_2^-$  dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  catalizado por SOD o bien reduce a NBT originando un precipitado formazán color púrpura insoluble, esto se representa en la Figura 14.

La concentración de este último compuesto es determinada espectrofotométricamente a 560 nm y resulta ser inversamente proporcional a la actividad de SOD en la muestra. Los resultados de este ensayo se reportaron como unidades de SOD por miligramo de proteína, una unidad de SOD es definida como la cantidad de SOD en microgramos capaz de evitar la reducción de NBT al 50 %.

Se preparó una mezcla de reactivos en 50 mL que contienen 50 mM de amortiguador de fosfato pH 7.8; 0.1 mM de EDTA; 9.9 mM de L-metionina; 57  $\mu\text{M}$  de NBT; 0.9  $\mu\text{M}$  de riboflavina, 0.025 % de tritón X-100. Esta solución se preparó una vez cada día y fue utilizada solamente nueva y sin exponer a la luz. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de esta mezcla de uso y se añadió 5  $\mu\text{L}$  de homogenado (previamente cuantificado y homogenizado). La reacción se inició al iluminar las muestras con una lámpara fluorescente de 20 W en un contenedor revestido de aluminio durante 1 min. Posteriormente se lee la absorbancia a 560 nm. Para la

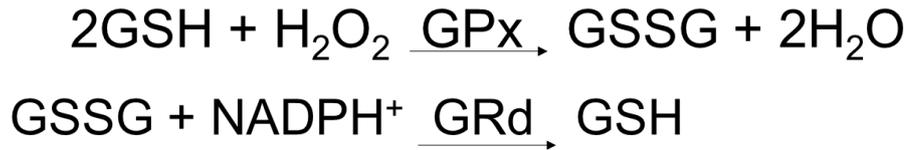
elaboración de la curva de calibración se reemplazó la muestra por distintas concentraciones de SOD. La unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de SOD en  $\mu\text{g}$  que es capaz de inhibir el 50 % de la fotorreducción de NBT en las condiciones establecidas.



**Figura 14.** Ensayo de SOD. Reacción del proceso de formación del radical superóxido y formación de formazán.

#### 6.2.5.4 Glutación peroxidasa (GPx)

Para medir la actividad de glutatión peroxidasa se utilizó el método de Wendel (Figura 15). En esta reacción se usa peróxido de terbutilo, por el hecho de que GPx es más sensible a esta especie que al mismo peróxido de hidrógeno, al realizarse esta reacción ocurre una oxidación de GSH por GPx generando GSSG que este a su vez es convertido nuevamente a GSH por la glutatión reductasa debido al equilibrio establecido que existe entre estas 2 especies (99 % en la especie reducida y menos del 1 % en su especie oxidada) este proceso sucede con el consumo de una molécula de NADPH<sup>+</sup>, esta última puede ser medida a 340 nm en un espectrofotómetro. Para realizar esta medición se preparó un medio de reacción que estaba compuesto por un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, glutatión reductasa 0.1 U/mL, GSH 1 mM y NADPH<sup>+</sup> 0.2 mM. La reacción fue iniciada con una adición de peróxido de tertbutilo 0.5 mM y leída durante 5 min. El valor de coeficiente molar utilizada para el NADPH<sup>+</sup> fue  $\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 15.** Ensayo de GPx. La medición de actividad de GPx se realiza por una reacción en la cual la actividad de esta enzima se hace de forma indirecta, midiendo el NADPH<sup>+</sup>.

## 6.2.6 Análisis de insulina en páncreas de los diferentes grupos experimentales por inmunofluorescencia

### 6.2.6.1 Preparación del tejido

Para desparafinar las muestras se siguieron los pasos de la Tabla 12.

**Tabla 12.** Soluciones para desparafinar las muestras

Reactivo	Porcentaje	Tiempo (min)
Xilol	100	5
EtOH-xilol	50-50	5
EtOH	100	3
EtOH	90	3
EtOH	80	3
EtOH	70	3

La muestra entonces se puso en un tubo falcon con un amortiguador de citratos hasta cubrir la muestra y se puso a hervir durante 30 min. Una vez pasado este tratamiento, la muestra se llevó a inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Después de haber calentado las láminas se hicieron los siguientes pasos: Se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se dejó 5 min remojando, posteriormente se dejó remojando con PBS 1X con tritón al 0.2 % durante 30 min (Para permeabilizar), se bloqueó con leche al 1 % o albúmina libre de IgG (0.5 % PBS-tritón) por 20 min (temperatura ambiente), después se lavó 3 veces por 10 min con PBS-tritón al 0.2 %, se incubó con el anticuerpo primario por 2 h a temperatura o toda la noche a 4 °C, entonces se lavó 3 veces con PBS-tritón al 0.2 % por 10 min, la muestra se incubó con el anticuerpo secundario (1:200) por 1:30 min a temperatura ambiente y se cubrió de la luz; se lavó 3 veces con PBS-tritón al 0.2 % por 10 min, se agregó el VECTA-shield sobre la muestra y

entonces se puso el cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas, por último se guardó a 4°C hasta el momento de observar en el microscopio de fluorescencia o confocal.

### **6.3 Estudios de toxicidad**

#### **6.3.1 Ensayo de genotoxicidad *in vitro*: Prueba de Ames**

La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por recorrimiento del cuadro de lectura (*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye el ensayo de fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema. Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar mínimo con histidina/biotina. Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (His-), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Después de 48 h de incubación a 37°C, las colonias revertantes son contadas. Un índice mutagénico igual o mayor a dos, obtenido de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de las placas control, indica la presencia de actividad mutagénica.

Para la realización de esta prueba, se utilizaron 3 cepas de *S. typhimurium* la TA98, TA100 y TA102; el compuesto DOAcQ fue disuelto en DMSO al 0.1 % y evaluado a concentraciones de 8.65, 17.30, 34.6 50 y 100 µg/placa. Se utilizó como control negativo el DMSO al 0.1 % y como controles positivos diferentes mutágenos que han sido establecidos para cada una de las cepas: 2-AA, Mitomicina C, Acido Picrolónico y Metil-N-Nitrosoguanidina (MNNG). Todo el material, reactivos y medios fueron preparados en condiciones de esterilidad y por otro lado, la preparación de la fracción S9, proveniente de un homogenado del hígado de rata inducido con Aroclor 1254, también se elaboró en condiciones de esterilidad.

El medio Vogel Bonner se preparó y se vertió en placas de Petri y una vez solidificado, está listo para su uso, el agar suave (10 mL) fue mantenido a 35 °C en un termoblock para evitar su solidificación; la fracción S9 fue esterilizada con un filtro de 0.45 µm (Millipore) y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. A cada caja de Petri se le agregó el contenido del tubo de ensayo con el agar suave con 100 µL de la cepa, 10 µL del compuesto DOAcQ disuelto a las concentraciones mencionadas y 500 µL de la fracción S9, ó solución salina en el orden indicado, homogenizando la mezcla cuidadosamente, enseguida se vertió la mezcla en la caja de Petri procurando extenderla mezcla por toda la caja. Se esperó su solidificación y se incubó a 37 °C por 48 h. Al término de la incubación se contaron las revertantes a Histidina. Los resultados se expresaron gráficamente a través de una curva dosis respuesta, colocando en la abscisa las concentraciones de la muestra evaluada y en la ordenada el número de revertantes inducidas en cada dosis. Si algunas de las placas con las diferentes concentraciones del compuesto DOAcQ doblan el número de colonias de las revertantes espontáneas basales de la cepa (placa control), el compuesto es considerado mutágeno (Maron & Ames, 1983).

### **6.3.2 Ensayo de genotoxicidad *in vivo*: Ensayo de Micronúcleos**

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluidos y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario, denominado micronúcleo (MN), visible fácilmente al microscopio óptico. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante anafase mitótica. El Ensayo de Micronúcleos nos ayuda a poder detectar agentes que puedan generar micronúcleos.

El ensayo fue realizado en ratones machos de la cepa BALB/c con un peso de  $22 \pm 2$  g. A los cuales se les administró una dosis de 300 mg/kg del compuesto DOAcQ, después de 48 h de la administración, los animales fueron sacrificados para la obtención de muestra sanguínea para realizar el Ensayo de Micronúcleos con el kit de MicroFlow adquirido en Litron Laboratories (Rochester, NY). Este kit contiene los marcadores específicos para la identificación de micronúcleos que es el yoduro de propidio y para realizar la separación de células de interés se utilizó el anticuerpo contra CD-71 que es el receptor de transferrina. El Ensayo de Micronúcleos se realizó sobre los eritrocitos por el hecho de que estas células están en constante división y cuando maduran pierden el núcleo y es más evidente ver la presencia de micronúcleos.

Para que una sustancia sea considerada genotóxica debe promover un aumento con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo tratado con el vehículo. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls, valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de formación de micronúcleos (%MN-RET y %MN-NCE) (Cammerer *et al.*, 2007).

### **6.3.3 Ensayo de toxicidad aguda: Prueba TG 423**

Esta técnica está basada en un procedimiento por etapas en las que se utiliza el número mínimo de animales que permite obtener información suficiente sobre la toxicidad aguda de una sustancia para permitir su clasificación. La sustancia se administra por vía intragástrica (v.i.g.) a un grupo de tres animales en una de las dosis definidas. La ausencia o presencia de mortalidad en los animales tratados, determinará el siguiente paso. Por lo que no se requieren más pruebas, únicamente la administración de otros tres animales en el nivel de dosis inmediatamente superior o inferior, de ser necesario. Este método permite emitir un juicio con respecto a la clasificación de la sustancia de ensayo, colocándolo en uno de los grupos de toxicidad definidos por valores de corte de dosis letal (DL) preestablecidos.

Los experimentos fueron realizados en ratones de la cepa CD-1 machos de  $22 \pm 2$  g. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-ZOO-1995. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales y fueron alimentados con libre acceso a alimento y agua, con fotoperiodos de 12 h de luz por 12 de oscuridad. El compuesto DOAcQ fue disuelto en DMSO ajustando la concentración a un volumen de administración de 0.1 mL por ratón por vía intragástrica (v.i.g.). Antes de la administración, los animales se pusieron en ayuno de 8 h y este continuó durante 2 h posteriores al tratamiento.

Este experimento se realizó de acuerdo al procedimiento TG 423 de la OECD. Como ya se mencionó, grupos de 3 animales machos fueron administrados con una sola dosis por v.i.g. comenzando con 2000 mg/kg. El estado de salud general de los animales fue observado después de 1, 2, 4 y 6 h y una vez diariamente por 14 días. Los animales fueron observados después del tratamiento para detectar cualquier signo de toxicidad o incluso la muerte. Al final del periodo de observación los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los órganos ppulmón, riñones, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado fueron extraídos y se realizaron observaciones macroscópicas en busca de lesiones patológicas. El valor de DL fue determinado de acuerdo al Globally Harmonised Classification System (GHS). (OECD, 2014).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Síntesis de DOAcQ

La síntesis de DOAcQ se logró siguiendo la reacción general mostrada en la Figura 16.

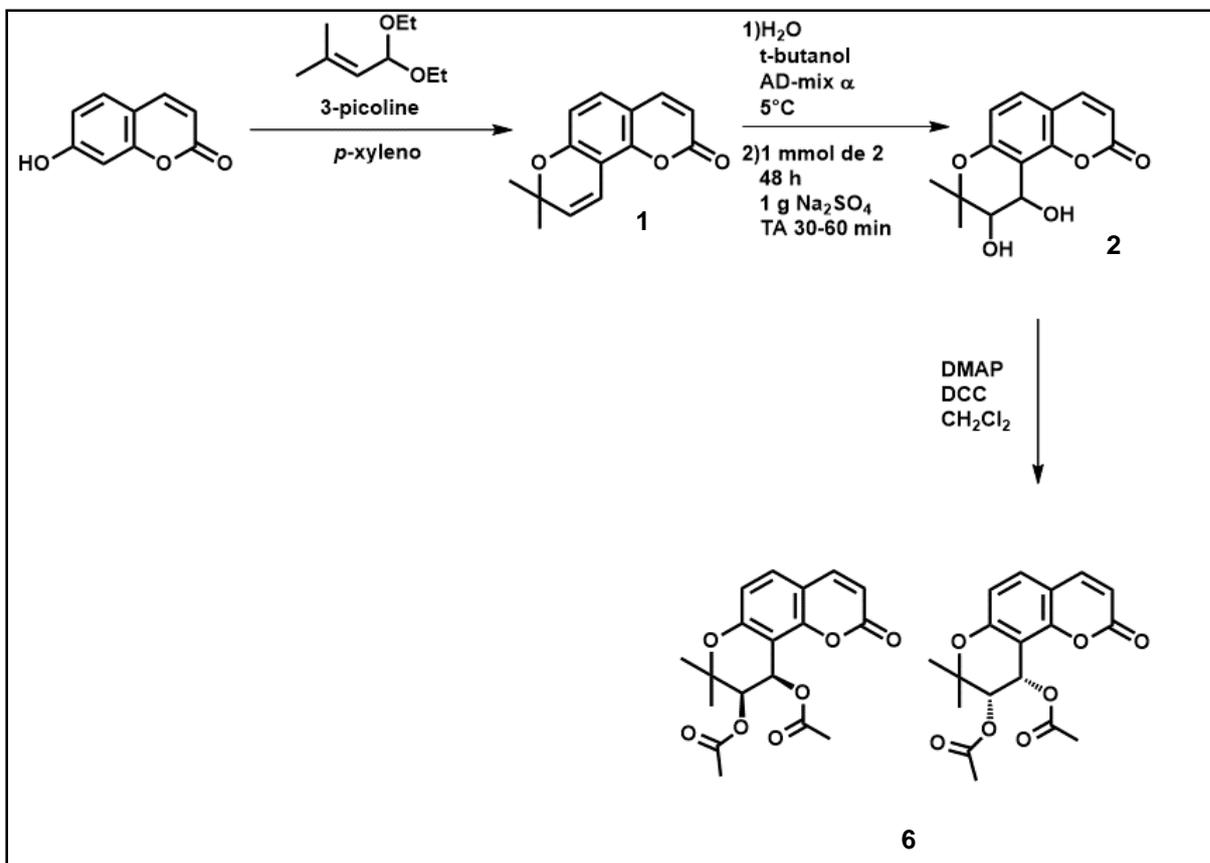
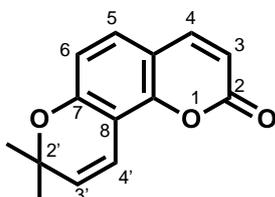


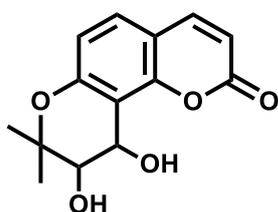
Figura 16. Ruta de síntesis para la obtención de DOAcQ



#### 7.1.1 Síntesis de seselina (1)

La seselina se preparó a partir de 7-hidroxycumarina (1 g, 6.2 mmol). Después de la CC se obtuvieron 1.12 g (4.9 mmol) (80 %) de un sólido amarillo pálido: pf 119-121 °C,  $R_f = 0.50$  (hexano/AcOEt 7:3); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J/Hz): 1.47 (6H, s, 2 X CH<sub>3</sub>), 5.73 (1H, d, J = 10 Hz, 3'), 6.22 (1H, d, J = 9.5 Hz, 3), 6.72 (1H, d, J = 8.45 Hz, 6), 6.88 (1H, d, J = 10 Hz, 4'), 7.20 (1H, d, J = 8.45 Hz, 5), 7.59 (1H, d, J = 9.5 Hz, 4). Los datos son esencialmente los mismos que aquellos descritos por (Page *et al.*, 2009). El espectro de RMN de <sup>1</sup>H se puede ver en el Apéndice Figura 54. Además de (1) se obtuvo como producto minoritario a la

cumarina lineal. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la piranocumarina lineal se puede observar en el Apéndice Figura 55.



### 7.1.2 Síntesis de *cis*-quelactona (**2**)

La *cis*-quelactona (**2**) se preparó a partir de la piranocumarina (**1**) obtenida en el paso anterior. Después de la CC se obtuvo un sólido blanco (140 mg, 72 %).  $R_f = 0.15$  (hexano/AcOEt 7:3),  $[\alpha]_D^{25} + 23^\circ$ , la  $[\alpha]$  descrita para el enantiómero *R,R* es de +57, por lo que haciendo uso de la ecuación e.e. =  $([\alpha]_{\text{obs}}/[\alpha]_{\text{max}}) \cdot 100$ , se determinó que la mezcla enantiomérica tiene un e.e. del 70 %. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, J/Hz): 1.42 (1H, s), 1.46 (1H, s), 3.87 (1H, d,  $J = 5.06$  Hz, 3'), 5.21 (1H, d,  $J = 5.06$  Hz, 4'), 6.25 (1H, d,  $J = 9.47$  Hz, 3), 6.80 (1H, d,  $J = 8.62$  Hz, 6), 7.30 (1H, d,  $J = 8.62$  Hz, 5), 7.66 (1H, d,  $J = 9.47$  Hz, 4). Los datos son esencialmente los mismo que aquellos descritos por (Song *et al.*, 2012) El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se encuentra en el Apéndice Figura 56.

La síntesis de (**2**) se logró con un exceso enantiomérico importante del 70 %. El reactivo de AD-mix  $\alpha$  fue el responsable de este resultado, esta mezcla de reactivos también conocido como reactivo de Sharpless (Kolb *et al.*, 1994), contiene un inductor quiral el cual promueve el ataque al doble enlace preferentemente por una de las caras, favoreciendo la síntesis de uno de los enantiómeros.

### 7.1.3 Síntesis de los diastereómeros (**3** y **4**)

Con el objetivo de purificar la mezcla enantiomérica de la *cis*-quelactona (**2**) obtenida en el paso anterior se decidió preparar los diastereómeros **3** y **4**. Los enantiómeros son compuestos que tienen uno o más centros de quiralidad que son imágenes especulares pero no son superponibles, a excepción de la actividad óptica, todas las propiedades físicas de un par de enantiómeros son exactamente las mismas. Por otro lado, los diastereómeros son estereoisómeros que tienen dos o más centros quirales que no son imágenes especulares y tampoco son superponibles (Wade, 1993). Aunque es posible separar un par de enantiómeros con columnas quirales, el uso de una columna quiral no garantiza

la separación de todos los enantiómeros existentes y se necesitarían probar distintas columnas quirales para poder separar eficientemente estas moléculas. Por esta razón, de quiralidad decidimos sintetizar los diastereómeros añadiendo un nuevo centro de quiralidad ópticamente puro.

La reacción de la *cis*-quelactona (**2**) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con el ácido (*S*)-2-metil-3-butanóico condujo a la obtención de los regioisómeros (**3** y **4**) con sus respectivos diastereómeros con un rendimiento global del 87 % (Figura 17). Probablemente a través de un ataque nucleofílico de los hidroxilos sobre el carbono carbonílico para dar los productos correspondientes.

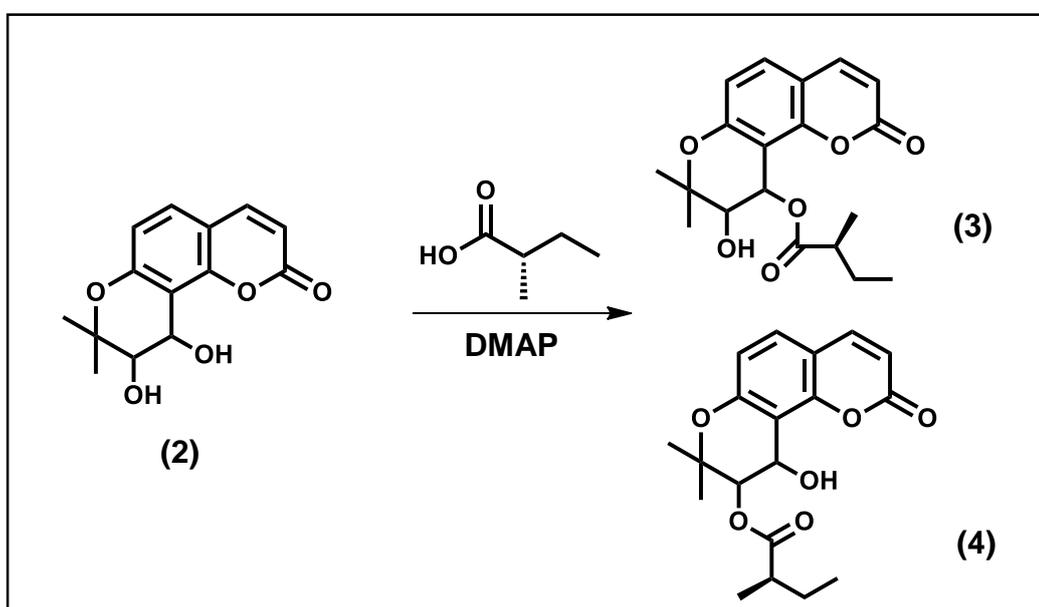
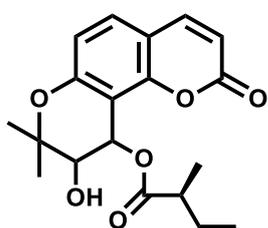
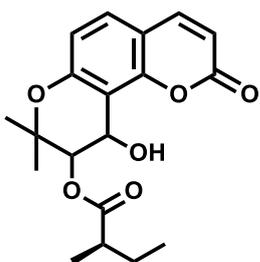


Figura 17. Síntesis de los regioisómeros **3** y **4**



#### 4'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (**3**)

La mezcla de los diastereómeros de (**3**) se recuperó como un sólido blanco con un rendimiento general del 87 %, R<sub>f</sub> = 0.26 (hexano/AcOEt 7:3). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm): 0.86 (3H, m, 6''), 1.08 (3H, d, 4''), 1.34 (3H, s, 6'), 1.50 (3H, s, 5'), 1.75 (2H, m, 5''), 2.48 (1H, m, 3''), 2.93 (1H, s, OH), 4.06 (1H, m, 3'), 6.22 (1H, d, 3), 6.40 (1H, d, 4'), 6.80 (1H, d, 6), 7.36 (1H, d, 5), 7.61 (1H, d, 4). El espectro de RMN de <sup>1</sup>H se puede ver en el Apéndice (Figura 57).



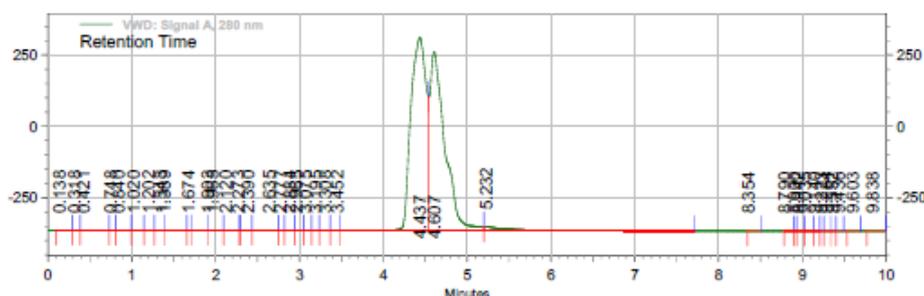
### 3'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (4)

La mezcla de los diastereómeros de (4) se recuperó como un sólido blanco con un rendimiento general del 87 %,  $R_f = 0.50$  (hexano/AcOEt 7:3). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.95 (3H, m, 6''), 1.22 (3H, d, 4''), 1.41 (3H, s, 6'), 1.50 (3H, s, 5'), 1.76 (2H, m, 5''), 2.52 (1H, m, 3''), 3.15 (1H, s, OH), 5.13 (1H, d, 3'), 5.41 (1H, m, 4'), 6.26 (1H, d, 3), 6.80 (1H, d, 6), 7.34 (1H, d, 5), 7.65 (1H, d, 4). El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se puede ver en el Apéndice (Figura 58).

La identificación de los regisómeros **3** y **4** fue posible gracias a experimentos bidimensionales de RMN de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HMBC (Apéndice Figura 59 y 60). Así, por ejemplo, en el compuesto (**3**) la señal de H-4' mostró correlación con los carbonos 7, 8, 9, 2', 3', y 2'' siendo esta última correlación con el carbono carbonílico del ester que se adicionó al hidroxilo de la posición 4'.

#### 7.1.3.1 HPLC de los diastereómeros

Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes por lo que, en principio, pueden ser separados por métodos convencionales. Por lo anterior, se decidió separar la mezcla de diastereómeros por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se aplicaron diferentes medios de elución isocráticos y con gradiente sin embargo no fue posible separar la mezcla (Figura 18). En la literatura existen ejemplos con moléculas similares donde no se pudieron separar mezclas de diastereómeros (Huang *et al.*, 1994). Por lo que se decidió ya no seguir con este método de separación.



**Figura 18.** Cromatograma de HPLC de la mezcla de diastereómeros (**3** y **4**), utilizando un medio de elución (80/20) THF/ $\text{CH}_3\text{CN}$ :hexano(1:1).

#### 7.1.4 Síntesis del compuesto diesterificado (5)

En un esfuerzo final por separar la mezcla de diasterómeros se probó la esterificación de **3** con ácido angélico. Sin embargo, el producto de reacción mostró la formación del diéster con el ácido angélico epimerizado a tíglico y no se observó diferencia de  $R_f$  de los productos diesterificados.

La reacción del compuesto (**3**) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con ácido angélico condujo al compuesto diesterificado **5** con un rendimiento del 81 % (Figura 19).

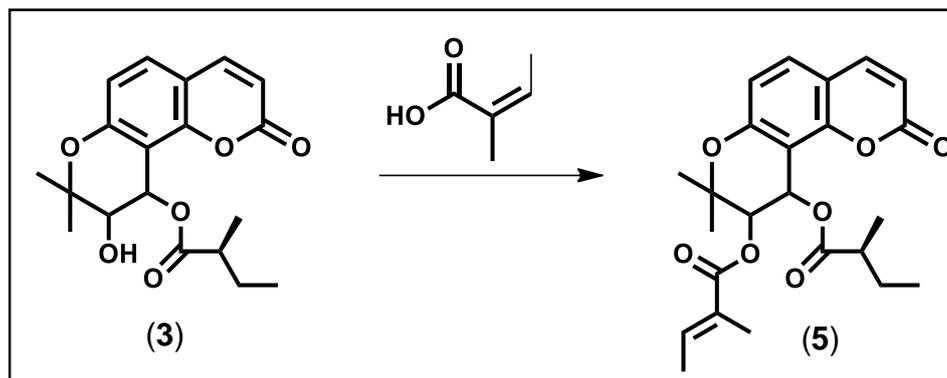
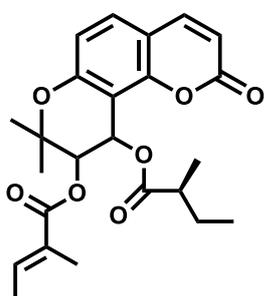


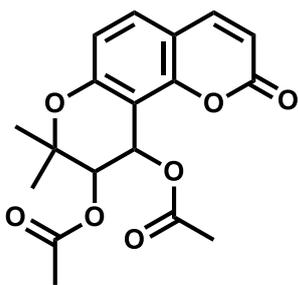
Figura 19. Síntesis del compuesto diesterificado



#### 3'-O-tigloil-4'-O-( $\alpha$ -metilbutiril)-*cis*-quelactona (**5**)

Se recuperó unos cristales translúcidos, 45 mg del 81 %,  $R_f = 0.46$  (hexano/AcOEt 7:3). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.91 (3H, m, 6''), 1.23 (3H, d, 4''), 1.42 (3H, s, 6'), 1.48 (3H, s, 5'), 1.73 (2H, m, 5''), 1.79 (3H, m, 3'''), 1.83 (3H, s, 4'''), 2.37 (1H, m, 3''), 5.38 (1H, d, 3'), 6.22 (1H, d, 3), 6.58 (1H, d, 4'), 6.81 (1H, d, 6), 6.99 (1H, m, 5'''), 7.35 (1H, d, 5), 7.59 (1H, d, 4). En el Apéndice, Figura 61 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

Después de los esfuerzos anteriores por separar la mezcla de enantiómeros de **2** se decidió evaluar una mezcla enantiomérica enriquecida con la stereoquímica *R,R* de 3',4'-di-*O*-acetil-*cis*-quelactona.



### 7.1.5 Síntesis de 3',4'-di-O-acetil-*cis*-quelactona [DOAcQ] (6)

DOAcQ se preparó a partir de la *cis*-quelactona (2) obtenida en la segunda etapa de reacción, recuperándose un sólido blanco 24 mg con un rendimiento del 41 %,  $R_f = 0.21$  (hexano/AcOEt 7:3).

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, J/Hz): 1.41 (3H, s), 1.45 (3H, s), 2.10 (3H, s), 2.14 (3H, s), 5.31 (1H, d,  $J = 4.86$  Hz), 6.24 (1H, d,  $J = 9.47$  Hz), 6.55 (1H, d,  $J = 4.86$  Hz), 6.81 (1H, d,  $J = 8.66$  Hz), 7.36 (1H, d,  $J = 8.66$  Hz), 7.61 (1H, d,  $J = 9.47$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.59 (2'''), 20.65 (2''), 22.73 (6'), 24.78 (5'), 60.94 (4'), 70.10 (3'), 77.54 (2'), 106.81 (8), 112.58 (3), 113.17 (8a), 114.39 (6), 129.18 (5), 143.29 (4), 153.95 (7), 156.62 (4a), 159.87 (2), 170.00 (1''), 170.02 (1'''). HRMS (EI) masa calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$  [M+] 346.1053, masa medida: 346.1039. En el Apéndice, Figura 62 se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$ . En el Apéndice, Figura 63, se muestra el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . En el Apéndice Figura 64 se muestra el espectro de masas de alta resolución de la misma.

La síntesis de DOAcQ se obtuvo después de diferentes etapas de reacción que involucraron la formación de un ciclo, una oxidación enantioselectiva del doble enlace y una última esterificación del compuesto el cual se obtuvo con un exceso enantiomérico del 70 %. En la literatura se han sintetizado moléculas similares por ejemplo Suzuki y colaboradores sintetizaron varios derivados de *cis*-quelactona, los cuales fueron evaluados en linfocitos H9 para inhibir al virus de la inmunodeficiencia humana, estos derivados mostraron rendimientos desde el 38 al 60 %. Por otro lado, Ren y colaboradores sintetizaron y evaluaron diferentes derivados de 4-metil-(3'S,4'S)-*cis*-quelactona como agentes citotóxicos, este grupo de investigación diseñó moléculas con la estereoquímica S,S y sus rendimientos fueron del 19-52 % con excesos enantioméricos de 74 % (Ren *et al.*, 2013). Comparando nuestros resultados con los descritos podemos decir que los valores son similares pues nosotros obtuvimos un rendimiento del 41 % y un exceso enantiomérico del 70 %. Es interesante hacer notar el hecho de que el cambio de grupo funcionales en las posiciones 3' y 4' hizo que algunas *cis*-

quelactonas mostraran efecto contra el VIH (Suzuki *et al.*, 2006) y que el cambio de estereoquímica pueda promover otras actividades biológicas (Ren *et al.*, 2013).

## **7.2 Experimentos biológicos**

### **7.2.1 Modelo de rata diabética**

Para determinar el efecto hipoglucemiante de DOAcQ fue evaluado en el modelo de rata diabética inducido con estreptozotocina (STZ); a pesar de que existen una gran cantidad de modelos animales para evaluar posibles efecto hipoglucemiantes, en este proyecto se decidió utilizar el modelo por inducción con STZ, ya que STZ fármaco estructuralmente es una nitrosourea que tiene una potente actividad diabetogénica resultado del daño a las células- $\beta$  del páncreas las cuales se encargan de la síntesis de la insulina. La STZ entra a las células- $\beta$  por medio del transportador de glucosa (GLUT-2). Dentro de la célula la estreptozotocina alquila al ADN, estos daños promueven la activación de proteínas reparadoras como la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1), está proteína cuando se activa es benéfica para la células, sin embargo el efecto de la estreptozotocina genera una sobrestimulación de PARP-1, está hiperactivación genera una disminución en su substrato ( $\text{NAD}^+$ ). Esta molécula es muy importante porque participa en el metabolismo de energía y por lo tanto, una disminución en la concentración de  $\text{NAD}^+$  resulta en una disminución de ATP, lo que genera un daño a las células. Además de esto también las células- $\beta$  pueden verse afectadas por la generación de especies reactivas de oxígeno provocadas por la STZ (Szkudelski, 2012). Este modelo animal es el más utilizado para evaluar posibles nuevos fármacos para tratar la diabetes.

#### **7.2.1.1 Peso de los grupos experimentales**

En la Tabla 13 se observan los pesos de los grupos experimentales después de 15 días de administración diaria de los tratamientos. Los grupos Diabético y Vehículo sin tratamiento mostraron pesos corporales de  $348.6 \pm 31.5$  y  $323.8 \pm 14.8$  g respectivamente, lo que esta por debajo del peso corporal del grupo Sano que mostró un peso de  $398.8 \pm 24.3$  g, Los grupos Diabéticos con los diferentes

tratamientos incluyendo a DOAcQ mostraron un incremento con diferencia estadísticamente significativa comparándolos contra el grupo Diabético sin tratamiento, estos pesos fueron Glibenclamida  $385.5 \pm 18.2$  g, Metformina  $397.0 \pm 22.9$  g, Pioglitazona  $374.0 \pm 31.6$  g y DOAcQ  $365.1 \pm 6.7$  g.

Con los resultados obtenidos podemos observar que el grupo Sano tiene un constante incremento en su peso corporal, los grupos sin tratamientos mantuvieron o perdieron peso y aquellos grupos tratados con los diferentes fármacos mostraron un incremento en sus pesos corporales cercanos al grupo Sano. Es importante destacar que el grupo tratado con DOAcQ presentó un incremento con diferencia estadísticamente significativa comparado contra el grupo Diabético. En la literatura existen referencias donde se puede apreciar que en modelos animales de diabetes, los grupos diabéticos mantienen o pierden su peso corporal y que aquellos grupos que son tratados con extractos, fracciones de extractos o compuestos puros obtenidos de plantas pueden mejorar el peso de estos animales tratados. Dahake y colaboradores evaluaron el efecto del extracto metanólico de *Madhuca longifolia bark* a dosis de 100 y 200 mg/kg en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, ellos encontraron que el grupo diabético sin tratamiento disminuía su peso corporal ( $150.8 \pm 2.3$  a  $114.0 \pm 2.8$  g) y que aquellos grupos tratados con los extractos podían evitar o prevenir esta pérdida a dosis de 100 mg/kg ( $160.0 \pm 3.1$  a  $152.4 \pm 1.5$  g) y 200 mg/kg ( $158.9 \pm 4.1$  a  $169.5 \pm 0.7$  g) (Dahake *et al.*, 2009), por otro lado Saravana y colaboradores demostraron que la administración a 100 mg/kg de una fracción de *Madhumega chooranam* puede incrementar el peso corporal ( $161 \pm 7$  a  $168.5 \pm 12.3$  g) comparado contra el grupo diabético ( $161.3 \pm 3.7$  a  $113.2 \pm 21.6$  g) (Saravana *et al.*, 2009). Kamalakkannan y Prince evaluaron el efecto de Rutina un compuesto puro en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, el grupo diabético sin tratamiento mostró una clara disminución de peso ( $172.5 \pm 13.1$  a  $131.0 \pm 9.9$  g), esta disminución fue evitada por la administración del compuesto rutina a 50 mg/kg ( $166.6 \pm 11.3$  a  $140.6 \pm 9.5$  g) y 100 mg/kg ( $162.0 \pm 12.3$  a  $149.0 \pm 11.4$ ) (Kamalakkannan y Prince, 2006). La prevención en la disminución de peso puede ser debido a un mejor control de la diabetes.

La insulina es la hormona anabólica más potente que se conoce, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, además de

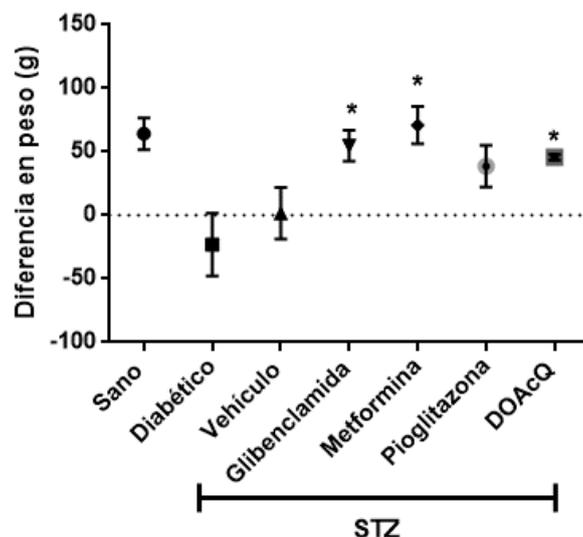
inhibir su degradación (Saltiel y Khan, 2001). Las células- $\beta$  son responsables de la producción de insulina, la hiperglucemia puede causar la muerte de estas células (Ortis *et al.*, 2012). Además la hiperglucemia puede estimular el incremento de EROs y citocinas lo que conduce a la inestabilidad de las membranas por la peroxidación lipídica, lo que lleva a necrosis celular y subsecuente daño a los órganos y tejidos afectados (Kanchan *et al.*, 2016). En la Figura 20 se observa la diferencia en peso que hubo después de los tratamientos, y se sabe que la pérdida de peso en los pacientes diabéticos es debido a estos daños, compuestos con la estructura de piranocumarina pueden disminuir la hiperglucemia así como de disminuir el estrés oxidativo (Kumar *et al.*, 2009). Por lo tanto, una mejoría en el peso corporal puede ser debido a que DOAcQ puede producir un mejor control de la hiperglucemia por disminución de EROs y citocinas.

**Tabla 13.** Peso después de 15 dosis de administración (15 mg/kg) en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Grupo	Día 0 (g)	Día 7 (g)	Día 21 (g)	Peso ganado (g)
Sano	334.5 ± 15.7	345.0 ± 15.8	398.8 ± 24.3	64.3 ± 28.9*
Diabético	371.6 ± 10.2	370.0 ± 13.0	348.6 ± 31.5	-23.0 ± 33.1#
Diabético + Vehículo	321.5 ± 11.1	323.1 ± 6.4	323.8 ± 14.8	2.2 ± 18.5#
Diabético + Glibenclamida	330.7 ± 9.2	341.4 ± 13.1	385.5 ± 18.2	54.8 ± 20.4*
Diabético + Metformina	326.0 ± 8.3	335.7 ± 15.9	397.0 ± 22.9	71.0 ± 24.4*
Diabético + Pioglitazona	335.3 ± 18.1	348.7 ± 15.3	374.0 ± 31.6	38.7 ± 36.4
Diabético + DOAcQ	319.4 ± 6.9	335.3 ± 10.9	365.1 ± 6.7	45.7 ± 9.7*

\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* (n = 10; media ± E.E.; p < 0.05.).

#Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Sano por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* (n = 10; media ± E.E.; p < 0.05.). Vehículo: Agua 2/1 DMSO. Glibenclamida fue administrada a 2.5 mg/kg, peso ganado = peso en el día 21, menos el peso en el día 0 (N = 10, media ± E.E., p < 0.05). El tratamiento empezó en el día 7 después de la inducción con estreptozotocina.



**Figura 20.** Diferencia en peso (g) de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Sano, Diabético, Vehículo: agua 2/1 DMSO, Glibenclamida, DOAcQ. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 10$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

### 7.2.1.2 Niveles de glucosa periférica

En la Tabla 14 se observa los valores de glucosa en ayuno de los diferentes grupos experimentales. El grupo Diabético y Vehículo sin tratamiento mostraron niveles de glucosa elevados  $327.5 \pm 23.9$  mg/dL y  $406.3 \pm 38.4$  mg/dL respectivamente, los grupos que recibieron los tratamientos disminuyeron los valores de glucosa después de 15 días de tratamiento diario de Glibenclamida ( $142.0 \pm 5.5$  mg/dL), Metformina ( $123.3 \pm 8.4$  mg/dL), Pioglitazona ( $169.3 \pm 62.9$  mg/dL) comparados con el grupo diabético. El tratamiento de DOAcQ por 15 días a una dosis de 15 mg/kg también disminuyó los valores de glucosa de manera estadísticamente significativa de  $327.5 \pm 23.9$  a  $128.3 \pm 6.4$  mg/dL. Estos resultados indican que DOAcQ pueden mejorar el metabolismo de la glucosa. En la literatura existen muchos trabajos de la evaluación de extractos de plantas con actividad antidiabética. Por ejemplo, Irudayaraj y colaboradores evaluaron diferentes extractos de *Toddalia asiatica* (L.) Lam. en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina a dosis de 250 y 500 mg/kg. El extracto obtenido con acetato de etilo a 500 mg/kg demostró la mayor actividad, disminuyendo los

niveles de glucosa de  $290.38 \pm 1.89$  a  $108.27 \pm 4.38$  mg/dL. Adicionalmente este extracto incrementó la actividad de CAT, GPx y SOD (Irudayaraj *et al.*, 2012). Patil y colaboradores encontraron que fracciones obtenidas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *Kalanchoe pinnata* pueden disminuir los niveles de glucosa en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina de  $359 \pm 11$  a  $109.10 \pm 10$  mg/dL (Patil, 2013). Por otro lado, Becerra-Jiménez y Andrade-Cetto evaluaron el efecto de *Opuntia streptacantha* en una prueba de tolerancia a la maltosa, el extracto ejerció un efecto antidiabético, disminuyendo la glucosa de  $290 \pm 19$  a  $141 \pm 4$  mg/dL (Becerra-Jiménez y Andrade-Cetto, 2012). En lo que concierne a compuestos puros, Zhang y colaboradores evaluaron a Skimmina, una cumarina a dosis de 15 mg/kg, su administración disminuyó los niveles de glucosa de  $494.4 \pm 5.0$  a  $390.0 \pm 10.1$  mg/dL, adicionalmente Skimmina reguló al factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1), lo que mejoró la nefropatía en ratas (Zhang *et al.*, 2012). Cloricromona y XLF-III-43, otras cumarinas, han sido evaluadas en nefropatía diabética ambas mejoraron las complicaciones diabéticas por ayudar a preservar la barrera hemato-retinal e inhibiendo a los productos terminales de glucosilación avanzada. Los valores de glucosa obtenidos en nuestro trabajo fueron similares a los resultados obtenidos en estos estudios. DOAcQ también redujo los valores de glucosa de manera importante comparado contra el grupo Diabético sin tratamiento  $327.5 \pm 23.9$  a  $128.3 \pm 6.4$  mg/dL. Estos resultados demuestran que DOAcQ tiene una interesante actividad hipoglucemiante.

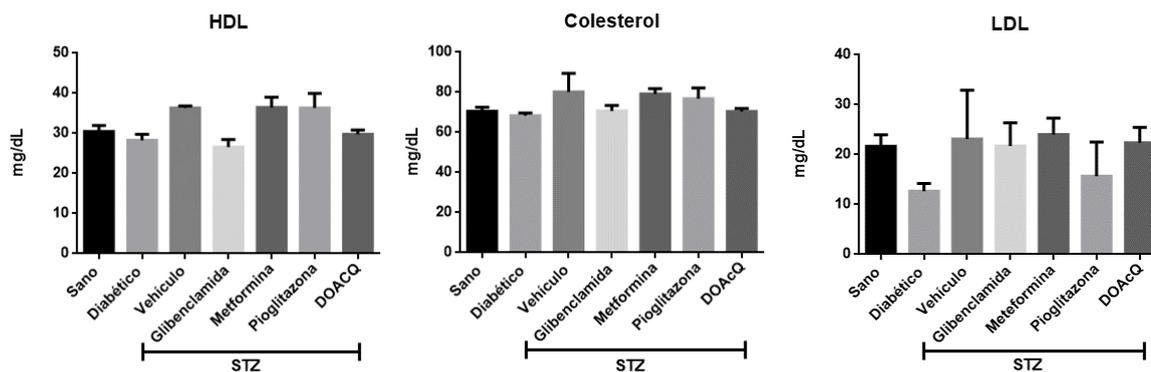
**Tabla 14.** Efecto de la administración de 15 dosis de DOACQ (15 mg/kg) en la glucosa de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina en ayuno.

Grupo	Día 0 (mg/dL)	Día 7 (mg/dL)	Día 14 (mg/dL)	Día 21 (mg/dL)	Día 21 (incremento en glucosa) (mg /dL)
<b>Sano</b>	61.3 ± 3.0	106.8 ± 4.8	98.3 ± 3.1	90.5 ± 8.5	29.3 ± 9.1*
<b>Diabético</b>	54.0 ± 2.6	371.8 ± 81.4	326.5 ± 72.3	327.5 ± 23.9	273.5 ± 21.8
<b>Diabético + Vehículo</b>	69.5 ± 8.5	272.0 ± 78.2	368.0 ± 65.3	406.3 ± 38.4	336.8 ± 24.8
<b>Diabético + Glibenclamida</b>	63.8 ± 7.3	211.7 ± 45.2	282.8 ± 75.4	142.0 ± 5.5	78.3 ± 24.8*
<b>Diabético + Metformina</b>	55.3 ± 1.3	371.8 ± 81.4	270.5 ± 63.8	123.3 ± 8.4	68.0 ± 26.6*
<b>Diabético + Pioglitazona</b>	54.7 ± 9.2	327.0 ± 24.9	299.3 ± 78.9	169.3 ± 62.9	144.7 ± 26.6*
<b>Diabético + DOAcQ</b>	72.9 ± 5.2	363.2 ± 70.3	280.7 ± 76.4	128.3 ± 6.4	55.4 ± 19.2*

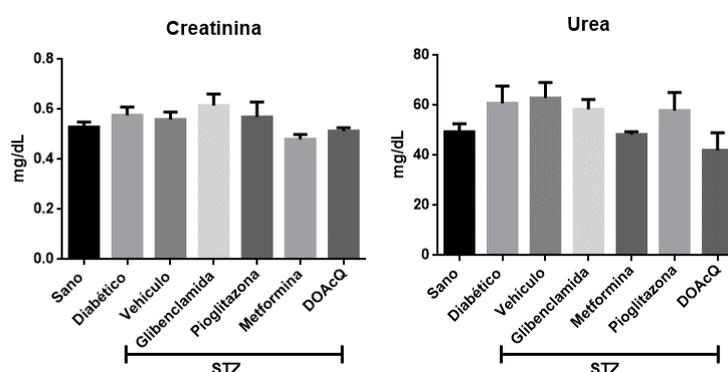
\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* (n = 10; media ± E.E.; p < 0.05.). Vehículo: agua 2/1 DMSO. La glibenclamida fue administrada a 2.5 mg/kg, glucosa incrementada = glucosa en el día 21, menos la glucosa en el día 0) El tratamiento empezó en el día 7 después de la inducción con estreptozotocina.

### 7.2.1.3 Perfil bioquímico

En las Figuras 21 y 22 se muestran los datos del perfil de lípidos, hepático y renal de los diferentes grupos experimentales. Con estos análisis no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales. Lo que sugiere que la administración de DOAcQ no modifica estos perfiles y no causó daño a nivel hepático y renal. Esto es consistente con las observaciones macro y microscópicas de los órganos analizados en la histología.



**Figura 21.** Perfil de lípidos de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).



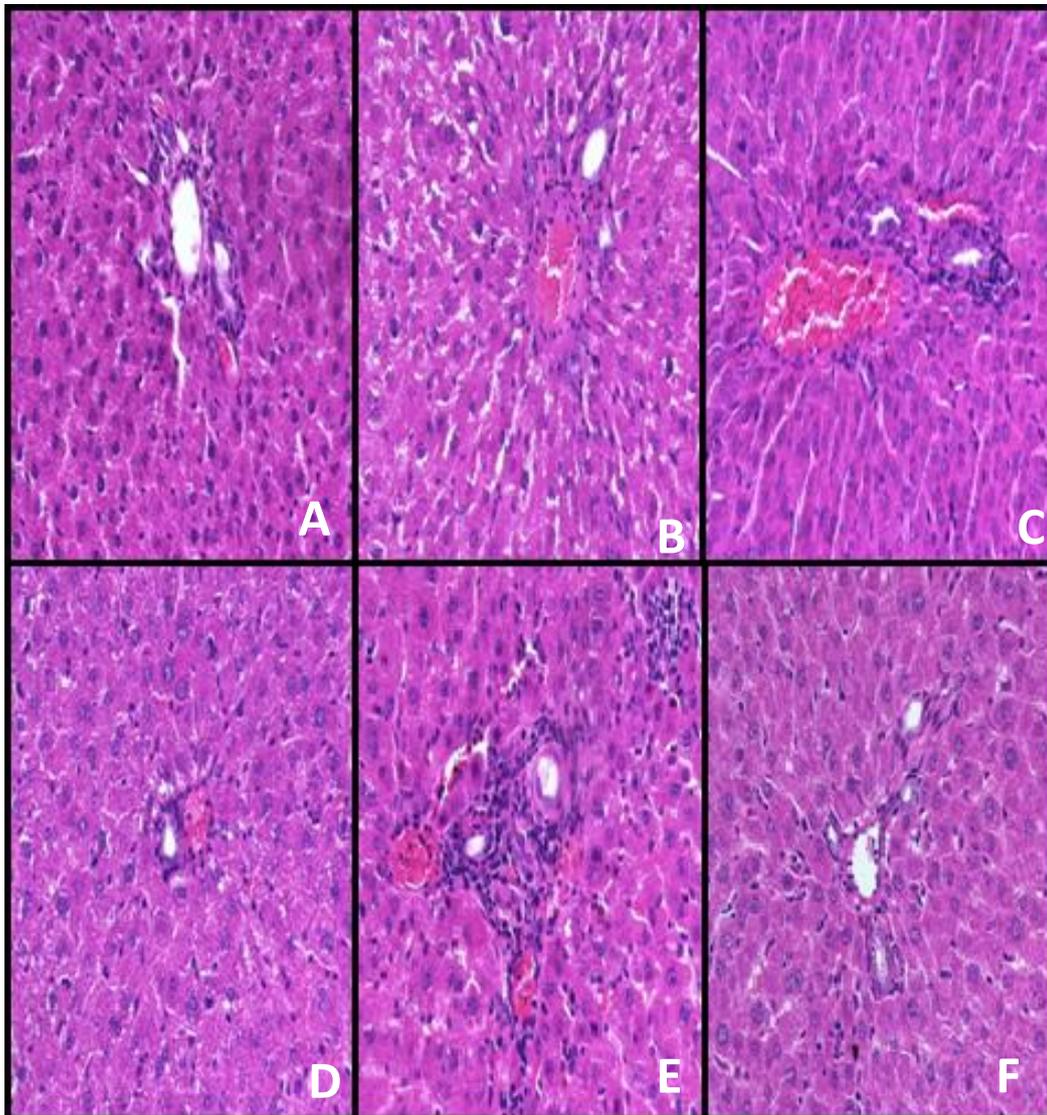
**Figura 22.** Perfil hepático y renal de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

#### 7.2.1.4 Análisis histopatológico

Al analizar los cortes histológicos de algunos órganos de los diferentes grupos experimentales, se pudo observar lo siguiente:

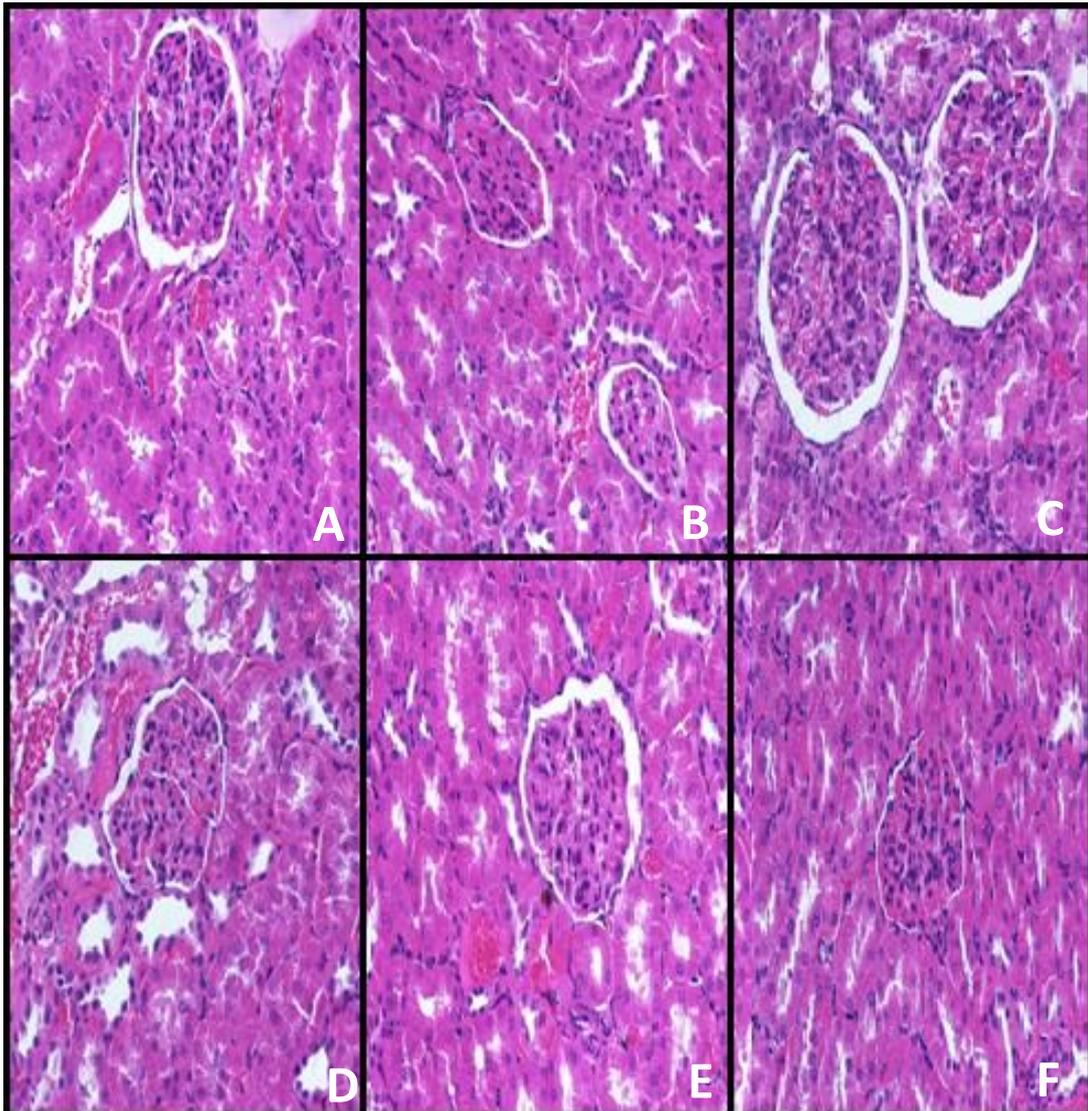
Los cortes de **hígado** de los animales tratados con el compuesto DOAcQ muestran una arquitectura normal de hepatocitos de forma poligonal y lobulillos hepáticos normales de forma hexagonal con vena central y triada portal (arteria hepática, vena porta y conducto biliar). No se observaron lesiones hepáticas como degeneración de los hepatocitos o acumulaciones intracelulares ni procesos de inflamación, fibrosis, necrosis o apoptosis. En el grupo Diabético se

observa una arquitectura morfológica alterada con una mayor presencia de espacios sinusoidales y disminución de la cantidad de hepatocitos (Figura 23).



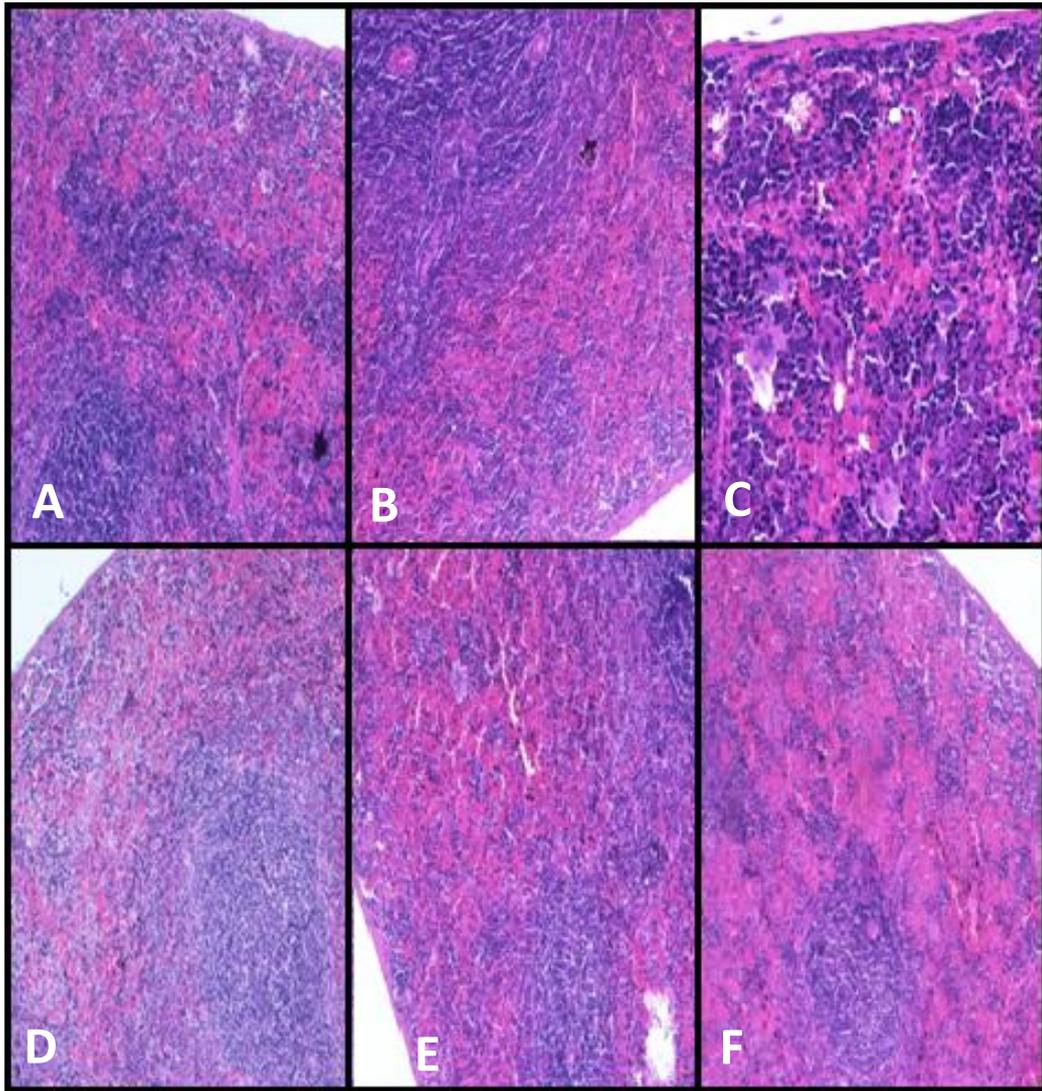
**Figura 23.** Histología de hígado de los diferentes grupos experimentales. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético + Glibenclamida, D) Diabético + Metformina, E) Diabético + Pioglitazona, F) Diabético + DOAcQ. Observados a 100X.

Las secciones de **riñón** de los animales tratados con el compuesto DOAcQ muestran una corteza renal normal con arquitectura normal de glomérulos y túbulo proximales y distales, en la médula muestra túbulo colectores, proximales y distales normales. En el grupo diabético sin tratamiento se observa una estructura funcional diferente con túbulo de diferentes tamaños (Figura 24).



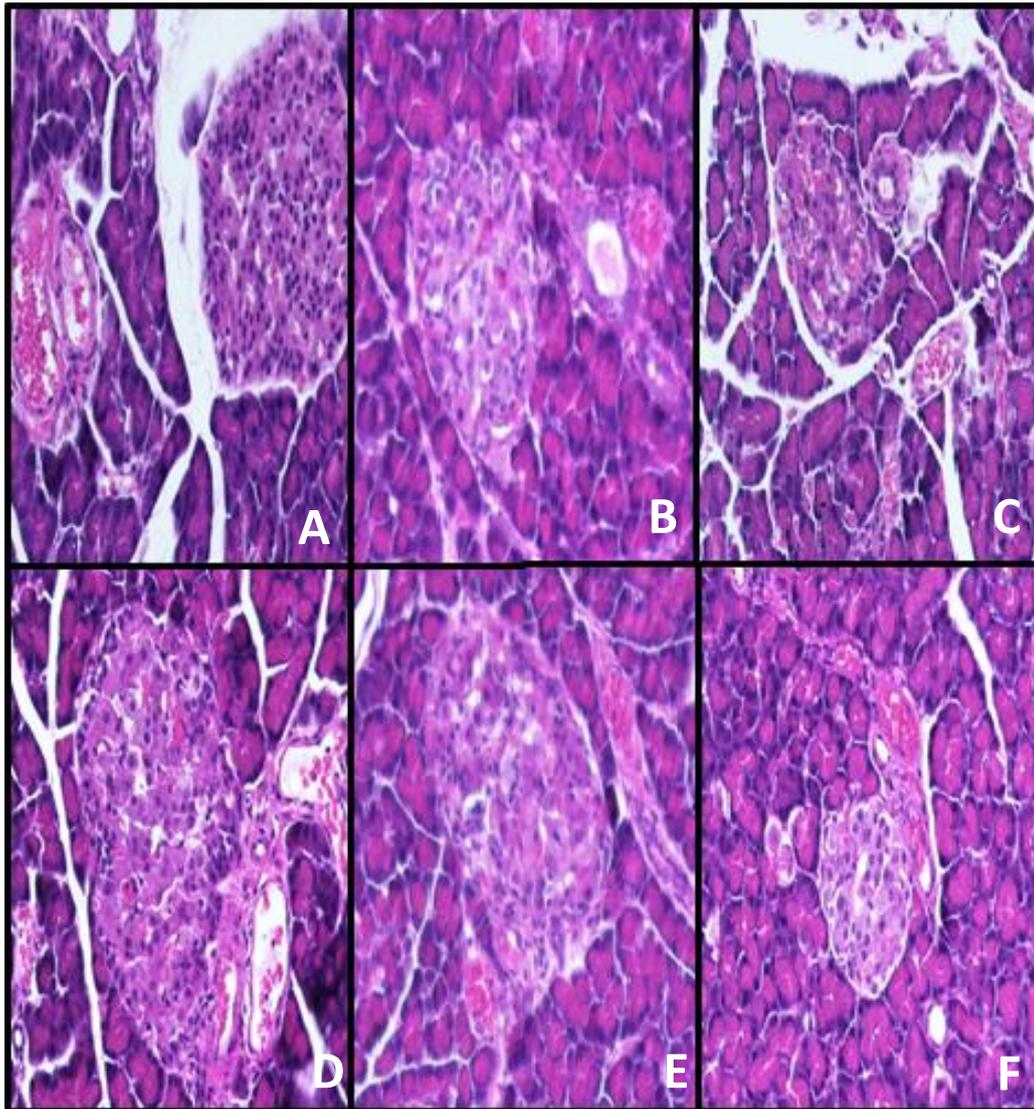
**Figura 24.** Histología de riñón de los grupos experimentales. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético + Glibenclamida, D) Diabético + Metformina, E) Diabético + Pioglitazona, F) Diabético + DOAcQ. Observado a 100X.

Los cortes histológicos de **bazo** de los animales tratados con el compuesto DOAcQ muestran integridad de la cápsula, mientras que en el parénquima se observa una distribución equilibrada de la pulpa esplénica blanca y la pulpa esplénica roja. Se observó la arteriola central en la pulpa blanca y sinusoides esplénicos normales en la pulpa roja. Los animales sin tratar presentan una morfología alterada donde no se observaba una clara distinción entre las pulpas blanca y roja (Figura 25).



**Figura 25.** Histología de bazo de los grupos experimentales. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético + Glibenclamida, D) Diabético + Metformina, E) Diabético + Pioglitazona, F) Diabético + DOAcQ. Observado a 100X.

Los cortes de **páncreas** de los animales tratados con el compuesto DOAcQ muestran una arquitectura similar al grupo sano. Se observa los islotes de Langerhans con una integridad igual al grupo sano y una mayor cantidad de células en la parte central de los islotes de Langerhans. De igual forma los acinos pancreáticos presentan una arquitectura normal (Figura 26).

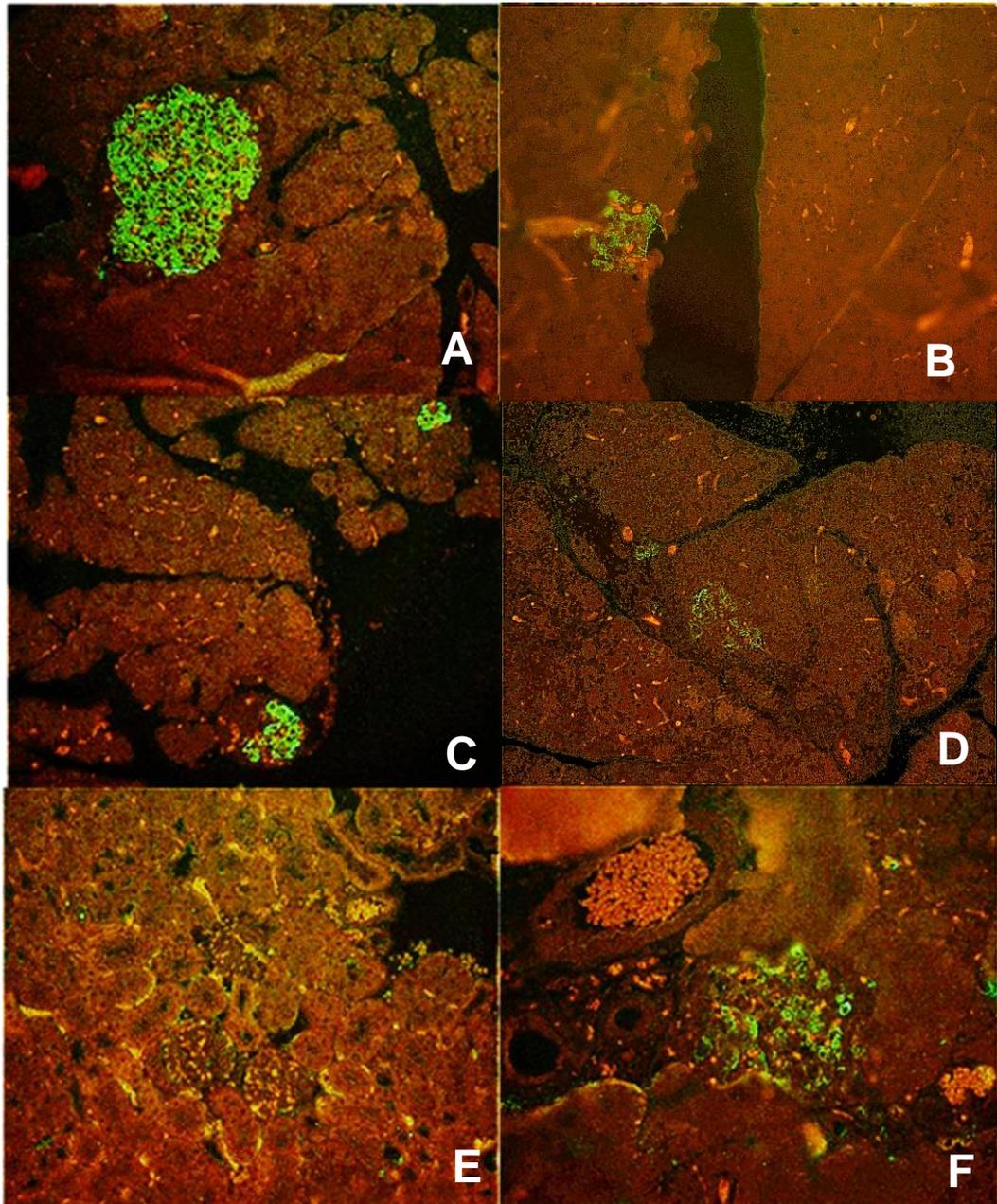


**Figura 26.** Histología de páncreas de los grupos experimentales. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético + Glibenclamida, D) Diabético + Metformina, E) Diabético + Pioglitazona, F) Diabético + DOAcQ. Observado a 100X.

La arquitectura microscópica de los órganos tratados con DOAcQ mostró una morfología más similar al grupo Sano, en contraste con el grupo Diabético. El grupo de Wang y colaboradores y el grupo de Sellamuthu y colaboradores obtuvieron resultados similares, estos autores evaluaron el efecto de la administración de extractos de *Cyclocarya paliurus* y del compuesto Mangiferina, respectivamente (Wang *et al.*, 2013) (Sellamuthu *et al.*, 2013), en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, en los grupos tratados se veía una

disminución en el daño observado en los diferentes tejidos, en contraste con el grupo Diabético sin tratamiento.

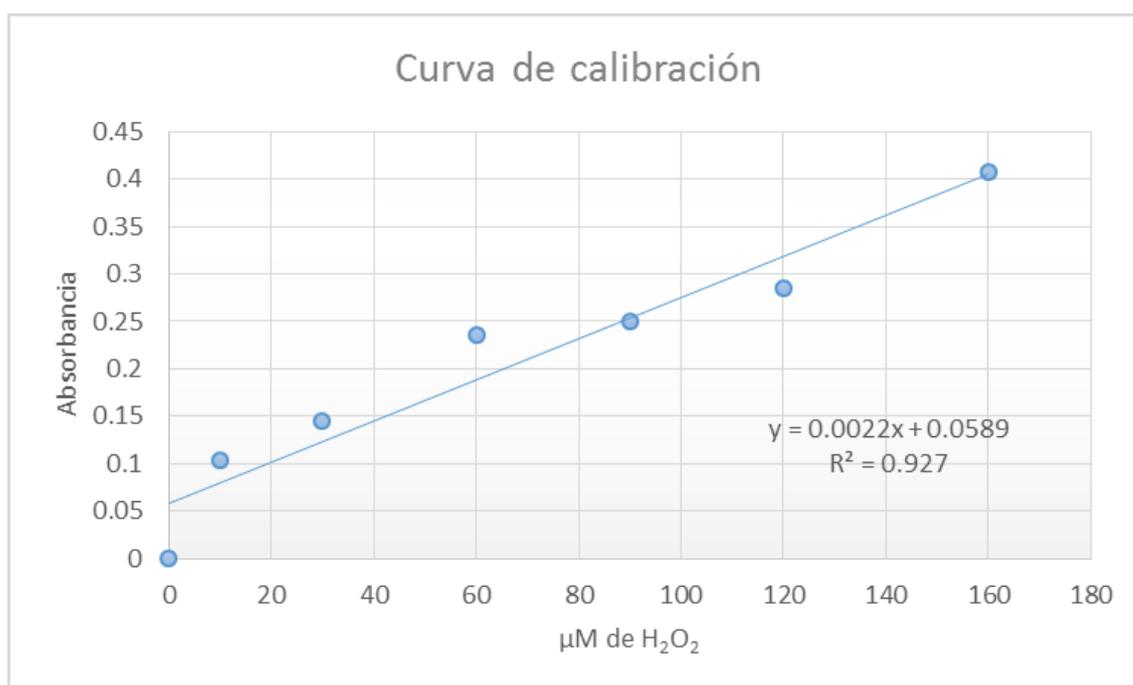
En la Figura 27 se muestra los islotes de Langerhans de los grupos experimentales. En la Figura 27A Se muestran los islotes de Langerhans del grupo Sano, el tamaño y su morfología es evidente que es mayor que en los grupos inducidos a diabetes con estreptozotocina, el grupo Diabético sin tratamiento de la Figura 27B mostró un tamaño menor de los islotes de Langerhans, así como una disminución de células- $\beta$  en comparación con el grupo Sano. En la Figuras 27C, 27D y 27E se muestra los islotes de los grupos tratados con Glibenclamida, Metformina y Pioglitazona, la morfología de ellos muestra una apariencia similiar al grupo diabético. A diferencia, el grupo tratado con DOAcQ que se observa en la Figura 27F mostró una morfología muy parecida al grupo Sano. En las personas con diabetes se observa que hay una progresiva disminución en los niveles de insulina debido a la muerte de las células- $\beta$  después de haber sido diagnosticados con este padecimiento, debido al daño generado por el estrés oxidativo e hiperglucemia. La morfología observada en el grupo tratado con DOAcQ es probablemente debido a la disminución de EROs.



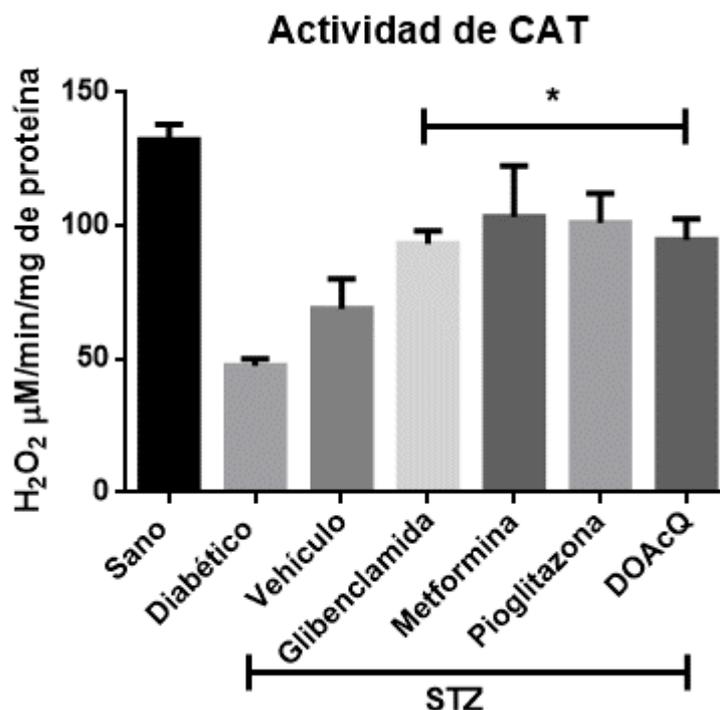
**Figura 27.** Inmunohistoquímica de insulina en páncreas. Anticuerpo dirigido contra insulina. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético + Glibenclamida, D) Diabético + Metformina, E) Diabético + Pioglitazona, F) Diabético + DOAcQ. Observado a 100X.

### 7.2.1.5 Actividad de CAT

En la Figura 28 se muestra la curva de calibración utilizada para la actividad de la CAT, en donde se utilizaron diferentes volúmenes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la Figura 29 se muestra la actividad de la catalasa de los diferentes grupos experimentales. El grupo Sano mostró tener una actividad importante en la actividad porque la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido era de  $132.2 \pm 5.9 \mu\text{M}$ , los grupos Diabético y Vehículo sin tratamiento mostraron una disminución en el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $47.5 \pm 2.6$  y  $68.9 \pm 11.1 \mu\text{M}$  respectivamente, los grupos Diabéticos con los diferentes tratamientos incrementaron de manera estadísticamente significativa el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la siguiente manera: Glibenclamida  $93.2 \pm 4.9 \mu\text{M}$ , Metformina  $103.3 \pm 19.2 \mu\text{M}$ , Pioglitazona  $101.1 \pm 11.1 \mu\text{M}$  y DOAcQ  $94.8 \pm 7.8 \mu\text{M}$ . Este mayor consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrado por los tratamientos se traduce en una mayor actividad de la CAT.



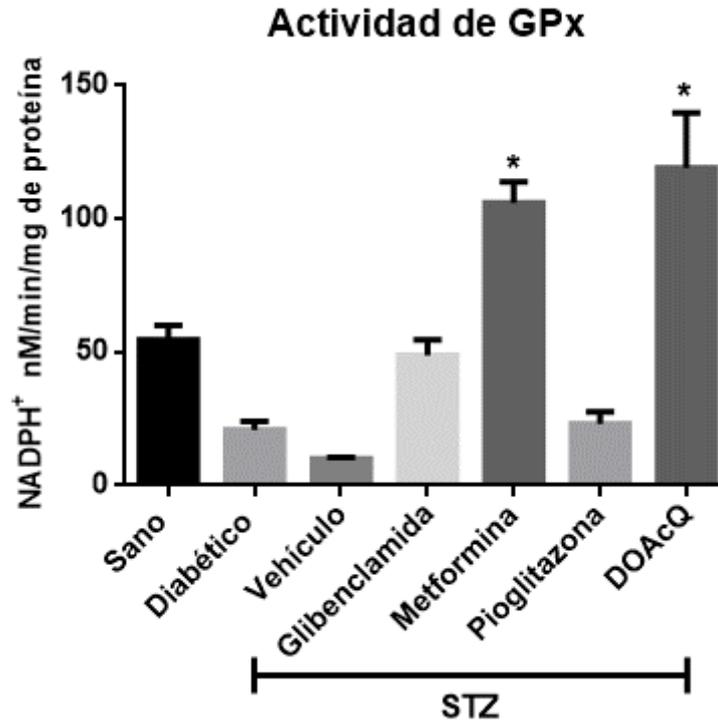
**Figura 28.** Curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad de la CAT.



**Figura 29.** Efecto de DOAcQ sobre la actividad de CAT. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* (n = 6; media ± E.E.; p < 0.05.).

### 7.2.1.6 Actividad de GPx

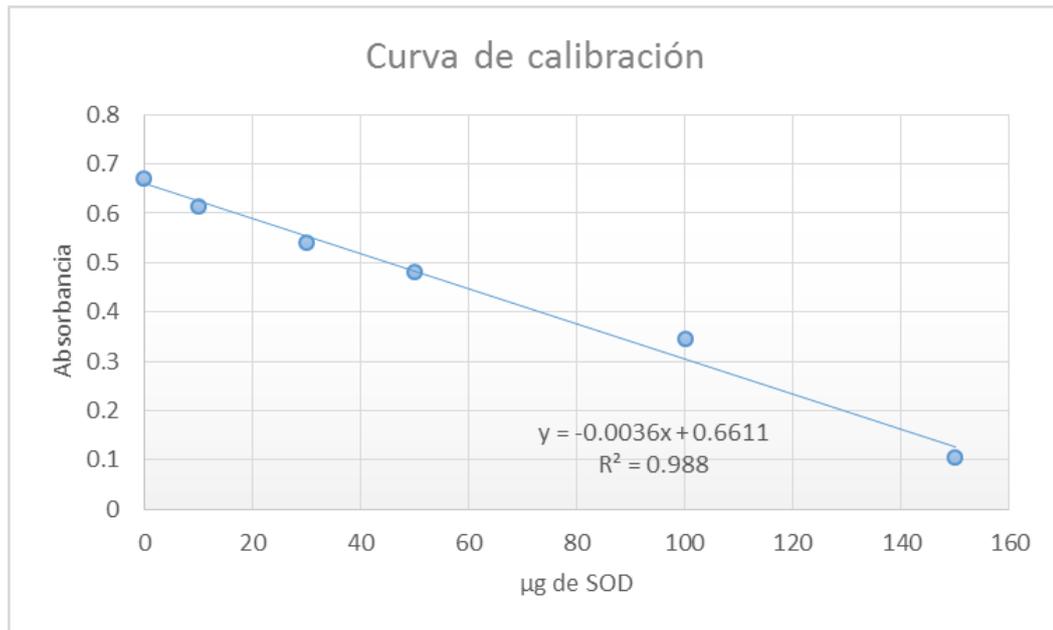
En la Figura 30 se muestra la actividad de GPx de los diferentes grupos experimentales, la medición de la actividad de esta enzima se hace de forma indirecta midiéndose la concentración de NADPH<sup>+</sup>, el consumo de esta especie en el grupo Sano era de 54.6 ± 5.5 µM, en los grupos Diabético y Vehículo sin tratamiento mostraron una disminución en el consumo de NADPH<sup>+</sup> de 20.8 ± 3.3 y 10.0 ± 0.6 µM respectivamente. Solo los grupos Diabéticos tratados con Metformina y DOAcQ incrementaron de manera estadísticamente significativa el consumo de NADPH<sup>+</sup> en 106.0 ± 7.9 y 119.0 ± 20.7 µM respectivamente. Mientras mayor sea el consumo de NADPH<sup>+</sup> esto se traduce en mayor actividad de GPx, por lo tanto la administración de DOAcQ puede mejorar la actividad de esta enzima antioxidante.



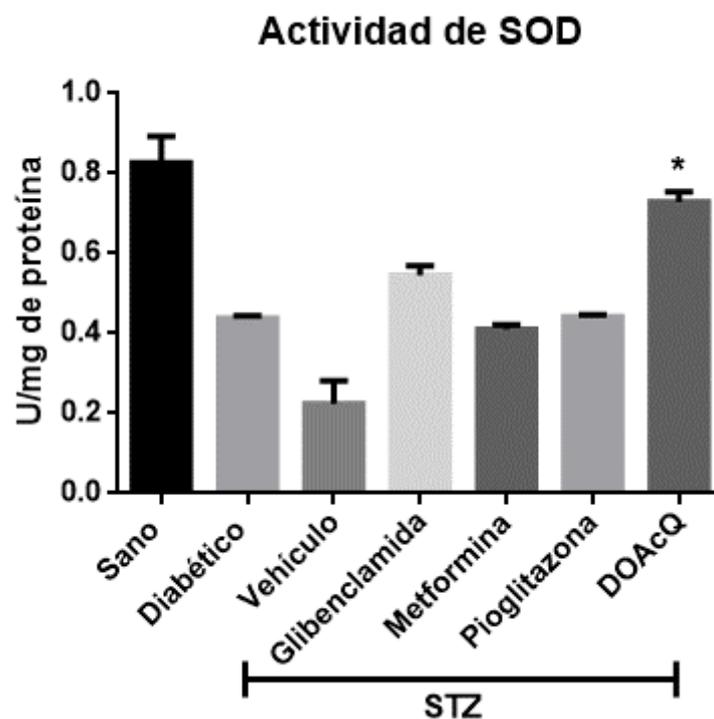
**Figura 30.** Efecto de DOAcQ sobre la actividad de GPx. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 6$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

### 7.2.1.7 Actividad de SOD

En la Figura 31 se muestra la curva de calibración utilizada para la actividad de SOD, donde se utilizaron diferentes cantidades de SOD aislada. En la Figura 32 muestra la actividad de SOD de los diferentes grupos experimentales, el grupo Sano mostró tener  $0.83 \pm 0.06$  U, las unidades de los grupos Diabético y Vehículo sin tratamiento disminuyeron hasta  $0.44 \pm 0.01$  y  $0.22 \pm 0.06$  U respectivamente, solo el grupo tratado con DOAcQ mostró un incremento con diferencia estadísticamente significativa aumentando a  $0.73 \pm 0.03$  U. La administración de DOAcQ incremento las U de SOD y por lo tanto su actividad enzimática.



**Figura 31.** Curva de calibración utilizada para la determinación de la actividad de SOD.



**Figura 32.** Efecto de DOAcQ sobre la actividad de SOD. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ). Una unidad de SOD es definida como la cantidad en  $\mu\text{g}$  de enzima que causa una disminución del 50 % de la reducción de NBT.

El estrés oxidativo es la principal causa para el desarrollo de complicaciones diabéticas; la oxidación de proteínas, retinopatías, nefropatías y neuropatías son algunos de estas complicaciones. Estas patologías están relacionadas con la exacerbación de EROs, los cuales son producidos por la respiración celular y factores ambientales (Reiter *et al.*, 2000). El anión superóxido es un radical que puede producir peróxido de hidrogeno, esta especie es convertida en el radical hidroxilo, el radical más dañino que se conoce. Para evitar la producción del radical hidroxilo, las células poseen enzimas antioxidantes de gran importancia como CAT, GPx y SOD. Estas enzimas remueven los niveles de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, nosotros realizamos una evaluación del efecto que tiene DOAcQ en la actividad de estas enzimas en hígado (Figuras 27, 28 y 30). En los grupos Diabéticos sin tratamiento es evidente que la actividad enzimática está disminuída, aunque todavía no se sabe si esto es una causa o el efecto para el desarrollo de complicaciones diabéticas, es importante mencionar que la administración de DOAcQ incrementó de manera estadísticamente significativa la actividad de estas enzimas (Tabla 15). Los extractos de *Stevia rebaudiana* (Shivanna *et al.*, 2012) y *Eucalyptus globulus* (Ahlem *et al.*, 2009) administrados en modelos de ratas diabéticas incrementaron la actividad de CAT y GPx comparado contra el grupo diabético y se ha demostrado que el incremento de la actividad antioxidante endógena proporciona protección contra el daño producido por EROs (Giacco y Brownlee, 2010,). CAT, GPx y SOD son tres de las principales enzimas antioxidantes. Existen compuestos que son capaces de incrementar la expresión de estas enzimas. Las tiazolidinedionas comprenden una familia de compuestos que poseen esta actividad; sin embargo debido a sus efectos tóxicos algunos de estos compuestos han sido removidos del mercado (Chiang *et al.*, 2012). Nuestros resultados proporcionan evidencia que DOAcQ puede incrementar la actividad de CAT, GPx y SOD, ya sea por una sobreestimulación enzimática o una mayor expresión de estas proteínas, lo que se puede traducir en una disminución de EROs y por lo tanto, DOAcQ disminuye el daño por estrés oxidativo.

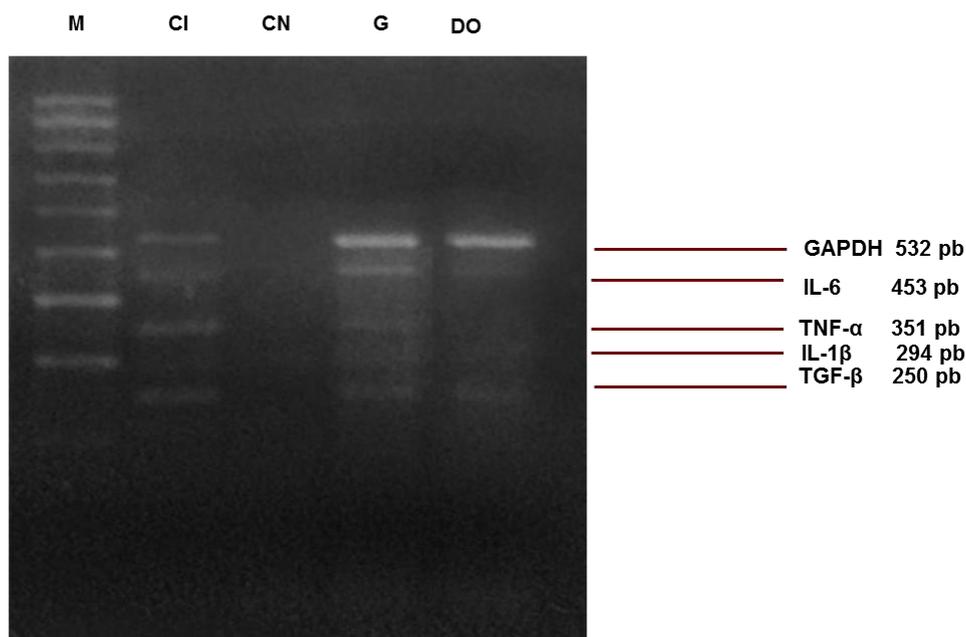
**Tabla 15.** Efecto de la administración de DOAcQ (15 mg/kg) en la actividad de enzimas antioxidantes de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Grupo	CAT H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> consumido ( $\mu$ M/min/mg proteína)	GPx NADPH <sup>+</sup> consumido ( $\mu$ M/min/mg proteína)	SOD Unidades de SOD (U/min/mg proteína)
Sano	132.2 $\pm$ 5.9	54.6 $\pm$ 5.5	0.83 $\pm$ 0.06
Diabético	47.5 $\pm$ 2.6	20.8 $\pm$ 3.3	0.44 $\pm$ 0.01
Diabético + Vehículo	68.9 $\pm$ 11.1	10.0 $\pm$ 0.6	0.22 $\pm$ 0.06
Diabético + Glibenclamida	93.2 $\pm$ 4.9*	48.8 $\pm$ 5.8*	0.55 $\pm$ 0.02
Diabético + Metformina	103.3 $\pm$ 19.2	106.0 $\pm$ 7.9	0.41 $\pm$ 0.01
Diabético + Pioglitazona	101.1 $\pm$ 11.1	23.2 $\pm$ 4.5	0.44 $\pm$ 0.01
Diabético + DOAcQ	94.8 $\pm$ 7.8*	119.0 $\pm$ 20.7*	0.73 $\pm$ 0.03*

\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Diabético por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* (n = 6; media  $\pm$  E.E.; *p* < 0.05.). Vehículo: Agua 2:1 DMSO. U de SOD. Una unidad de SOD es definida como la cantidad en  $\mu$ g de enzima que causa una disminución del 50 % de la reducción de NBT.

### 7.2.1.8 Expresión de citocinas

Se realizó una PCR por punto final para ver si la administración de DOAcQ podría disminuir la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  relacionados con diabetes. En la Figura 33 se presenta el gel de agarosa de los productos de PCR de los grupos Diabéticos tratados con Glibenclamida y DOAcQ, así como de los controles necesarios. Se puede observar que la administración de DOAcQ disminuyó la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en comparación de grupo Diabético tratado con Glibenclamida.



**Figura 33.** Gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR. M= Marcador, Ci= Control interno kit, C-= Control negativo, S= Grupo sano, G= Grupo Diabético + Glibenclamida, DO = Grupo Diabético + DOAcQ

La inflamación crónica es uno de los marcadores de la obesidad y la diabetes tipo 2. Marcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la proteína reactiva C están elevadas en sujetos obesos. El tejido adiposo inflamado es capaz de secretar una gran variedad de mediadores pro-inflamatorios incluyendo TNF- $\alpha$  que induce resistencia a la insulina (Yi-cheng y Lee-Ming, 2010). La citocina IL-1 $\beta$  es capaz de reducir la expresión de IRS-1 (Insulin receptor substrate 1) a nivel transcripcional a través de un mecanismo que es dependiente de ERK (Extracellular signal-regulated kinases) y a nivel posttranscripcional independiente de ERK (Tilg y Moschen, 2008). Se debe tener en cuenta que la presencia de estas citocinas pueden verse alteradas dependiendo, tanto de factores ambientales como del tipo de enfermedad que se está presentando. Nosotros decidimos evaluar la expresión de diferentes citocinas, debido a que existen reportes donde la regulación en la expresión de estas moléculas en modelos animales de diabetes es observada. En los trabajos siguientes se describen estos resultados, Yang y colaboradores evaluaron la administración de una mezcla de antioxidantes naturales en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina, la administración de estos suplementos reguló

múltiples blancos relacionados con diabetes incluyendo la disminución de los niveles de glucosa, la expresión de TNF- $\alpha$  y adicionalmente incremento de la actividad de GPx y SOD (Yang *et al.*, 2012). Igualmente a estos resultados Zhou y colaboradores reportaron que la administración de polisacáridos mostró un incremento en la actividad de GPx y SOD, así como una disminución en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6, lo que disminuyó los niveles de glucosa en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina (Zhou *et al.*, 2015). Los resultados que nosotros obtuvimos son semejantes a los citados, la administración de DOAcQ disminuyó los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Tabla 16). Lo que pudo contribuir a la homeostasis de la glucosa, porque como ya se ha mencionado la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  promueven la resistencia a la insulina por inhibir la cascada de señalización del receptor de insulina (Ortiz *et al.*, 2012). Así, que la disminución en la expresión de estas citocinas mejora la señalización y por lo tanto se presenta el mejor control de la glucosa.

**Tabla 16.** Expresión relativa de los genes

	<b>GAPDH</b>	<b>IL-6</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>
<b>Glibenclamida</b>	100	23.59	13.99	2.20	12.64
<b>DOAcQ</b>	100	3.23	0.83	1.74	7.63

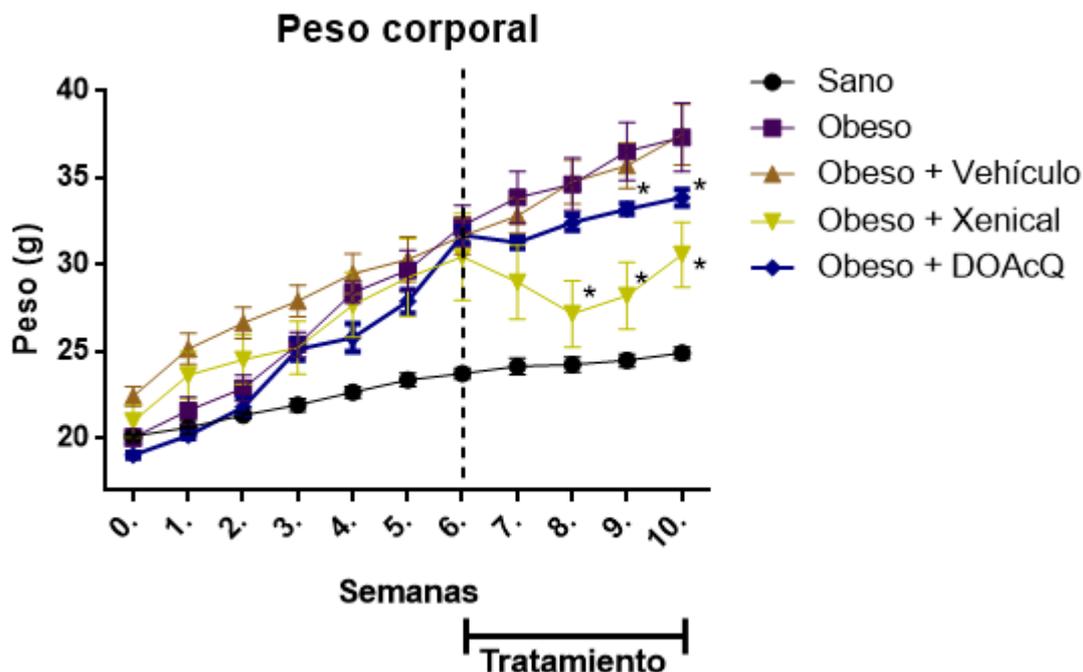
Después de analizar los datos obtenidos y comparar con las referencias nos llamó la atención que DOAcQ pudiera tener un efecto sobre algunos blancos relacionados también con obesidad y dado que diabetes y obesidad forman parte del síndrome metabólico, decidimos evaluar a DOAcQ en un modelo de obesidad en ratón.

## **7.2.2 Modelo de ratón obeso**

### **7.2.2.1 Peso de los grupos experimentales**

En la Figura 34 se muestra el peso corporal semanal de los diferentes grupos experimentales después de 10 semanas en las cuales recibieron una dieta alta

en grasa y dentro de las últimas 4 semanas; los animales además de la dieta recibieron los diferentes tratamientos.



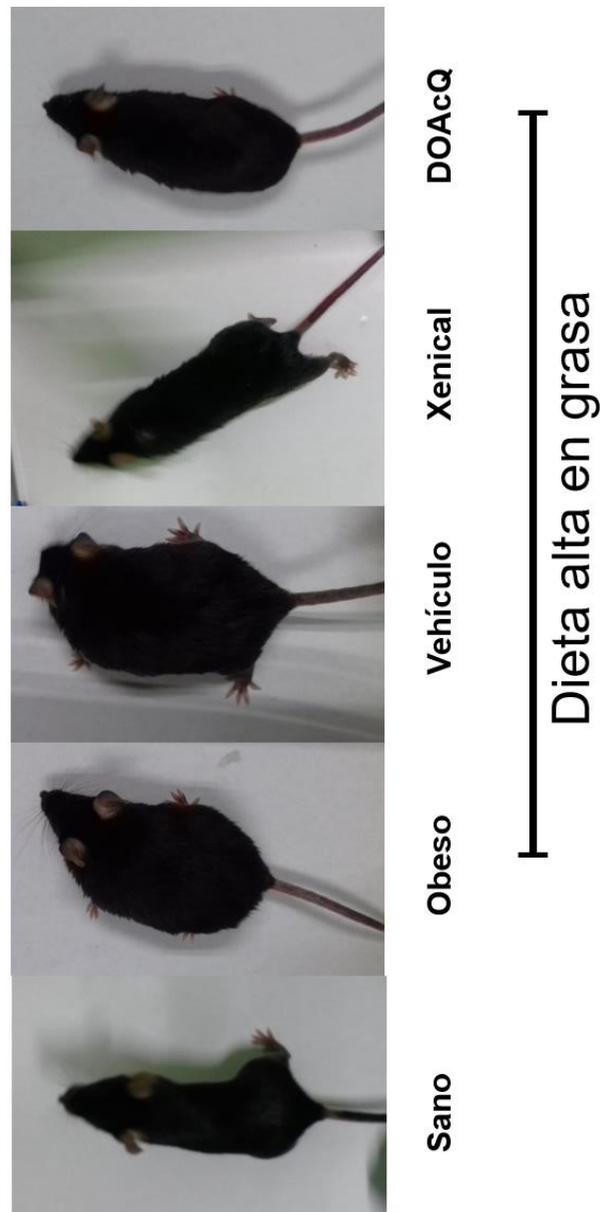
**Figura 34.** Peso corporal semanal de los diferentes grupos experimentales en el modelo de ratón obeso inducido con dieta. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de 2 vías seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett*. (n = 6-8 media ± E.E.; p < 0.05). Vehículo: Agua 2:1 DMSO.

Los animales del grupo Sano después de 10 semanas con una dieta estándar incrementaron ligeramente su peso de  $20.13 \pm 0.14$  a  $24.92 \pm 0.35$  g, sin embargo aquellos animales de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa grupo Obeso incrementó su peso corporal de  $20.06 \pm 0.47$  a  $37.34 \pm 1.97$  g y en el grupo Obeso + Vehículo incrementó su peso corporal de  $22.43 \pm 0.56$  a  $37.50 \pm 1.75$  g, los grupos tratados con Xenical y DOAcQ mostraron una disminución en la ganancia de peso de forma estadísticamente significativa comparado contra el grupo Obeso ( $20.99 \pm 0.96$  a  $30.59 \pm 1.87$  g) y ( $19.04 \pm 0.15$  a  $33.88 \pm 0.48$  g) respectivamente. Lo que demuestra que la administración de DOAcQ puede estar regulando el metabolismo de lípidos.

La búsqueda de nuevos fármacos para el problema de la obesidad es muy importante dado que medicamentos como el Xenical han fallado en combatir el problema de la obesidad y aquellos medicamentos que presentan una mejor

acción que el Xenical, se ha visto que son más utilizado para el abuso recreativo, que al verdadero problema de salud, debido a que estos actúan sobre el sistema nervioso central. Por eso hay diferentes grupos de investigación en el mundo dedicados a encontrar nuevas alternativas. Por ejemplo Park y colaboradores reportaron que una dieta de suplementos de mulberry, ginseng de Korea rojo y banaba, mejoraban la homeostasis de glucosa, así como el peso corporal de ratones diabéticos modificados genéticamente (*db/db*), los niveles triglicéridos de los animales tratados con estos suplemento se disminuía y además la expresión de genes como PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  y LPL, se encontraban regulados (estas proteínas están relacionadas con el metabolismo de lípidos) (Park *et al.*, 2005). Por su parte Kim y colaboradores encontraron que la administración de extractos de *Coix lachrymajobi var. Mayeun* mejoraban el peso de los animales alimentados con una dieta alta en grasa, mediante un efecto que involucraba la participación de TNF- $\alpha$  (citocina pro-inflamatoria) (Kim *et al.*, 2004). Por otro lado, Choi y colaboradores evaluaron el extracto etanólico de *Tabebuia avellanedae*, la administración de este extracto en ratones alimentados con dieta alta en grasa mejoró su peso corporal, y el tamaño de los adipocitos se veía reducido, además de regular genes que participan en el metabolismo de lípidos como FAS, PPAR- $\gamma$ , FABP4, entre otros (Choi *et al.*, 2014). En el caso de compuestos puros para la obesidad existen antecedentes como el reportado por Liu y colaboradores quienes evaluaron el efecto de celastrol en diferentes modelos animales de obesidad, la administración de celastrol disminuyó el peso corporal de los animales y modificó su consumo de alimento en ratones alimentados con dieta alta en grasa, interesantemente no modificó el peso de animales genéticamente modificados como *db/db* y *ob/ob*, por lo que se puede concluir que este compuesto tiene un efecto dependiente de leptina (Liu *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos por estos grupos de investigación hacen referencias a diferentes genes relacionados con obesidad, debido a que el compuesto DOAcQ también previno el incremento en el peso corporal del grupo respectivamente tratado, nosotros decidimos evaluar su efecto en genes como IL-6, TNF- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ .

En la Figura 35 se observan fotos representativas de los diferentes grupos experimentales de ratones obesos inducidos con dieta hipercalórica. Se puede apreciar como los grupos tratados con Xenical y DOAcQ, muestran una apariencia de menor tamaño que aquellos grupos sin tratamiento.

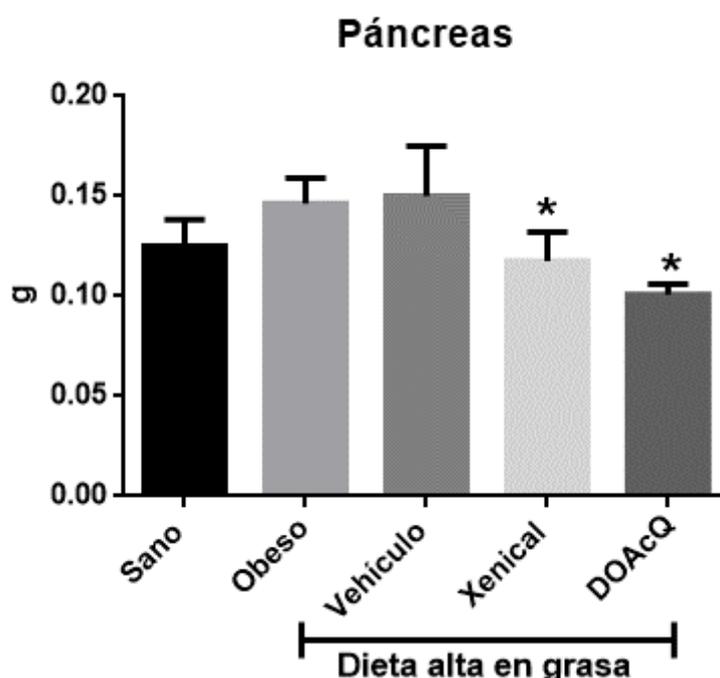


**Figura 35.** Fotos representativas de los diferentes grupos experimentales del modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica.

### 7.2.2.2 Peso de los órganos de los diferentes grupos experimentales

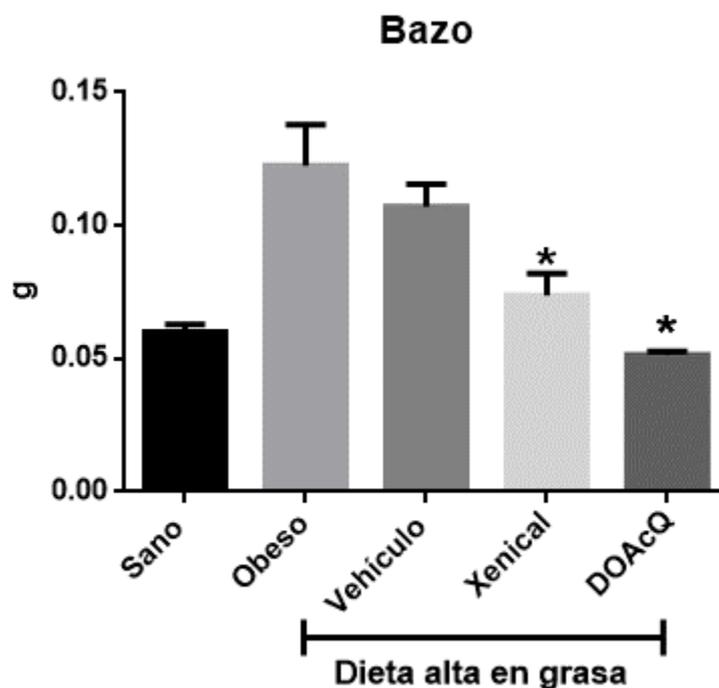
El peso de los órganos de los diferentes grupos experimentales también fue analizado.

En la Figura 36 se muestra el peso del páncreas de los diferentes grupos experimentales. El grupo Sano mostró un peso de  $0.13 \pm 0.01$  g, los grupos Obeso y Vehículo sin tratamiento incrementaron su peso a  $0.15 \pm 0.01$  y  $0.15 \pm 0.02$  g respectivamente, en los grupos con los tratamientos de Xenical y DOAcQ mostraron una disminución del peso de manera estadísticamente significativa  $0.12 \pm 0.02$  y  $0.10 \pm 0.01$  g respectivamente.



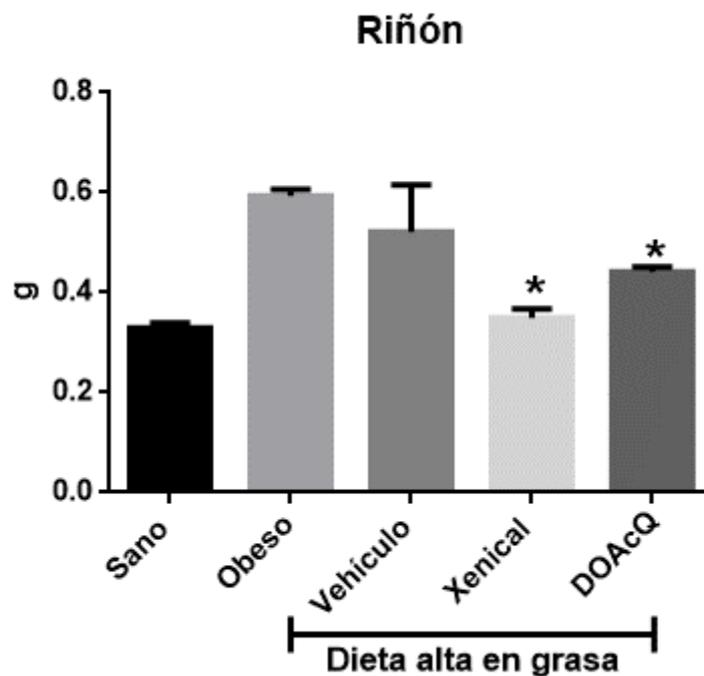
**Figura 36.** Peso del páncreas de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 37 se muestra el peso del bazo de los diferentes grupos experimentales. El grupo Sano mostró un peso de  $0.06 \pm 0.01$  g, en los grupos Obeso y Vehículo se incrementó el peso de este órgano hasta  $0.10 \pm 0.02$  y  $0.11 \pm 0.01$  g respectivamente, en los grupos que fueron tratados con Xenical y DOAcQ hubo una disminución en el peso con diferencia estadísticamente significativa  $0.07 \pm 0.01$  y  $0.05 \pm 0.01$  g respectivamente.



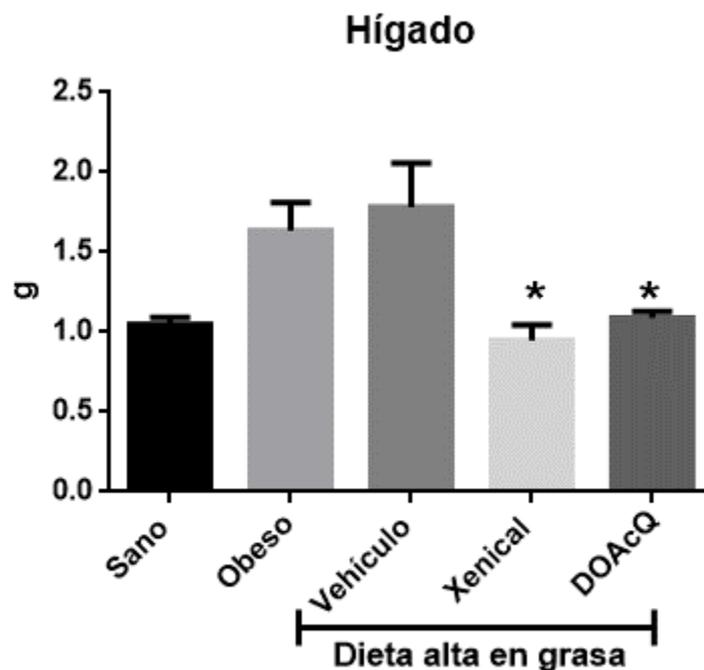
**Figura 37.** Peso del bazo de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 38 se muestra el peso del riñón de los diferentes grupos experimentales. El peso de este órgano en el grupo Sano es de  $0.33 \pm 0.01$  g, en los grupos Obeso y Vehículo se incrementó el peso de en  $0.59 \pm 0.01$  y  $0.52 \pm 0.09$  g respectivamente, en los grupos tratados con Xenical y DOAcQ mostraron una disminución en el peso del riñón de manera estadísticamente significativa  $0.35 \pm 0.02$  y  $0.44 \pm 0.01$  g respectivamente.



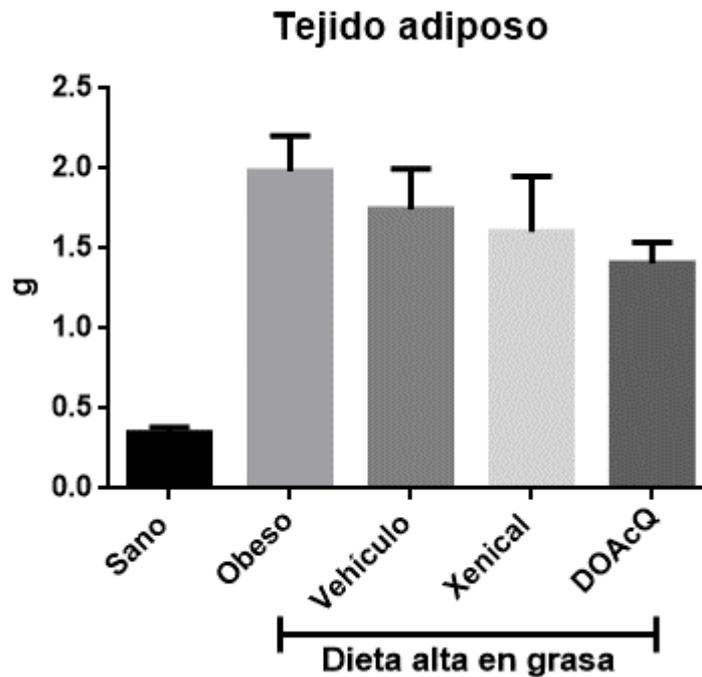
**Figura 38.** Peso del riñón de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 39 se muestra el peso del hígado de los diferentes grupos experimentales. El grupo Sano mostró un peso de  $1.05 \pm 0.04$  g, los grupos Obeso y Vehículo sin tratamiento mostraron un incremento en el peso del hígado  $1.63 \pm 0.18$  y  $1.78 \pm 0.28$  g respectivamente, los grupos que fueron tratados con Xenical y DOAcQ mostraron una disminución del peso del hígado de una manera estadísticamente significativa  $0.95 \pm 0.09$  y  $1.09 \pm 0.04$  g respectivamente.



**Figura 39.** Peso del hígado de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

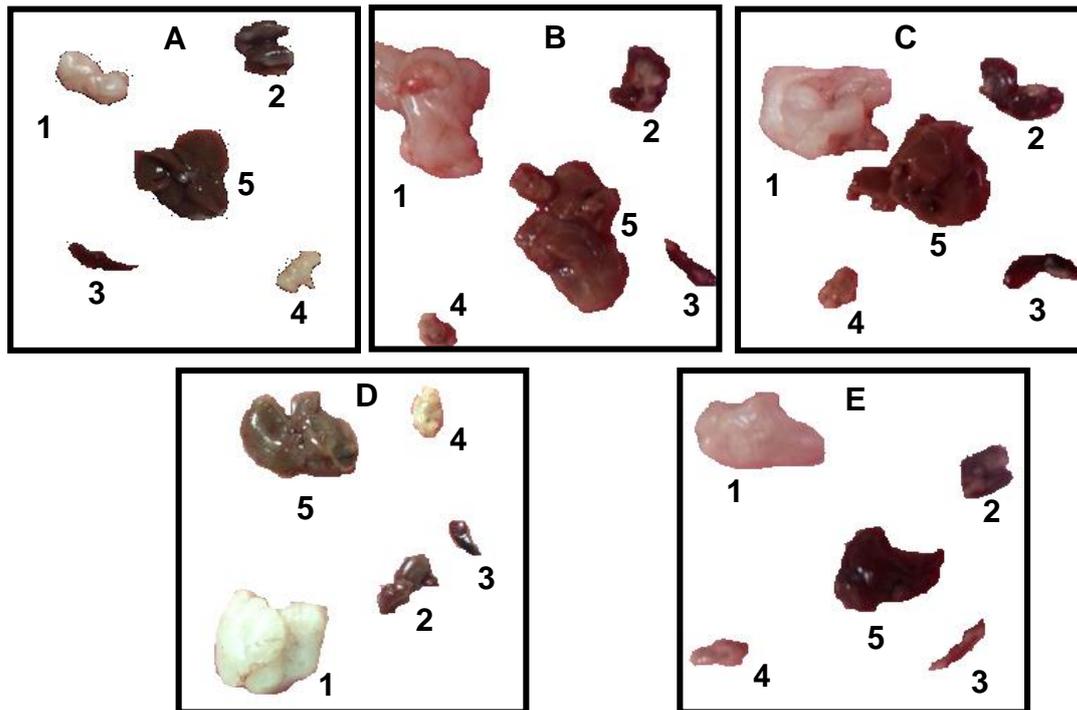
En la Figura 40 se muestra el peso del tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales. El grupo Sano mostró un peso de  $0.35 \pm 0.03$  g, los grupos Obeso y Vehículo incrementaron el peso de este tejido  $1.98 \pm 0.22$  y  $1.75 \pm 0.25$  g respectivamente, en los grupos tratados con Xenical y DOAcQ hubo una tendencia a disminuir el peso, pero no de manera estadísticamente significativa  $1.61 \pm 0.35$  y  $1.41 \pm 0.13$  g respectivamente.



**Figura 40.** Peso del tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales.

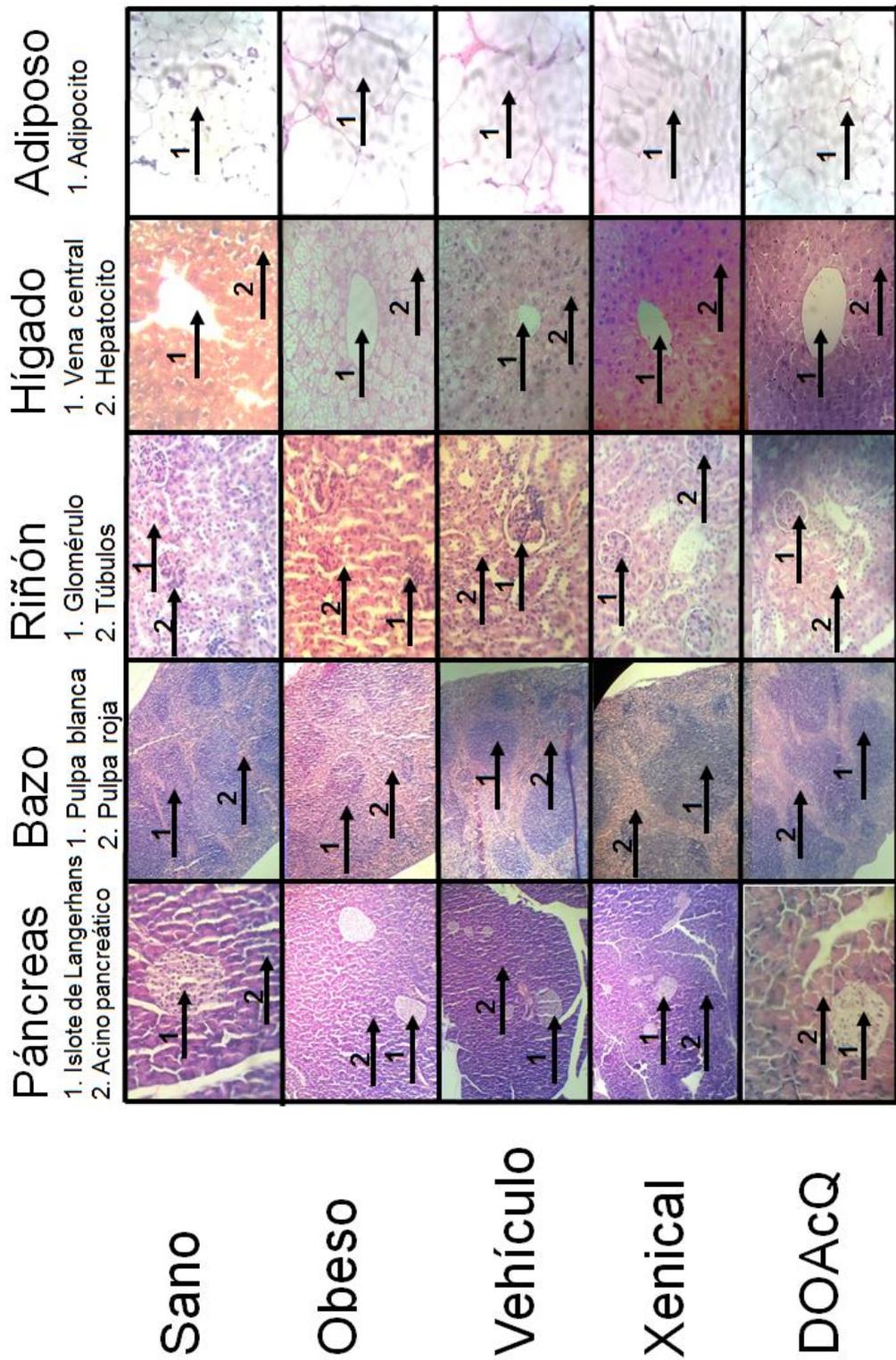
\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 41 se puede apreciar el menor tamaño de estos tejidos. La generación de esteatosis (hígado graso) en los hígados de los grupos Obesos sin tratamiento podría explicar el peso incrementado de este órgano debido a la acumulación de grasa. La proliferación de células- $\beta$  aumenta en respuesta a altas demandas fisiológicas de insulina, como en el embarazo y la obesidad lo que explicaría el mayor tamaño del páncreas en los grupos Obeso y Vehículo sin tratamiento (Andersson *et al.*, 2012).



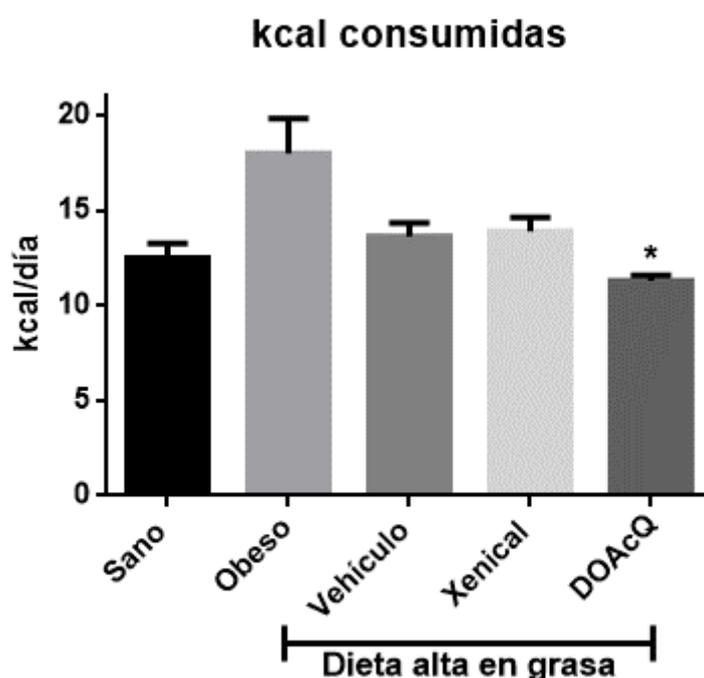
**Figura 41.** Fotografías de los órganos de los diferentes grupos experimentales del modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica. A) Sano, B) Obeso, C) Vehículo, D) Xenical, E) DOAcQ. 1. Tejido adiposo, 2. Riñones, 3. Bazo, 4. Páncreas, 5. Hígado.

En la Figura 42 se puede observar el análisis histológico de los diferentes grupos experimentales, es importante notar que los hígados de los grupos Obeso sin tratamiento muestran evidencia de acumulación de grasa debido al mayor tamaño de los hepatocitos y una apariencia más semejante a adipocitos. El grupo tratado con DOAcQ mostró una apariencia y arquitectura similar al grupo Sano, indicando que está acumulación de grasa está disminuída. En el tejido adiposo sucedió algo similar, los grupos Obesos sin tratamiento mostraban una acumulación de grasa evidente debido al gran tamaño de los adipocitos (estas células se encargan de acumular grasas), los adipocitos en el grupo Obeso + DOAcQ presentaron un tamaño reducido.



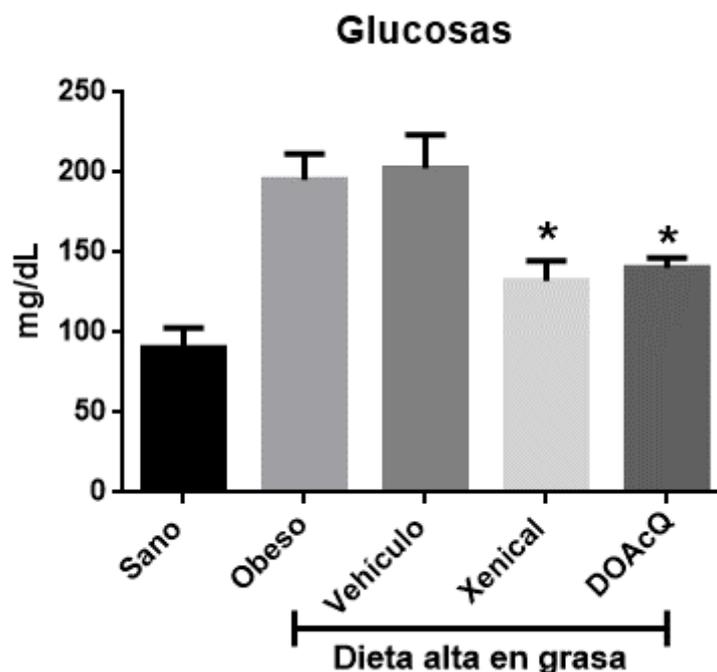
**Figura 42.** Cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales en el modelo de ratón obeso inducido con dieta hipercalórica.

Las kilocalorías consumidas por los diferentes grupos experimentales se muestran en la Figura 43, éstos presentan una correlación con los resultados mostrados del peso y la histología, el grupo Sano mostró un consumo de  $12.51 \pm 0.74$  g al día, el grupo Obeso incrementó el consumo a  $18.00 \pm 1.84$  g, aquellos grupos tratados con Xenical y DOAcQ mostraban un consumo menor de Kilocalorías de manera estadísticamente significativa en el caso del último  $13.89 \pm 0.73$  y  $11.30 \pm 0.27$  g respectivamente.



**Figura 43.** Kilocalorías consumidas de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

Por otro lado, en la Figura 44 se observa que la glucosa periférica de los grupos Xenical ( $132.2 \pm 12.77$  mg/dL) y DOAcQ ( $140 \pm 6.47$  mg/dL) se encuentra disminuida en comparación al grupo Obeso ( $195.3 \pm 16.37$  mg/dL) y Vehículo ( $202.5 \pm 20.88$  mg/dL), por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos en las ratas diabéticas, se puede confirmar que el compuesto DOAcQ posee una actividad hipoglucemiante, disminuyendo los niveles de glucosa a valores cercanos al grupo Sano ( $90.29 \pm 12.62$  mg/dL).



**Figura 44.** Niveles de glucosa de los diferentes grupos experimentales. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 6-8$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

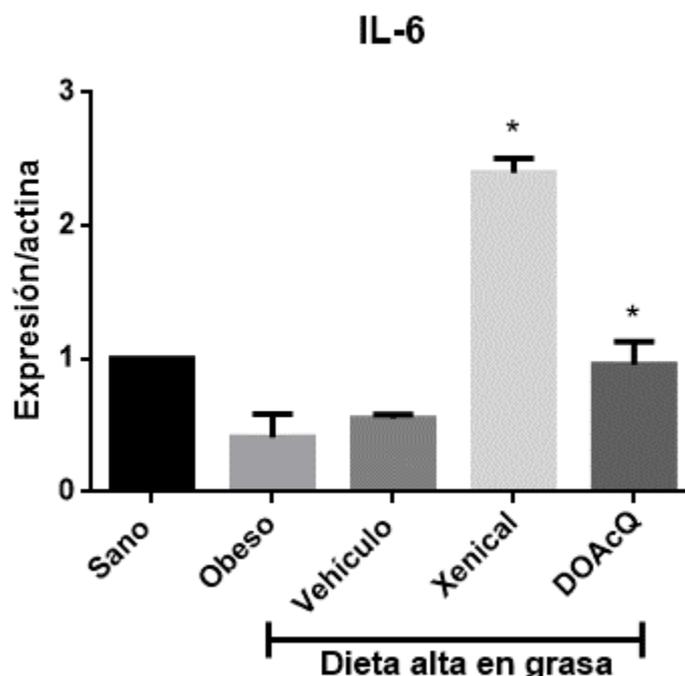
Fue muy interesante observar que DOAcQ disminuyó el consumo de alimento incluso menos que los animales alimentados con dieta estándar. Xenical, nuestro medicamento de referencia en este estudio, tiene un efecto local y casi exclusivamente en el tracto gastrointestinal por inhibición de la lipasa pancreática, encargada de degradar a los triglicéridos y puedan ser absorbidos en forma de ácidos grasos libres (Heck *et al.*, 2000). Es por esto que pudo tener un efecto sobre el peso de los animales y los órganos, pero no afectó el consumo de alimento. Esto indica que al existir una disminución en el consumo de alimentos probablemente DOAcQ tiene un mecanismo de acción distinto al descrito por Xenical.

Por lo tanto, se decidió estudiar si la administración de DOAcQ puede regular la expresión de genes relacionados con Obesidad en tejido adiposo e hígado.

### 7.2.2.3 Expresión de ARNm de los diferentes grupos experimentales

Se realizó el análisis de ARNm de los diferentes grupos experimentales mediante PCR en punto final y un análisis densitométrico normalizando todos los valores con el gen constitutivo actina. Los genes evaluados por las revisiones en la literatura antes citadas fueron IL-6, TNF- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ .

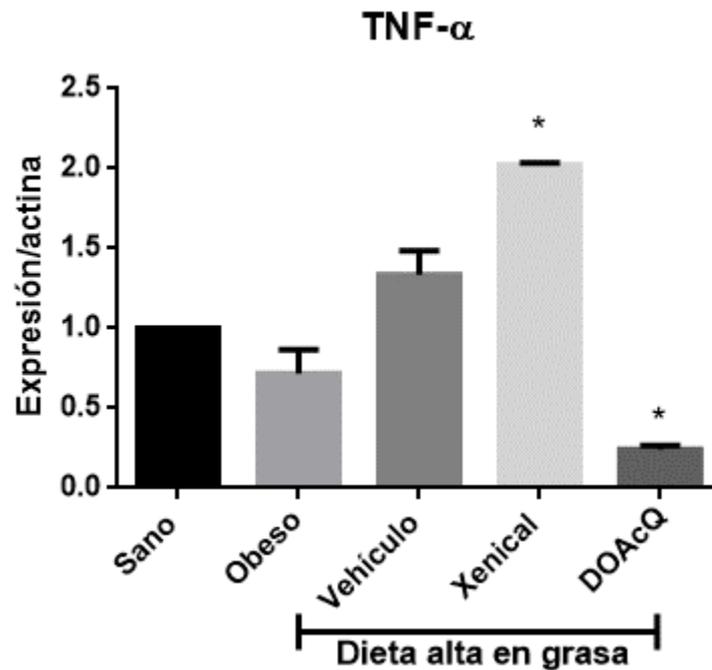
En la Figura 45 se muestra la expresión de ARNm de IL-6 en tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales, en los grupos Obeso y Vehículo hubo una disminución de los niveles de IL-6 a  $0.41 \pm 0.18$  y  $0.55 \pm 0.03$  respectivamente. Los grupos tratados con Xenical y DOAcQ incrementaron los niveles de expresión de manera estadísticamente significativa a  $2.39 \pm 0.11$  y  $0.96 \pm 0.18$  respectivamente.



**Figura 45.** Expresión de ARNm de IL-6 en tejido adiposo. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

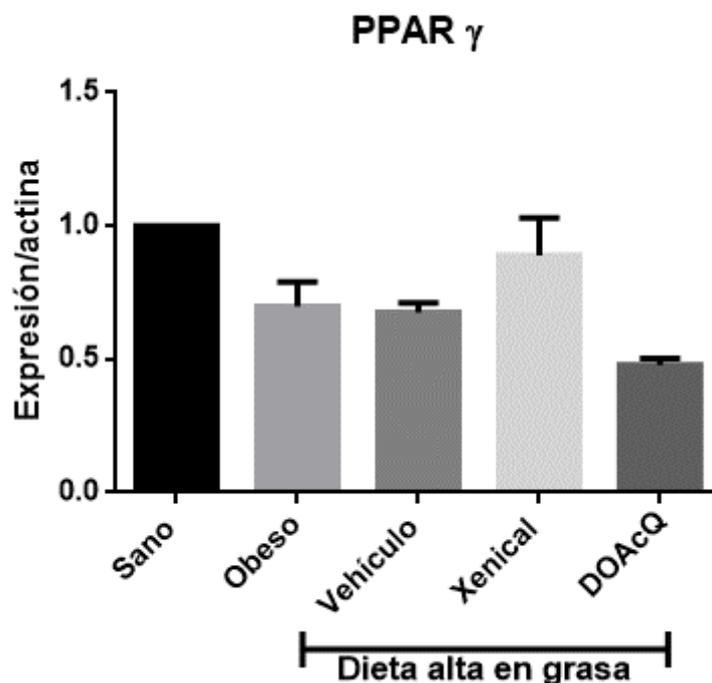
En la Figura 46 se muestra la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales, en los grupos Obeso y Vehículo mostraron niveles de TNF- $\alpha$  de  $0.72 \pm 0.15$  y  $1.33 \pm 0.15$  respectivamente. En el

grupo tratado con Xenical mostró un incremento en los niveles de este mensajero  $2.02 \pm 0.01$  y por último en el grupo tratado con DOAcQ mostró una disminución en los niveles de expresión de manera estadísticamente significativa a  $0.24 \pm 0.03$ .



**Figura 46.** Expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

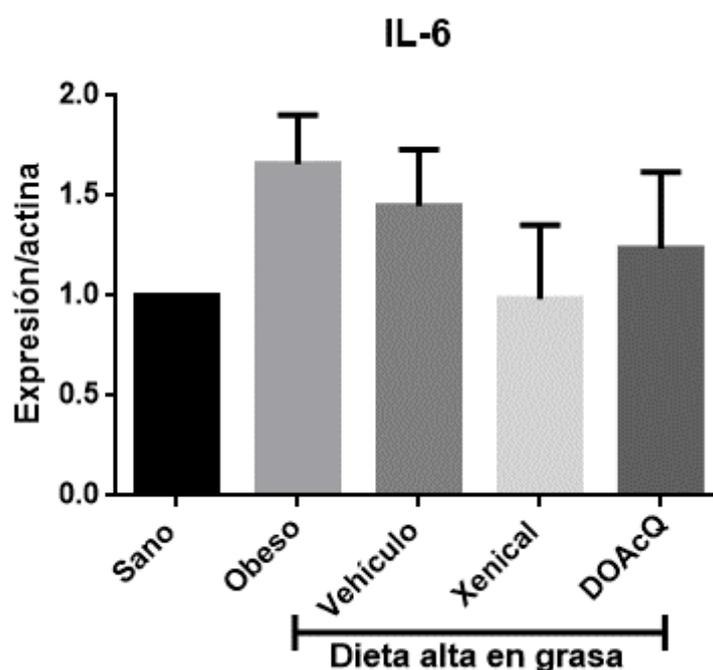
En la Figura 47 se muestra la expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo de los diferentes grupos experimentales, los niveles de este mensajero fueron similares en todos los grupos experimentales y no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.



**Figura 47.** Expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo. \*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

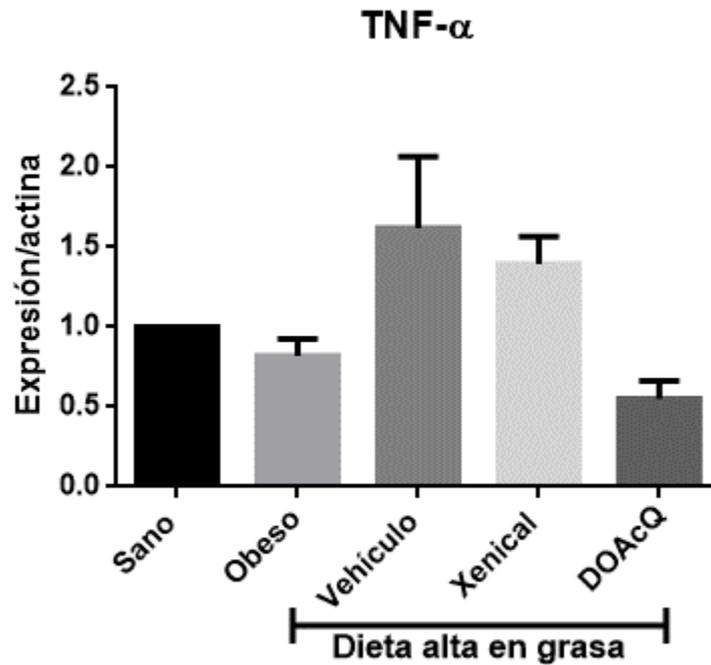
Así también se realizó la expresión de los mismos genes en hígado.

En la Figura 48 se muestra la expresión de ARNm de IL-6 en hígado de los diferentes grupos experimentales, los niveles de este mensajero fueron similares en todos los grupos experimentales y no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.



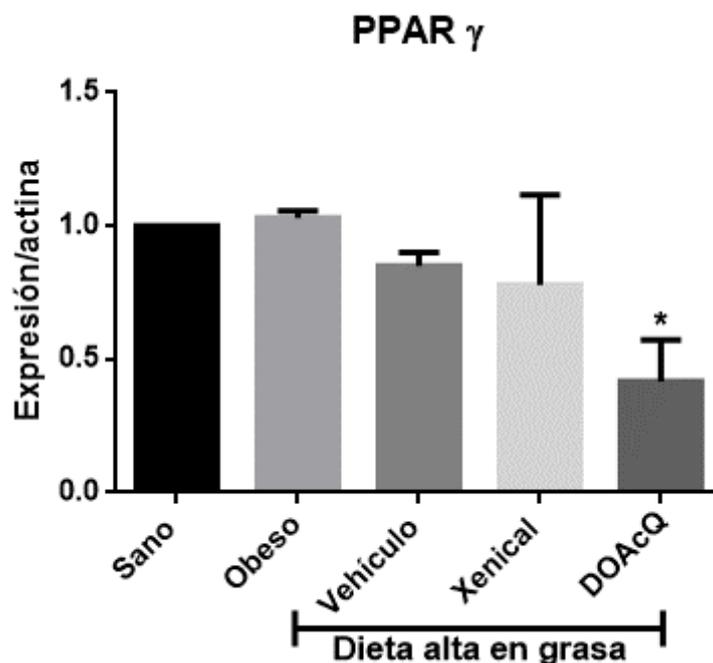
**Figura 48.** Expresión de ARNm de IL-6 en el hígado. \*Diferencia estadísticamente significativa comparado contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 49 se muestra la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en el hígado de los diferentes grupos experimentales, los niveles de este mensajero fueron similares en todos los grupos experimentales y no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Es importante mencionar que el grupo tratado con DOAcQ mostró una tendencia a disminuir los niveles de este mensajero en comparación con el grupo Obeso.



**Figura 49.** Expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en el hígado. \*Diferencia estadísticamente significativa comparado contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

En la Figura 50 se muestra la expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$  en el hígado de los diferentes grupos experimentales, en los grupos Obeso y Vehículo mostraron niveles de PPAR- $\gamma$  de  $1.03 \pm 0.03$  y  $0.85 \pm 0.05$  respectivamente. El grupo tratado con Xenical mostró una disminución en los niveles de este mensajero pero no de forma estadísticamente significativa  $0.78 \pm 0.34$  y por último el grupo tratado con DOAcQ mostró una disminución en los niveles de expresión de PPAR- $\gamma$  de manera estadísticamente significativa  $0.42 \pm 0.16$ .



**Figura 50.** Expresión de ARNm de PPAR- $\gamma$  en el hígado. \*Diferencia estadísticamente significativa comparado contra el grupo Obeso por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 3$ ; media  $\pm$  E.E.;  $p < 0.05$ ).

Los resultados de los genes en tejido adiposo muestran que DOAcQ es capaz de mantener los niveles de expresión del mensajero de IL-6 cercanos al grupo Sano y de disminuir los niveles de expresión del mensajero de TNF- $\alpha$  de manera estadísticamente significativa en comparación al grupo Obeso. En hígado DOAcQ disminuyó también los niveles de TNF- $\alpha$ , pero no de manera estadísticamente significativa, por otro lado, en hígado si hubo una disminución en la expresión de PPAR- $\gamma$ . Como ya se ha mencionado anteriormente existen varios factores que participan en la diabetes y obesidad entre ellos son las citocinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por lo que decidió estudiarlas, TNF- $\alpha$  es una citocina que se encarga de promover disfunción celular por lo que la disminución de esta proteína en la mayoría de las patogénesis estudiadas siempre es benéfico, en nuestro experimento observamos que la administración de DOAcQ disminuyó la expresión de este gen tanto en tejido adiposo como en el hígado. En las imágenes de histología se puede observar (Figura 42), el menor tamaño de los adipocitos y la arquitectura normal del hígado que se observa de en el grupo tratado con DOAcQ en comparación con el grupo Obeso. Respecto

a esto quizás se vean activadas diferentes cascadas de señalización que funcionan como una retroalimentación negativa para continuar con los procesos inflamatorios y por lo tanto se incrementa la expresión de TNF- $\alpha$ , en el caso de IL-6 esta citocina todavía existe discusión en cuanto a su participación en diferentes padecimientos, puesto que puede estar regulada de diferentes maneras, tanto puede estimular o detener la inflamación. Durante la obesidad IL-6 se encuentra incrementada, sin embargo de manera contraria a lo esperado IL-6 también se encuentra incrementada durante el ejercicio y citocinas reconocidas como pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) se encuentran disminuidas en esta misma condición (Faldt *et al.*, 2004). Es un hecho que en pacientes obesos, que también son diabéticos la expresión de la citocina IL-6 se encuentra aumentada (Eder *et al.*, 2009), pero se debe tener en cuenta que estas personas ya pasaron por procesos inflamatorios durante años que pudieron alterar las señalizaciones de muchas proteínas. Para apoyar esta idea tenemos reportes donde ratones deficientes de IL-6 desarrollan obesidad adulta, así también presentaban un incremento en los niveles de leptina y glucosa, lo que podría sugerir problemas de señalización normal como resistencia a la leptina debido a la falta de IL-6, congruente con esto, la administración de IL-6 endógena redujo de manera estadísticamente significativa el peso de estos animales deficientes de IL-6 (Wallenius *et al.*, 2002). Respaldando la necesidad de IL-6 para un metabolismo normal Wernstedt y colaboradores encontraron que ratones deficientes de IL-6 disminuían su consumo de oxígeno en respuesta a estrés y exposición a frío. Además estos ratones deficientes de IL-6 disminuían su metabolismo de lípidos a temperatura ambiente (Wernstedt *et al.*, 2006). Por lo tanto, la diferencia en la producción de IL-6 podría alterar el metabolismo energético lo que se puede traducir en generación de obesidad y diabetes. Tomando estos resultados y los obtenidos en esta investigación podemos decir que debido a que los niveles de IL-6 encontrado en el grupo tratado con DOAcQ son semejantes al grupo Sano esta proteína podría promover una señalización promoviendo el balance que existe entre gasto energético, apetito y acumulación de lípidos, promoviendo por lo tanto, la disminución de TNF- $\alpha$ , que como ya se ha mencionado su aumento promueve resistencia a insulina y la disminución en los niveles de glucosa mostrados en el grupo tratado con DOAcQ puede ser

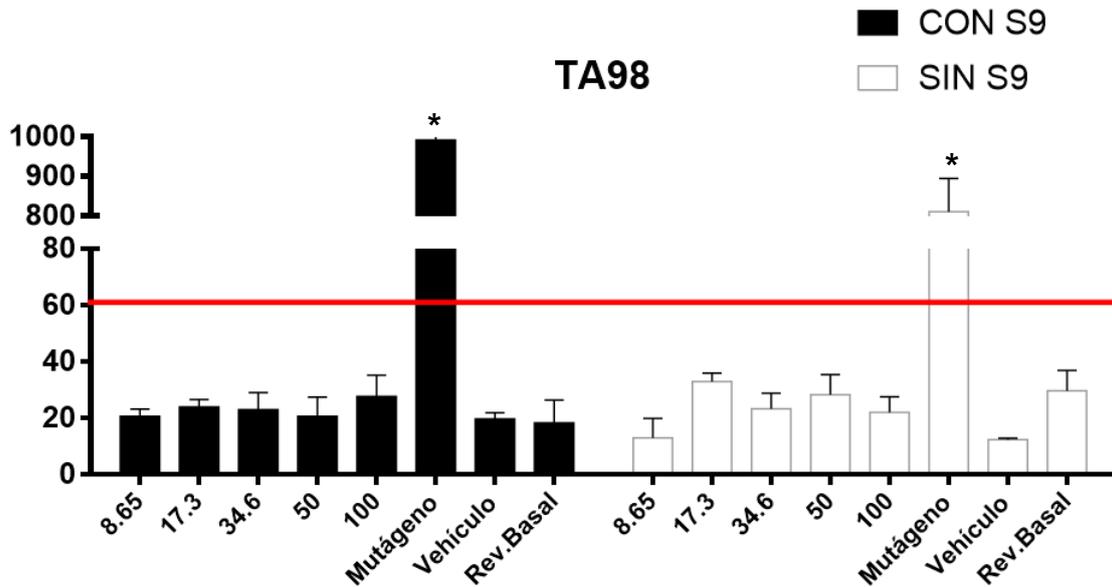
debido este mejoramiento en la resistencia a insulina. Por último, PPAR- $\gamma$  es un factor de transcripción dependiente de ligando que se encuentra principalmente expresado en tejido adiposo, pero también está en otros tejidos como en el hígado, donde se encarga de almacenar lípidos (Grygiel-Górniak, 2014), la administración de DOAcQ disminuyó la expresión de este gen tanto en tejido adiposo como en el hígado, donde lo hizo de manera estadísticamente significativa, esto podría ser debido a que no es necesaria la activación de este factor de transcripción y no promueva el almacenamiento de lípidos por el hecho de no haber lípidos disponible, ya sea por su eliminación o su disminuída absorción. Apoyando esta idea se puede observar la Figura 42, donde los hepatocitos del grupo Obeso tienen una apariencia semejante a los adipocitos y el grupo tratado con DOAcQ los cuales presentan una morfología parecida al grupo Sano. Esto es debido a que probablemente no es necesario que el hígado tenga que almacenar el exceso de grasas que se encuentra libre en el organismo. Por lo tanto, la administración de DOAcQ quizá promueve un control sobre estos ácidos grasos libres y subsecuentemente el peso de estos animales.

### **7.2.3 Estudio toxicológico**

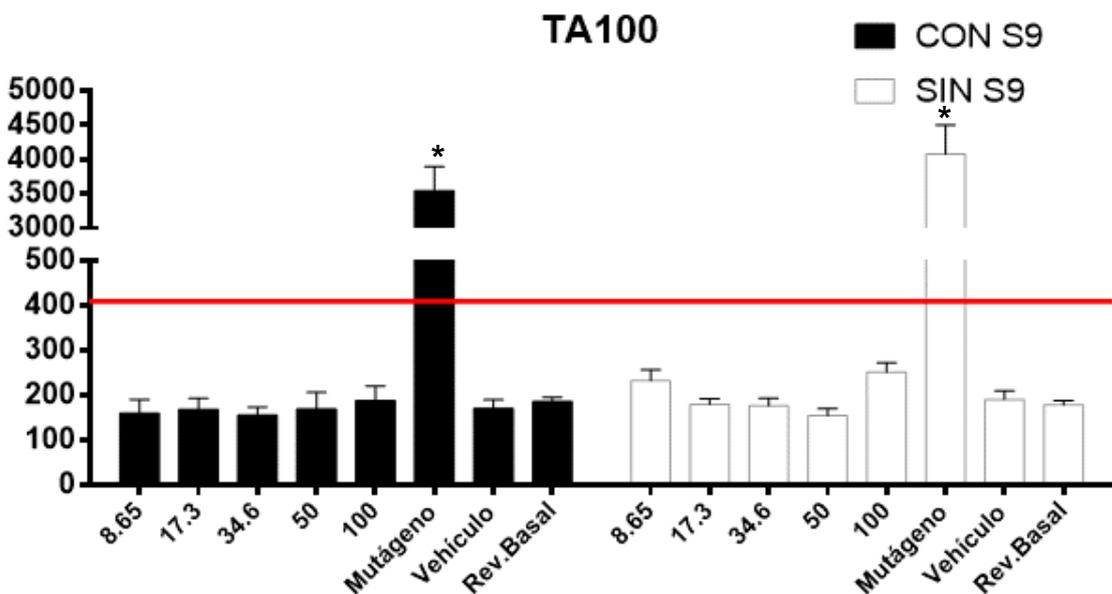
#### **7.2.3.1 Prueba de AMES**

La búsqueda de nuevos fármacos siempre tiene como objetivo mejorar la eficacia de los actuales, así como disminuir los efectos adversos, por lo tanto es importante estudiar la toxicidad de estos posibles nuevos medicamentos. En las Figuras 51, 52 y 53 se puede observar que DOAcQ no mostró mutagenicidad en las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 o TA102, en la ausencia y presencia de la fracción S9 con las concentraciones utilizadas.

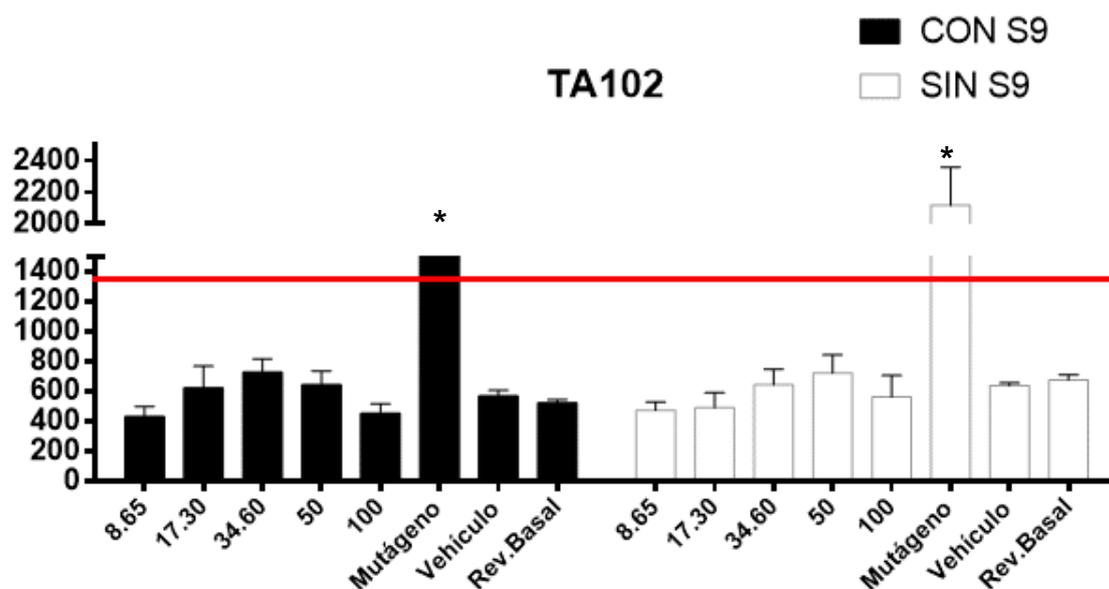
Ninguna de las cepas tratadas con el compuesto DOAcQ mostró el doble de revertantes basales. Solo los controles positivos tanto en la ausencia y presencia de la fracción S9 existió un incremento de manera estadísticamente significativa. Por lo tanto, podemos decir con esta Prueba de Ames, que el compuesto DOAcQ no es genotóxico *in vitro* a las concentraciones evaluadas.



**Figura 51.** Cuantificación de revertantes en la cepa TA 98, con y sin la fracción S9. La línea representa el doble de las revertantes basales. \*Diferencia estadísticamente significativa por ANOVA de 2 vías seguido de una prueba múltiple de *Dunnnett* (n= 9; media ± D.E.;  $p < 0.05$ ).



**Figura 52.** Cuantificación de revertantes en la cepa TA 100, con y sin la fracción S9. La línea representa el doble de las revertantes basales. \*Diferencia estadísticamente significativa por ANOVA de 2 vías seguido de una prueba múltiple de *Dunnnett* (n= 9; media ± D.E.;  $p < 0.05$ ).



**Figura 53.** Cuantificación de revertantes en la cepa TA 100, con y sin la fracción S9. La línea representa el doble de las revertantes basales. \*Diferencia estadísticamente significativa por ANOVA de 2 vías seguido de una prueba múltiple de *Dunnnett* (n= 9; media ± D.E.;  $p < 0.05$ ).

SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN μM/PLACA	TA98		TA100		TA102	
		con S9	sin S9	Con S9	sin S9	con S9	sin S9
DOAcQ	8.65	1.1	0.7	0.9	1.3	0.8	0.7
DOAcQ	17.30	1.2	1.0	0.9	1.0	1.2	0.7
DOAcQ	34.60	1.2	0.8	0.8	1.0	1.4	1.0
DOAcQ	50.00	1.1	1.1	0.9	0.9	1.2	1.1
DOAcQ	100.00	1.4	0.4	1.0	1.4	0.9	0.8
DMSO 0.1 %	141.00	1.1	0.4	0.9	1.0	1.1	1.0
ÁCIDO PICROLONICO	0.19	-	27.3	-	-	-	-
N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA	0.007	-	-	-	22.9	-	-
MITOMICINA C	0.003	-	-	-	-	-	3.1
2-AMINOANTRACENO	0.005	54.1	-	19.1	-	3.5	-

Existen compuestos de origen natural que poseen un potencial mutagénico importante, como flavonoides y alquilbencenos (Rietjens *et al.*, 2005). En razón de tratar de evitar un potencial riesgo de salud, se evaluó el potencial mutagénico de DOAcQ con la Prueba de Ames, sólo los controles positivos incrementaron el número de revertantes en todas las condiciones. La Tabla 17 muestra el índice mutagénico de las concentraciones utilizadas de DOAcQ, los cuales fueron

determinados de la siguiente manera: El promedio de revertantes por placa dividido por el promedio de las revertantes basales. Desde 1983, Ohta encontró que algunas cumarinas y la 7-hidroxicumarina tienen un efecto antimutagénico (Ohta, 1983). Además, en 2004, Marques y Lin encontraron que la 4-hidroxicumarina puede ser un agente antimutagénico. Estos compuestos pueden formar puentes de hidrogeno con sus grupos funcionales el carbonilo y el hidroxilo de la posición 4 con agentes mutagénicos, esto produciría complejos estables por lo tanto, ejercería una actividad antimutagénica (Marques y Lin, 2004). Aunque es necesario realizar otros estudios podríamos creer que debido a la semejanza de la estructura probablemente DOAcQ podría tener un mecanismo similar al demostrado por 4-hidroxicumarina.

### **7.2.3.2 Ensayo de Micronúcleos**

Este ensayo puede detectar agentes genotóxico, que pueden causar daño a los cromosomas o al huso mitótico (Schmid, 1975). Se evaluó el potencial de DOAcQ para incrementar los micronúcleos, 48 h después de que los tratamientos fueron administrados. La Tabla 18 muestra el porcentaje de micronúcleos de los diferentes grupos experimentales. En ellos podemos observar que el control positivo (Ciclofosfamida) incrementó los micronúcleos de manera estadísticamente significativa comparado contra el vehículo, por otro lado la administración de DOAcQ no afecto el porcentaje de micronúcleos. Anteriormente cuando no existían fármacos en el mercado para una enfermedad en específico, algunos estudios de toxicidad eran omitidos por la urgencia de ser necesarios, hoy en día para que un fármaco sea un medicamento se necesitan hacer todas las pruebas toxicológicas, de lo contrario pueden pasar casos como el reportado por Harishankar y colaboradores quienes encontraron que la Metformina y la Glimepirida incrementaron la frecuencia de células micronucleadas en pacientes diabéticos comparadas con el grupo Sano (Harishankar *et al.*, 2015) lo que demuestra la presencia de genotoxicidad en los medicamentos utilizados para tratar diabetes, en contraste a esto, nuestros resultados muestran que DOAcQ no es un agente clastógeno o aneugénico.

**Tabla 18.** Efecto del compuesto DOAcQ en la Formación de Micronúcleos

Tratamiento	Concentración evaluada	%RET	%MN-RET	%MN-NCE
Compuesto DOAcQ	350 mg/kg	4.2 ± 0.42*	0.52 ± 0.21	0.18 ± 0.04
Control de vehículo (DMSO)	100 µL/ratón	5.78 ± 0.31	0.36 ± 0.12	0.16 ± 0.01
Control positivo (Ciclofosfamida)	50 mg/kg	0.81 ± 0.16 *	8.44 ± 0.22 *	2.69 ± 0.23 *

\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el control negativo por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* (media ± E.E.;  $p < 0.05$ ). (Incremento en la frecuencia de MN-RET y MN-CNE; decremento de la frecuencia de RET).

### 7.2.3.3 Prueba de toxicidad aguda: TG 423

La prueba 423 de la OECD está diseñada para evaluar toxicidad aguda, nosotros evaluamos el compuesto DOAcQ a dosis de 2,000 mg/kg. A esta dosis, se observó que no hubo signos de toxicidad o muerte de los animales después de 14 días de observación. Los animales tratados con DOAcQ incrementaron su peso corporal de la misma manera que el grupo control (Tabla 19). De acuerdo a lo anterior DOAcQ se encuentra en la categoría 5. La toxicidad de la cumarina básica ya ha sido determinada anteriormente donde se ha reportado que esta molécula tiene una  $DL_{50}$  mayor a 700 mg/kg (Egan *et al.*, 1990), este resultado y el obtenido por nosotros sugiere que la toxicidad de esta familia de compuestos es relativamente baja. El perfil bioquímico mostrado en las ratas diabéticas mostró valores similares a aquellos del grupo Sano, indicando una toxicidad nula a la dosis administrada.

**Tabla 19.** Peso de los diferentes grupos experimentales en la prueba TG 423

	Día 1		Día 14		Peso ganado al día 14	
	Control	DOAcQ	Control	DOAcQ	Control	DOAcQ
Peso	22.3 ± 1.8	21.0 ± 1.0	35.7 ± 1.5	34.0 ± 0.0	13.3 ± 0.3	13.0 ± 1.0

\*Diferencia estadísticamente significativa comparada contra el control negativo por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de *Dunnett* ( $n = 3$ ; media ± E.E.;  $p < 0.05$ ).

## 8. CONCLUSIONES

Se diseñó una nueva ruta de síntesis para la obtención de 3',4'-Di-O-acetil-*cis*-quelactona (DOAcQ).

Se obtuvo a DOAcQ con un rendimiento global del 21 % y con un exceso enantiomérico del 70 %.

El compuesto DOAcQ mostró tener un efecto hipoglucemiante en un modelo de rata diabética inducida con estreptozotocina después de 15 días de administración diaria a una dosis de 15 mg/kg, porque disminuyó los niveles de glucosa en sangre periférica de  $327.50 \pm 23.9$  a  $128.30 \pm 6.4$  mg/dL.

La administración de DOAcQ previno la pérdida de peso que se observa en el grupo Diabético sin tratamiento, la pérdida de peso es un signo característico en los pacientes con diabetes mellitus.

El análisis histológico mostró una arquitectura similar en hígado, riñón y bazo, entre los grupos Sano y Diabético + DOAcQ. Lo que indicaría que la administración de DOAcQ no genera un daño a nivel microscópico de los órganos mencionados.

En el ensayo de inmunofluorescencia se observa como la morfología de los islotes de Langerhans del grupo tratado con DOAcQ son parecidos a los del grupo Sano. Los islotes de Langerhans son el sitio donde se sintetiza la insulina, por lo tanto es muy importante la preservación de este tejido.

El compuesto DOAcQ mostró disminuir el estrés oxidativo por incrementar la actividad antioxidante de las enzimas CAT, GPx y SOD, las cuales se encargan de controlar a las especies reactivas de oxígeno.

La administración de DOAcQ reguló la expresión de genes como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . En diabetes se ha observado que la expresión de estas

proteínas se encuentra aumentada y niveles altos de las mismas promueven resistencia a la insulina.

La administración de DOAcQ en un modelo de ratón obeso inducido con dieta alta en grasa, mostró disminuir el peso corporal de los roedores de  $37.34 \pm 1.97$  a  $33.88 \pm 0.48$  g después de 4 semanas de administración diaria a una dosis de 15 mg/kg.

El peso de los órganos bazo, hígado, páncreas y riñón de los grupos tratados con DOAcQ fue menor que el peso de los órganos del grupo Obeso que no recibieron tratamiento.

La administración de DOAcQ disminuyó el consumo de alimento en comparación con el grupo Obeso sin tratamiento.

DOAcQ mostró tener efectos hipoglucemiantes en el modelo de ratón obeso inducido con dieta alta en grasa disminuyendo los niveles de glucosa periférica en comparación con el grupo Obeso sin tratamiento.

La administración de DOAcQ disminuyó la expresión de genes relacionados con obesidad como TNF- $\alpha$ , IL-6 y PPAR- $\gamma$ .

El compuesto DOAcQ no es tóxico con la Prueba de Ames, y el Ensayo de Micronúcleos.

La DL<sub>50</sub> de DOAcQ se encuentra en la categoría 5 de la GHS, esto obtenido por la prueba TG 423 de la OCDE, lo que lo hace seguro.

## 9. PERSPECTIVAS

Diseñar y sintetizar nuevos derivados de DOAcQ, para ver si estos pueden tener mejor actividad hipoglucemiante y antiobesidad.

Separar el par de enantiómeros y encontrar si las 2 moléculas tienen efecto igual o diferente.

Evaluar otros genes regulados por la administración de DOAcQ relacionados con diabetes y obesidad, como las isoformas de PPAR, así como otras citocinas.

Buscar la vía de señalización por la cual DOAcQ está regulando genes como IL-6, TNF- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ .

Evaluar la dosis subaguda en roedores y no roedores.

Hacer una forma farmacéutica para DOAcQ

Realizar pruebas clínicas en seres humanos.

## 10. REFERENCIAS

Ahlem S., Khaled H., Wafa M., Sofiane B., Mohamed D., Jean-claude M., Abdelfattah E.F. (2009). Oral administration of Eucalyptus globulus extract reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Chemico-biological interactions*, 181, 71-76.

Andersson O., Adams B.A., Yoo D., Ellis G.C., Gut P., Anderson R.M., German M.S., Stainier D.Y.R. (2012). Adenosine signaling promotes regeneration of pancreatic  $\beta$  cells in vivo. *Cell metabolism*, 15, 1-10.

Andrade-Cetto A., Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 99, 325-348.

Arias-Díaz J., Balibrea J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición hospitalaria*, 22, 160-168.

Arredondo A., De Icaza E. (2011). Costos de la diabetes en américa latina: evidencia del caso mexicano. *Value in health*, 14, 585-588.

Becerra-Jiménez J., Andrade-Cetto A. (2012). Effect of *Opuntia streptacantha* Lem. On alpha-glucosidase activity. *Journal of ethnopharmacology*, 139, 493-496.

Bing X. Medical composition for treating diabetes mellitus with hyperlipaemia and preparation method thereof. China, CN 103006725 A, 2013.

Burgueño-Tapia E., Ordaz-Pichardo C., Buendía-Trujillo A.I., Chargoy-Antonio F.J., Joseph-Nathan P. (2012). Structure and absolute configuration of a visamminol derivative using IR and vibrational circular dichroism, *Phytochemistry Letters*, 5, 804-808.

Cefalu W.T. (2007). Pharmacotherapy for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: rationale and specific agents. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 81, 636-649.

Chakrabarty D., Kumar A.K., Datta K.S. (2009). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in *Heimerocallis* (day lily) flowers. *Journal of horticulture forestry*, 1, 113-119.

Chiang M.-C., Chern Y., Huang R.-N. (2012). PPARgamma rescue of the mitochondrial dysfunction in Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, 45, 322-328.

Choi W.-S., Chang S.-H., Kim J.-E., Lee S.-E. (2013). Hypolipidemic effects of scoparone and its coumarin analogues in hiperlipidemia rats induced by high fat diet. *Journal of the korean society for applied biological chemistry*, 56, 647-653.

Choi W.H., Um M.-Y., Ahn J., Jung C.H. Park M.K., Ha T.Y. (2014). Ethanolic extract of taheebo attenuates increase in body weight and fatty liver in mice fed a high-fat diet. *Molecules*, 19, 16013-16023.

Dahake A.P., Chakma C.S., Chakma R.C., Bagherwal P. (2009). Antihyperglycemic activity of methanolic extract of *Madhuca longifolia* bark. *Diabetologia croatica*, 39, 3-8.

Ding X., Fan S., Lu Y., Zhang Y., Gu M., Zhang L., Liu G., Guo L., Jiang D., Lu X., Li Y., Zhou Z., Huang C. (2012). Citrus ichagensis Peel extract exhibits anti-metabolic disorder effects by the inhibition of PPAR $\gamma$  and LXR signaling in high-fat diet-induced C57bl/6 mouse. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, article ID 678592.

Drews G., Krippeit-Drews., Düfer M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pfluger Archiv European journal of physiology*, 460, 703-718.

Dongfeng L., Chengdong Y., Bin F.B. One kind praeruptorin preparation. China, CN 101759705, 2009.

Eder K., Baffy N., Falus A. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation research*, 58, 727-736.

Egan D., O'Kennedy R., Moran E., Cox D., Prosser E., Thornes D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 22, 503-529.

ENSANUT 2012, Encuesta nacional de salud y nutrición. Secretaría nacional de salud. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>

Faldt J., Wernstedt I., Fitzgerald S.M., Wallenius K., Bergstrom G., Jansson J.-O. (2004). Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice. *Endocrinology*, 145, 2680-2686.

Fröde T.S., Medeiros Y.S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of ethnopharmacology*, 115, 173-183.

García-Galicia M.C., Burgueño-Tapia E., Romero-Rojas A., García-Zebadúa J.C., Cornejo-Garrido J., Ordaz-Pichardo C. (2014). *Journal of ethnopharmacology*, 152, 91-98.

Giacco F., Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107, 1058-1070.

Graeme I.B., Kenneth S.P. (2001). Diabetes mellitus and genetically programmed defects in  $\beta$ -cell function. *Nature*, 414, 788-791.

Grygiel-Górniak B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications a review. *Nutritional journal*, 13, 1-10.

Harishankar M.K., Logeshwaran S., Sujeevans S., Aruljothi K.N., Dannie M.A., Devi A. (2015). Genotoxicity evaluation of metformin and glimepiride by micronucleus assay in exfoliated urothelial cells of type 2 diabetes mellitus patients. *Food chemical toxicology*, 83, 146-1450.

Heck A.M., Yanovski J.A., Calis K.A. (2000). Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy*, 20, 270-279.

Hosseini A., Abdollahi M. (2012). It is time to formulate an antioxidant mixture for management of diabetes and its complications: notice for pharmaceutical industries. *International journal of pharmacology*, 8, 60-61.

Huang L., Kashiwada Y., Consentino L.M., Fan S., Chen C.-H., McPhail A.T., Fujioka T., Mihashi K., Lee K.-H. (1994). Anti-AIDS agents. 15. Synthesis and anti-hiv activity of dihydroseselin and related analogs. *Journal of medicinal chemistry*, 37, 3947-3955.

Irudayaraj S.S., Sunil C., Duraipandiyar V., Ignacimuthu S. (2012). Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 143, 515-523.

Jayashree B. S., Kumar A., Pai A. (2011). Synthesis characterization and antidiabetic evaluation of novel coumarin analogues. *Pharmacologyonline*, 3, 1061-1076.

Jung M., Park M., Lee H.C., Kang Y.-H., Kang E.S., Kim S.K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current medicinal chemistry*, 13, 1203-1218.

Kamalakkannan N. y Prince P.S.M. (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 98, 97-103.

Kanasaki K., Koya D. (2010). Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *Journal of biomedicine and biotechnology*, article id 197636.

Kanchan D.M. Somani G.S, Peshattiwar V.V., Kaikini A.A., Sathaye S. (2016). Renoprotective effect of diosgenin in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacological reports*, 68, 370-377.

Kathryn E.W., Gokhan S.H. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The journal of clinical investigation*, 115, 1111-1119.

Kim S.O., Yun S.-J. Jung B., Lee E.H., Hahm D.-H., Shim I., Lee H.-J. (2004). Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) in obesity rat fed high fat diet: Relations of TNF- $\alpha$  and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life sciences*, 75, 1391-1404.

Kolb H.C., VanNieuwenhze M.S., Sharpless B. (1994). Catalytic asymmetric dihydroxylation. *Chemical reviews*, 94, 2483-2547.

Kumar A., Maurya R.A., Sharma S., Ahmad P., Singh A.B., Bhatia G., Srivastava A.K. (2009). Pyranocoumarin: A new class of anti-hyperglycemic and anti-dyslipidemic agents. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 19, 6447-6451.

Le lay S., Simard G., Martinez M.C., Andriantsitohaina R. (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view, *Oxidative medicine and cellular longevity*, ID 908539.

Leena A.A. y Jill P.C. (2010). Type 2 Diabetes prevention: a review. *Clinical diabetes*, 28, 53-59.

Leto D., Saltiel A.R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Molecular cell biology*, 13, 383-396.

Li H., Zheng X., Wang H., Zhang Y. Xin H., Chen X. (2010). XLF-III-43, a novel coumarin-aspirin compound, prevents diabetic nephropathy in rats via inhibiting advanced glycation end products. *European journal of pharmacology*, 627, 340-347.

Liu J., Lee J., Hernandez M.A.S., Mazitschek R., Ozcan U. (2015). Treatment of obesity with celastrol. *Cell*, 161, 999-1011.

Marques A.D.S., Lin C.-T. (2004). Molecular complexes of IQ and 4-hydroxycoumarin: a mutagen-anti-mutagen system. *Journal of photochemistry and photobiology b: Biology*, 74, 63-71.

Monisha B., Madhukar S. (2012). Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clinica chimica acta*, 413, 1163-1170.

Murakami S., Kiyoshini N., Baba K., Kawada T., Takahashi N., Nishimura K. Prophylactic and therapeutic agent of diabetes mellitus. *Japón*, 2012-153625, 2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

Nugara R.N., Inafuku M., Takara K., Iwasaki H., Oku H. Pteryxin: A coumarin in *Peucedanum japonicum* thunb leaves exerts antiobesity activity through modulation of adipogenic gene network. *Nutrition*, 30, 1177-1184.

Ohta T., Watanabe K., Moriya M., Shirasu Y., Kada T. (1983). Anti-mutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide or UV irradiation in *E. coli*. *Mutation research*, 117, 135-138.

OECD, 2014. Guidelines for the testing of chemical, Section 4, Health effects.

OMS, Diabetes. Fecha de consulta: 23 de agosto del 2015.

OMS, Obesidad. Fecha de consulta 28 de marzo del 2016

Ortis F., Miani M., Colli M. L., Cunha D.A., Gurzov E.N., Allagnat F., Chariot A., Eizirik D.L. (2012). Differential usage of NF- $\kappa$ B activating signals by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in pancreatic beta cells. *Federation of the societies of biochemistry and molecular biology letters*, 586, 984-989.

Page P.C.B., Appleby L.F., Day D., Chan Y., Buckley B.R., Allin S.M. McKenzie M.J. (2009). Highly enantioselective total synthesis of (-)-(3'S)-lomatins and (+)-(3'S,4'R)-*trans*-khellactone. *Organic letters*, 11, 1991-1993.

Pari L., Rajarajeswari N. (2009). Efficacy of coumarin on hepatic key enzymes of glucose metabolism in chemical induced type 2 diabetic rats. *Chemico-biological interactions*, 181, 292-296.

Park M.-Y., Lee K.-S., Sung M.-K. (2005). Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , y LPL mRNA expressions. *Life sciences*, 77, 3344-3354.

Patil S.B., Dongare V.R., Kulkarni C.R., Joglekar M.M., Arvindekar A.U. (2013). Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* in streptozotocin-induced diabetic rats by glucose independent insulin secretagogue action. *Pharmaceutical biology*, 51, 1411-1418.

Rajarajeswari N., Pari L. (2011). Antioxidant role of coumarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25, 355-361.

Ramesh B., Pugalendi K.V. (2005). Antihyperlipidemic and antidiabetic effects of umbelliferone in streptozotocin diabetic rats. *Yale journal of biology and medicine*, 78, 187-194.

Ramesh B., Pugalendi K.V. (2006). Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of medicinal food*, 9, 562-566.

Reiter R.J., Tan D.-X., Osuna C., Gitto E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science*, 7, 444-458.

Ren L., Du X., Hu M., Yan C., Liang T., Li Q. (2013). Design, synthesis and antitumor activity of novel 4-methyl-(3'S,4'S)-*cis*-khellactone derivatives. *Molecules*, 18, 4158-4169.

Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Woude H.v.d., Jeurissen S.M.F., Schutte M.E., Alink G.M. (2005). Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation research*, 574, 124-138.

Safavi M., Foroumadi A., Abdollah M. (2013). The importance of synthetic drugs for type 2 diabetes drug discovery. *Expert opinion drug discovery*, 8, 1339-1363.

Saltiel A.R. Khan R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.

Saravana C.B., Sathiya S., Anbarasi C., Prathyusha N., Ramakrishnan G., Kalaivani P., Jyothi P.R., Selvarajan K.K., Verammal M.M., Thanikachalam S. (2012). Polyphenols in madhumega chooranam, a Siddha medicine, ameliorates carbohydrate metabolism and oxidative stress in type II diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 142, 331-336.

Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutation research*, 31, 9-15.

Sellamuthu P.S., Palanisamy A., Kamalraj S., Fakurazi S., Kandasamy M. (2013). Protective nature of Mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *International scholarly research notices*, ID 750109.

Sheikh C., Takagi S., Yoshimura T., Morita H. (2010). Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of 'active ester' and the related derivatives with nucleophiles. *Tetrahedron*, 66, 7272-7278.

Sinha A.K. (1971). Colorimetric assay of catalase. *Analytical biochemistry*, 47, 389-394.

Shivanna N., Naika M., Khanum F., Kaul V.K. (2012). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of diabetes and its complications*, 27, 103-113.

Simon S., Andrew H. (2005). Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature medicine*, 12, 75-80.

Steven E., Jongsoon L., Allison B.G. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The journal of clinical investigation*, 116, 1793-1801.

Son Y.J., Kim K.J. Pharmaceutical composition for preventing or treating osteoporosis, containing praeruptorin a or pharmaceutically acceptable salt thereof as active ingredient. Korea, WO2014084669, 2014.

Song Y.L., Zhang Q.-W., Li Y.-P., Yan R., Wang Y.T. (2012). Enantioseparation and absolute configuration determination of angular-type pyranocoumarins from *Peucedani radix* using enzymatic hydrolysis and chiral HPLC-MS/MS analysis. *Molecules*, 17, 4236-4251.

Surwit R.S., Khun C.M., Cochrane C., McCubbin J.A., Feinglos M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37, 1163-1167.

Suzuki M., Yu D., Morris-Natschke S.L., Smith P.C., Lee K.-H. (2006). Anti-AIDS agents 66: Syntheses and anti-HIV activity of phenolic and aza 3',4'-di-O-(-)-camphanoyl-(+)-*cis*-khellactone (DCK) derivatives. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 15, 6852-6858.

Szkudelski T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental biology and medicine*, 237, 481-490.

Tilg H., Moschen A.R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Molecular medicine*, 14, 222-231.

Venugopala K.N., Rashmi V., Odhav B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Research international*, ID: 963248.

Wade, L.G. Jr., Química Orgánica, 2ª. Edición, México, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V., 1993.

Wallenius V., Wallenius K., Ahrén B., Rudling M., Carlsten H., Dickson S.L., Ohlsson C., Jansson J.-O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature medicine*, 8, 75-79.

Wahli W., Michalik L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Cell press*, 23, 351-363.

Wang Q., Jiang C., Fang S., Wang J., Ji Y., Shang X., Ni Y., Zhang J. (2013). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 150, 1119-1127.

Wendel A., (1981). Glutathione peroxidase, *Methods in enzymology*, 77, 325-323

Wernstedt I., Edgley A., Bernstsson A., Faldt J., Bergstrom G., Wallenius V., Jansson J.-O. (2006). Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291, 551-557.

West D.B., Boozer C.N., Moody D.L., Atkinson R.L. (1992). Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American journal of physics*, 262, 1025-1032.

Xuan Z. Praeruptorin microemulsion and preparation method. China, CN 103690483, 2013.

Yang S., Zhong-li G., Zhen-wu D., Song-lan P. Ling-ling W., Qing W., Gui-zhen Z. (2012). Molecular targets of combined natural antioxidants against diabetes in streptozotocin-induced diabetic mice. *Chemical research in chinese universities*, 28, 96-102.

Yi-Cheng C., Lee-Ming C. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *American journal of translational research*, 2, 316-331.

Zhang S., Yang J., Li H., Li Y., Liu Y., Zhang D., Zhang F., Zhou W., Chen X. (2012). Skimmin, a coumarin, suppresses the streptozotocin-induced diabetic nephropathy in wistar rats. *European journal of pharmacology*, 692, 78-83.

Zhou J., Yan J., Bai Z., Li K., Huang K. (2015). Hypoglycemic activity and potential mechanism of a polysaccharide from the loach in streptozotocin-induced diabetic mice. *Carbohydrate polymers*, 121, 199-206.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Soluciones y reactivos para las mediciones antioxidantes

- ❖ Medio de reacción para la medición de GPx

GSH	15.3 mg
NADPH <sup>+</sup>	16.6 mg
EDTA	29.2 mg
Glutation reductasa	0.1 U/mL
Amortiguador de fosfatos pH 7.0, 50 mM	100 mL

El volumen de glutatión reductasa depende del que se compre y las unidades por mL que contenga.

- ❖ Superóxido dismutasa recombinante, expresado en *E. coli* liofilizado a 2500 unidades/mg S9697-15KU (sigma).

- ❖ Medio de reacción para la medición de SOD

EDTA	1.5 mg
L-metionina	74.0 mg
NBT	2.3 mg
Riboflavina	0.2 mg
Amortiguador de fosfatos pH 7.8, 50 mM	50.0 mL
Tritón	25.0 µL

### 11.2 Soluciones para inmunofluorescencia

- ❖ Amortiguador de citratos (10 mM, 0.05 % tween 20, pH 6.0) para exposición de epitopes.

Citrato tri-sódico (dihidratado)	2.49 g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar hasta disolver. Ajustar pH a 6.0 con 1 N de HCl y añadir 0.5 mL de tween 20, mezclar bien. Almacenar esta solución a temperatura ambiente por 3 meses o a 4 °C para periodos largos.

### 11.3 Soluciones para la Prueba de Ames

❖ Solución concentrada Histidina biotina (4 °C)

0.156 g de L-Histidina

0.0012 g de L-Biotina

Disolver en 10 mL de agua

Esterilizar por filtración

❖ Solución de ampicilina (4 °C)

8 mg/mL de ampicilina en NaOH 0.01N

(80 mg en 9.9 mL de H<sub>2</sub>O + 0.1 mL NaOH 0.01). Esterilizar por filtración, en esterilidad.

❖ Sales de Vogel-Bonner (Temperatura ambiente)

H <sub>2</sub> O	650 mL
10 g MgSO <sub>4</sub> – 7 H <sub>2</sub> O	10 g
Ácido cítrico monohidratado	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g
NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> – 4 H <sub>2</sub> O	175 g

❖ Preparación de agar Vogel-Bonner (4 °C)

Agar bacteriológico	7.5 g
Dextrosa anhidra	10.0 g
Agua destilada	490 mL
Sales de Vogel-Bonner	10 mL

Esterilizar y verter en cajas de Petri.

❖ Preparación de caldo nutritivo para crecimiento de cepas (4 °C)

Medio Oxoid	2.5 g
Agua destilada	100 mL

Colocar 20 mL en cada matraz.

❖ Preparación de solución de histidina-biotina 0.05 mM (4 °C)

D-Biotina	30.5 mg
L-Histidina	24.0 mg
H <sub>2</sub> O	250 mL

Esterilizar.

❖ Preparación de agar suave (4 °C)

Histidina-biotina 0.5 mM	10 mL
Agar bacteriológico	0.6 g
NaCl	0.6 g
H <sub>2</sub> O	90 mL

Esterilizar y vaciar en tubos 2 mL

❖ Obtención de homogenado de hígado de ratas fracción S9

Pesar 4 ratas Wistar (150-200 g)

Administrar via intraperitoneal Aroclor 200 mg/mL

Dejar reposar durante 3 días

Al tercer día quitar el alimento y dejarlos en ayuno de 24 h

Sacrificar en el 4 día por dislocación cervical

Extraer el hígado en esterilidad

Pesar el hígado y adicionar KCl 0.15 M (1 mg/g de hígado) y lavarlo con esta solución

Cortar en pedazos pequeños y homogenizar

Centrifugar a 8500 rpm durante 10 minutos y distribuir en viales.

❖ Preparación mezcla S9

Amortiguador de fosfatos

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.5 g
Agua	500 mL
Ajustar pH a 7.4	

Solución de Cloruros

KCl	12.29 g
MgCl <sub>2</sub>	8.14 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

Mezcla S9 (8 %)

NADP	26 mg
G6P	60 mg
Amortiguador fosfato pH 7.4	22 mL
Sol. de cloruros	500 µL
Homogenado de hígado de rata	1 mL
Filtrar en membrana de 45 µ.	

Oligos

Los oligos fueron disueltos en 100 µL de agua inyectable se cuantificaron y se realizó un gel de agarosa para ver su integridad, luego se hizo una dilución 1/10 o 2/10 dependiendo de su cuantificación para ser usados.

## 12. APÉNDICE

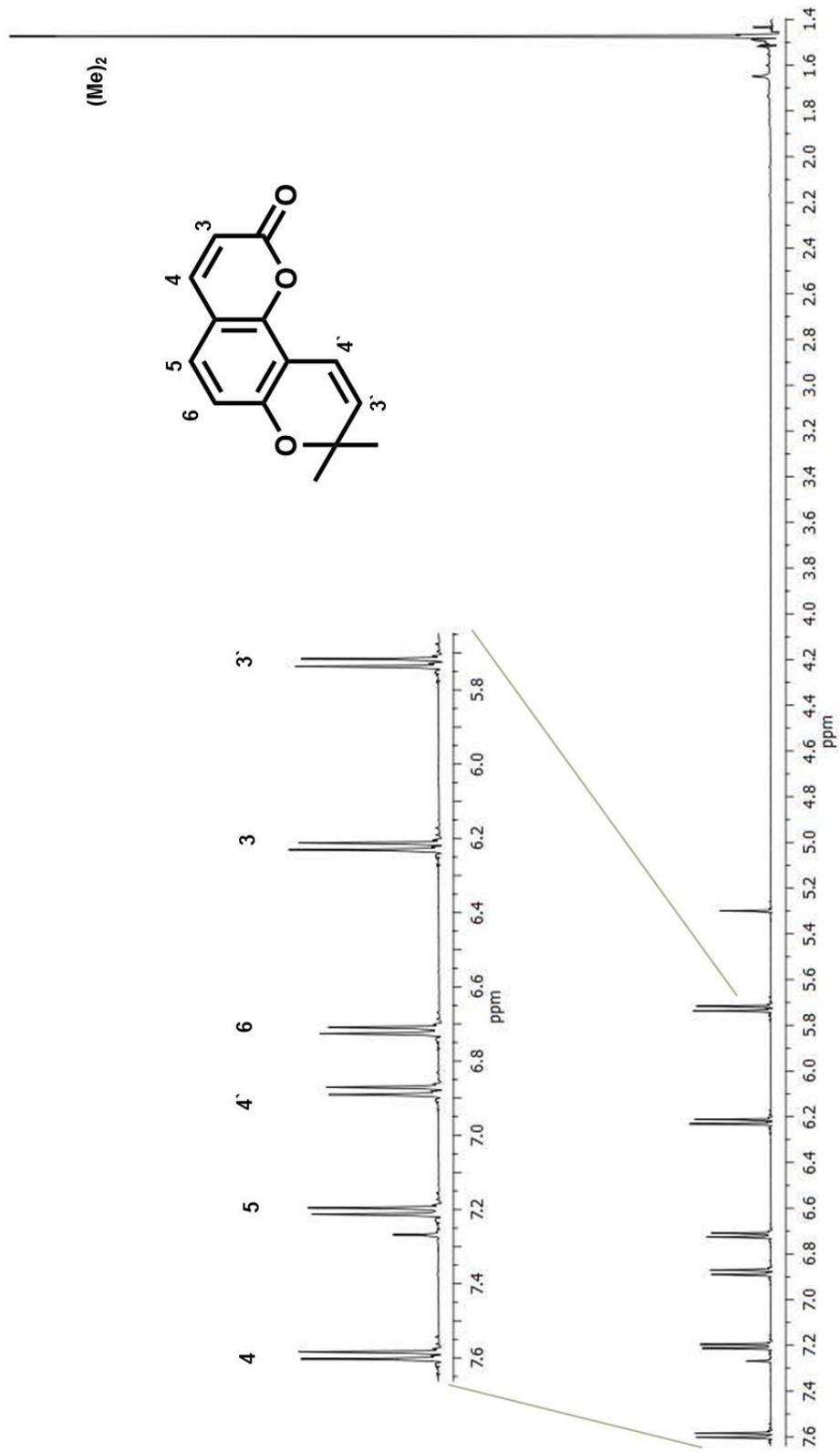
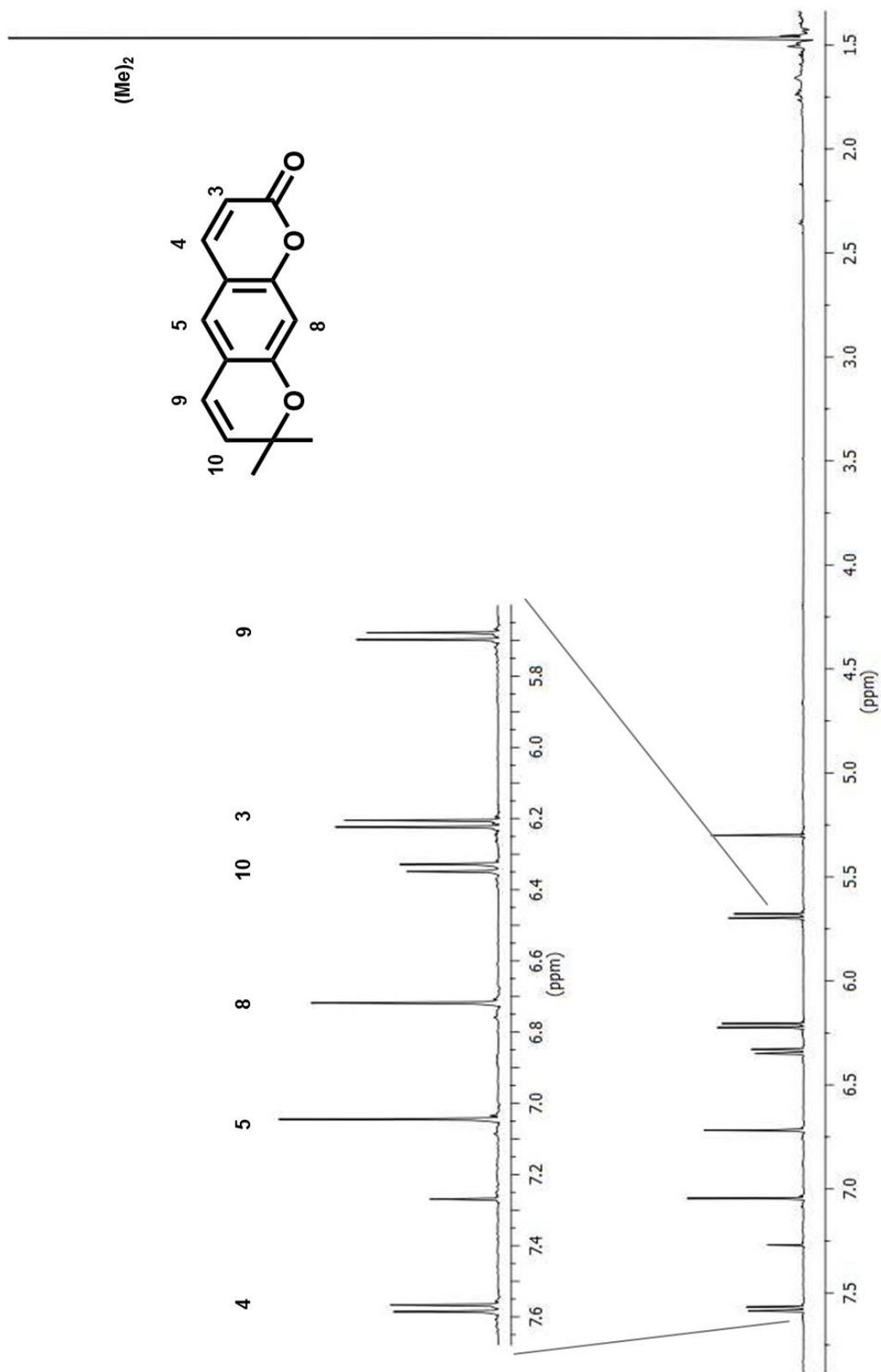
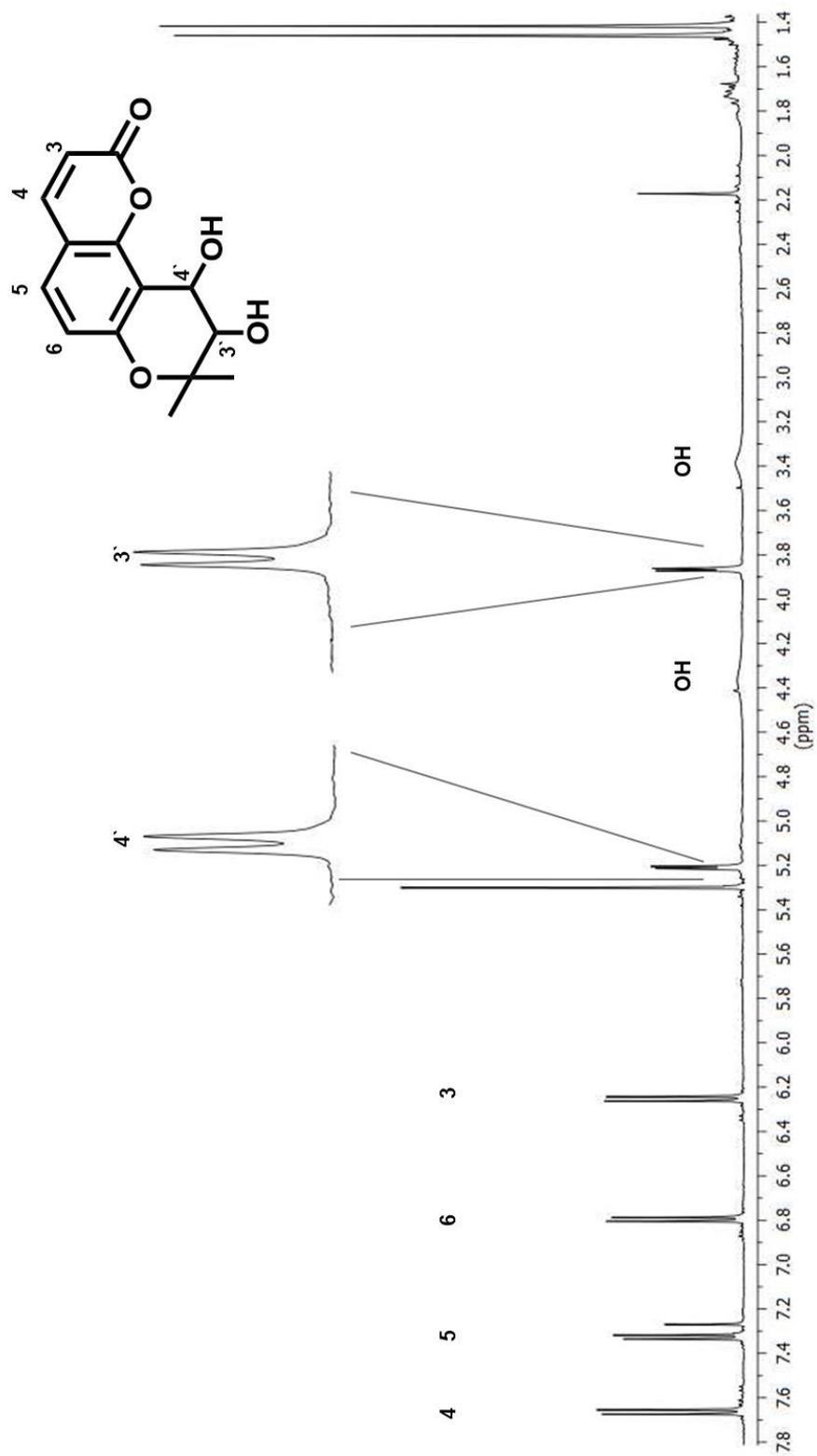


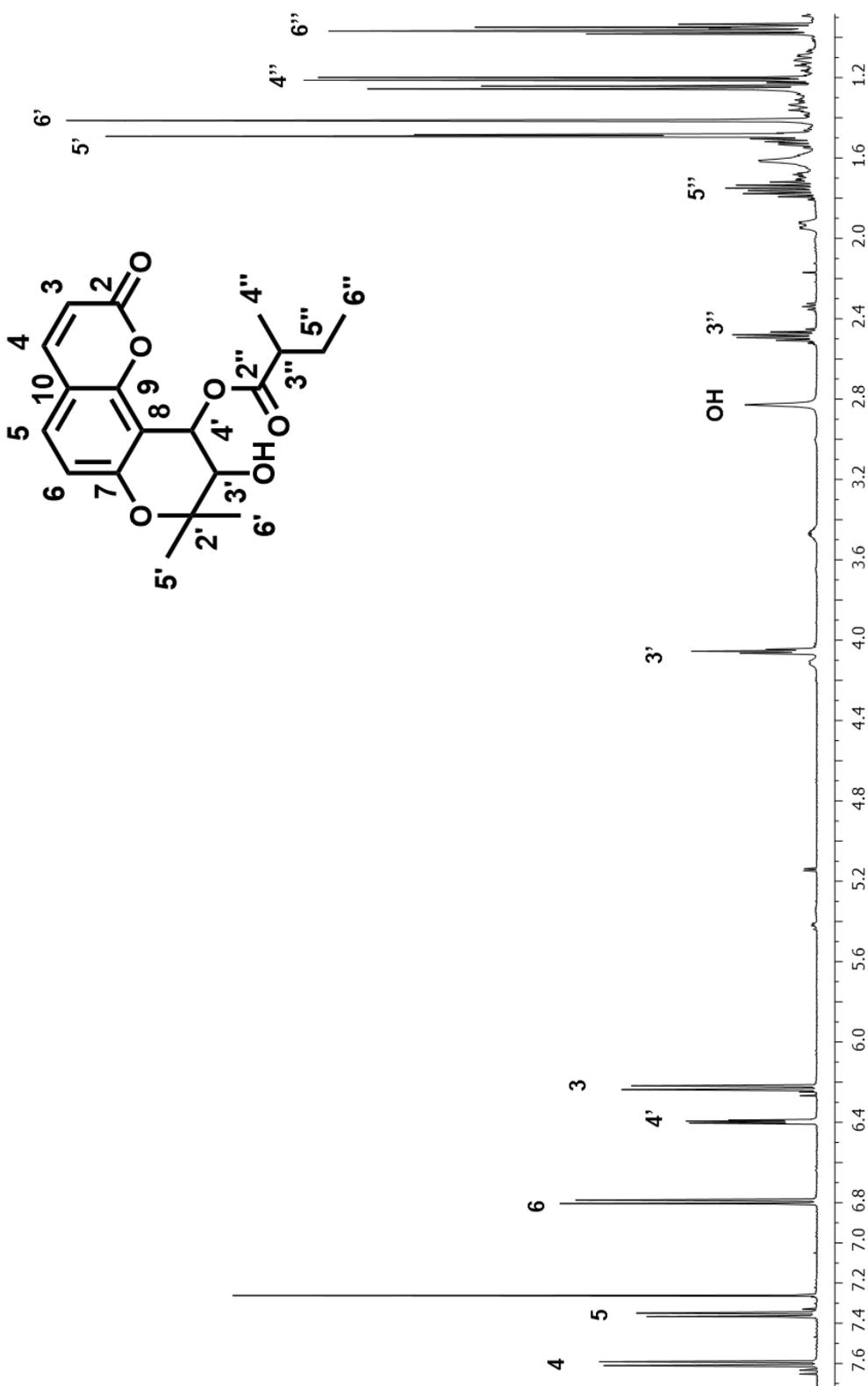
Figura 54. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la cumarina angular



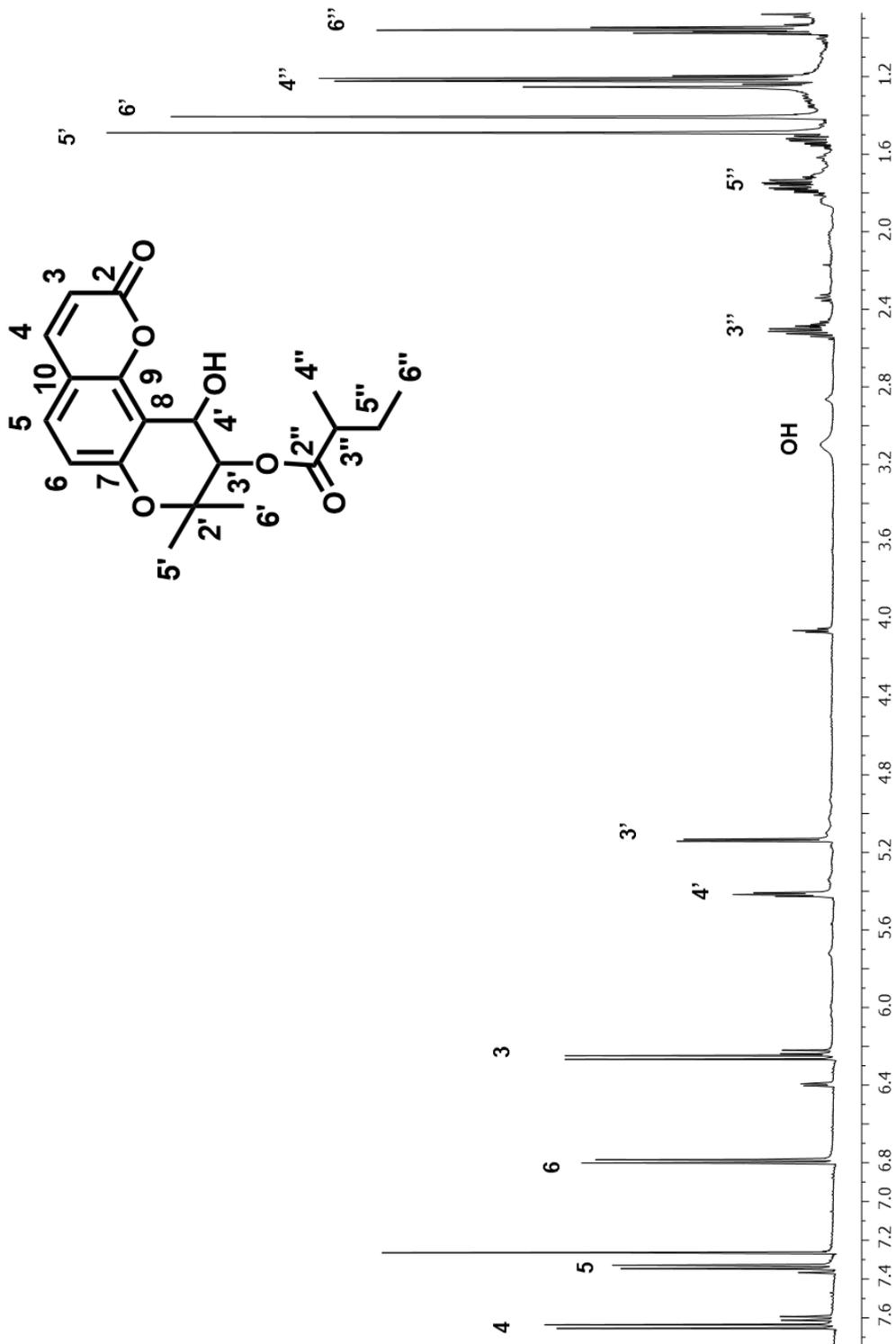
**Figura 55.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la pterocarmina lineal



**Figura 56.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la cis-quelactona



**Figura 57.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto esterificado en la posición 4'



**Figura 58.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto esterificado en la posición 3'

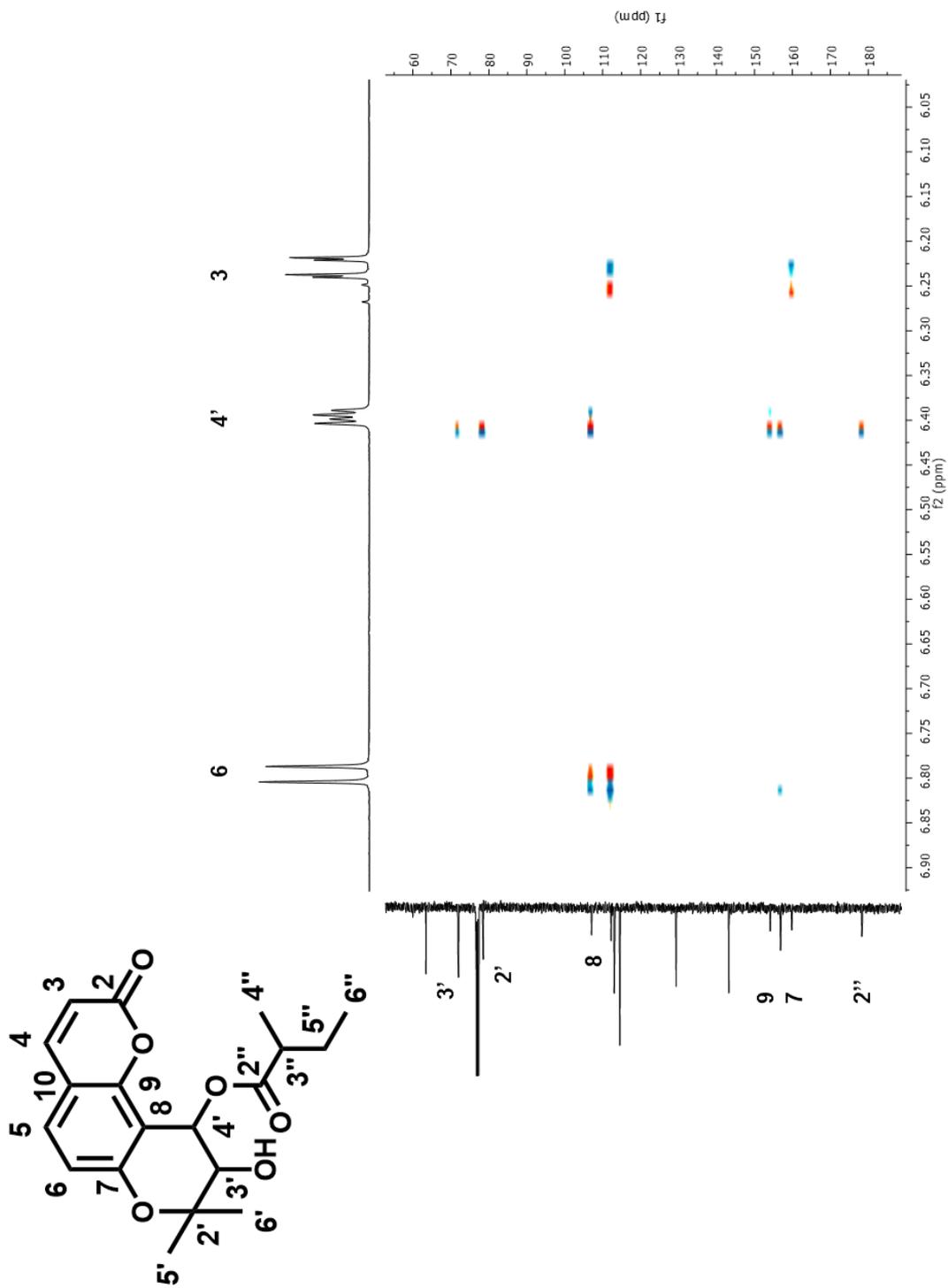


Figura 59. Espectro de HMBC del producto esterificado en la posición 4'

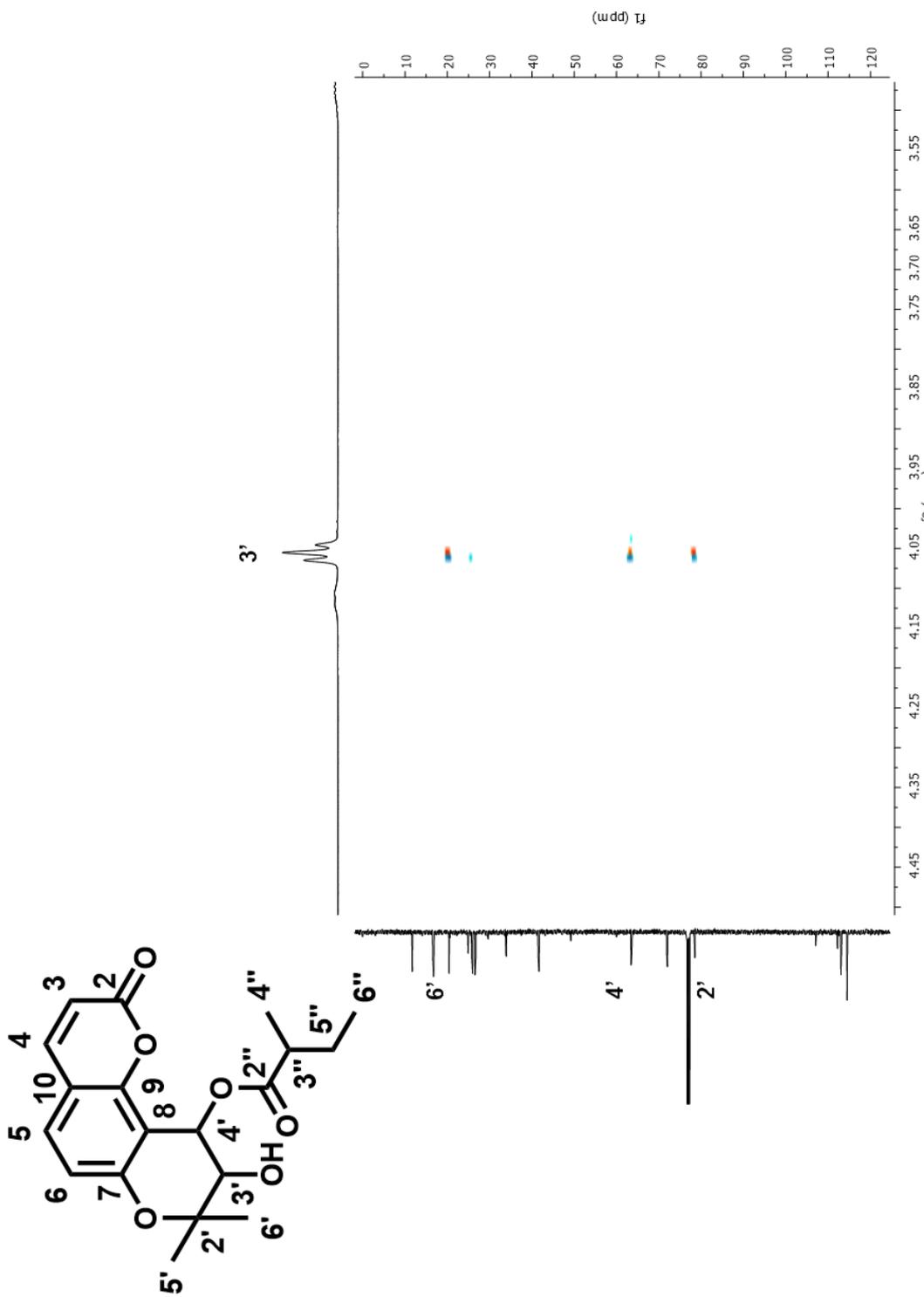
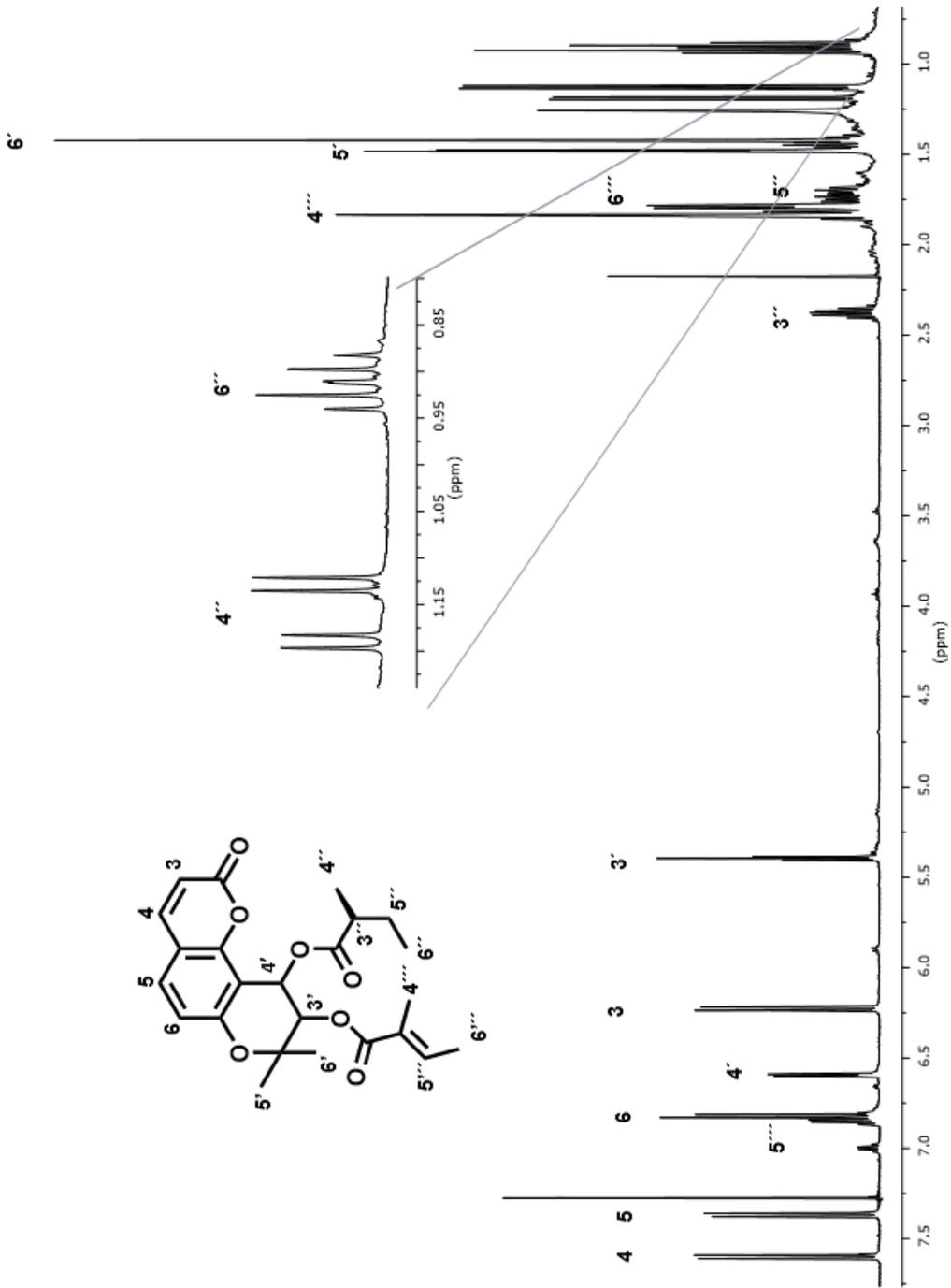


Figura 60. Espectro de HMBC del producto esterificado en la posición 4' (continuación)



F figura 61. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 5

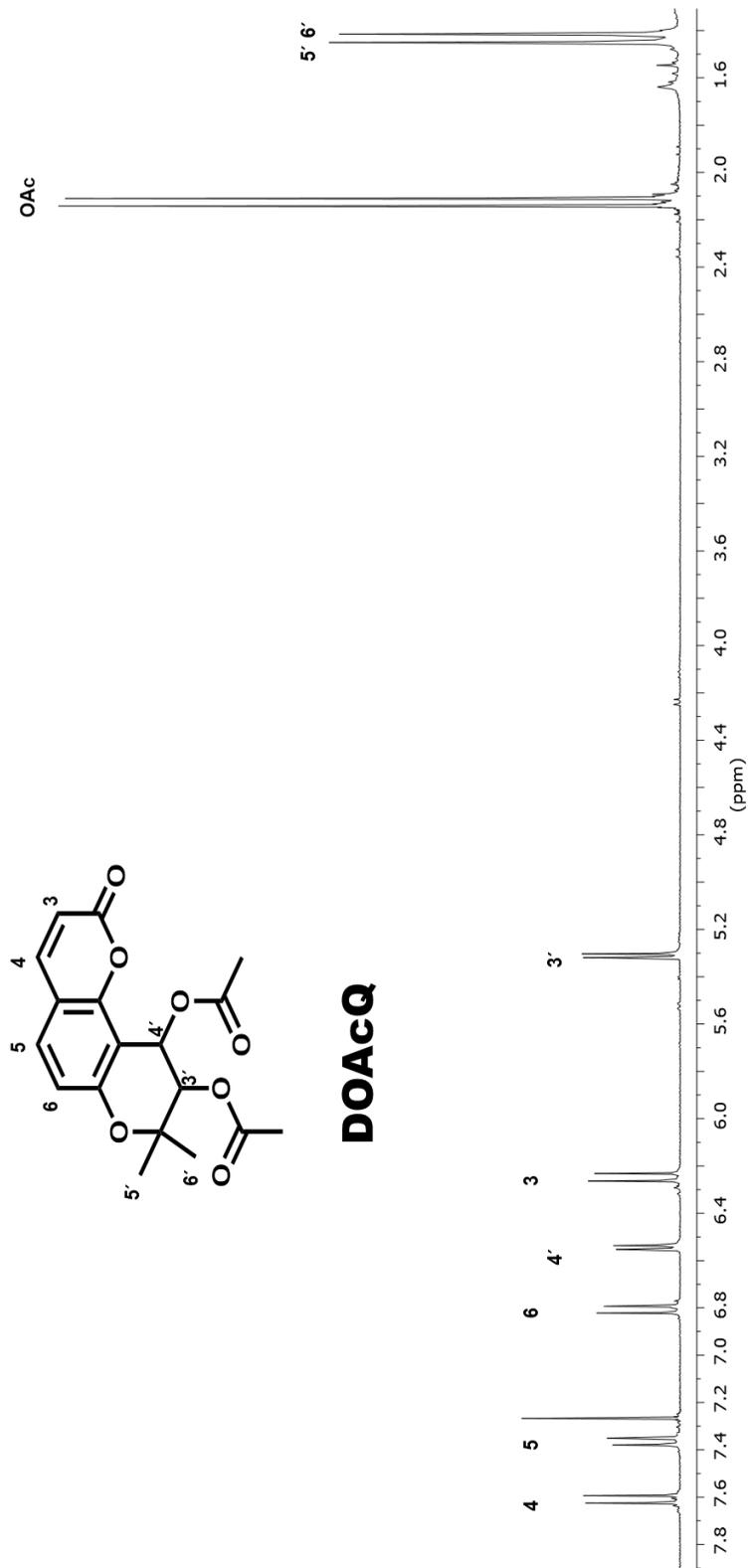
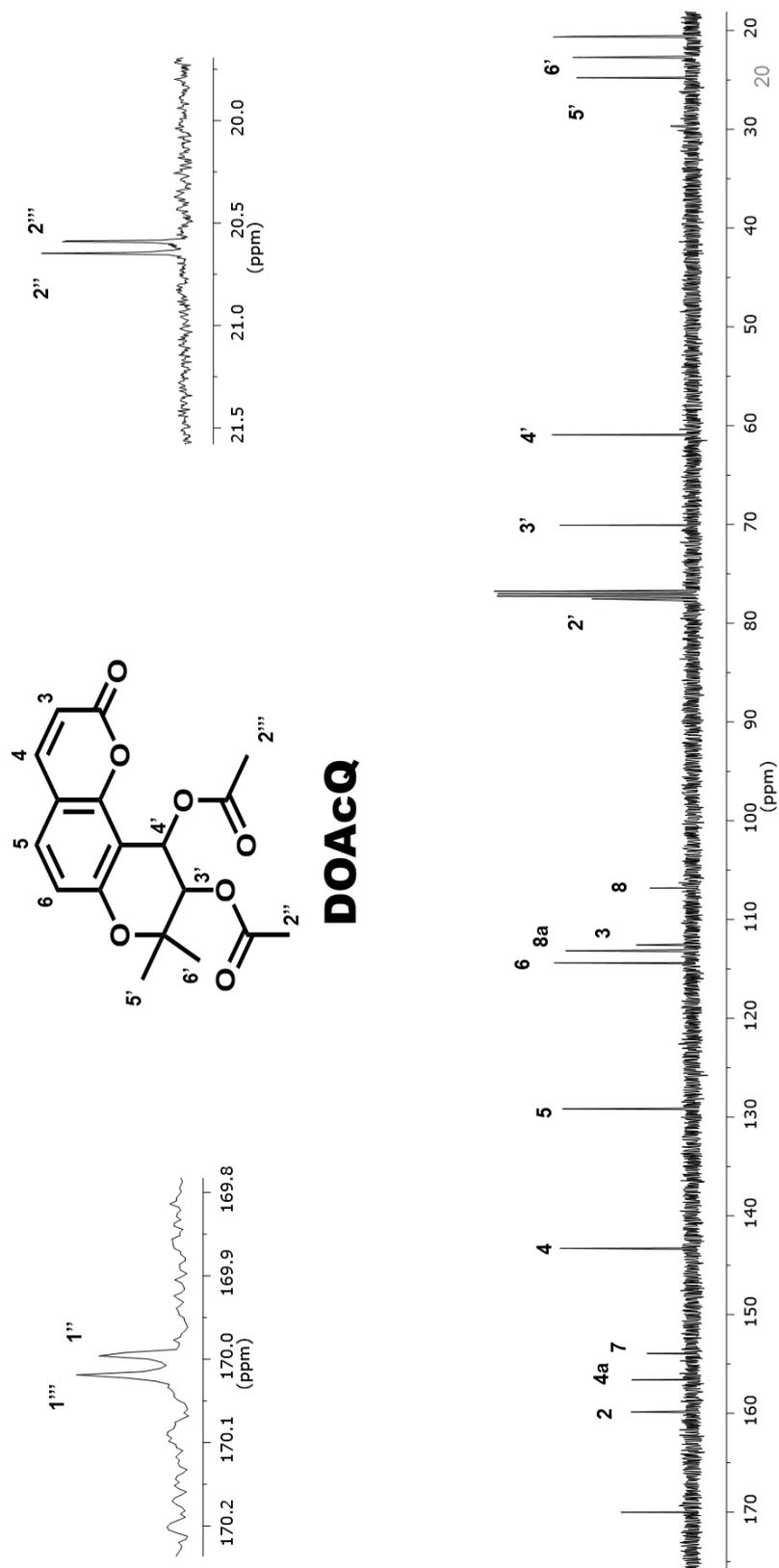
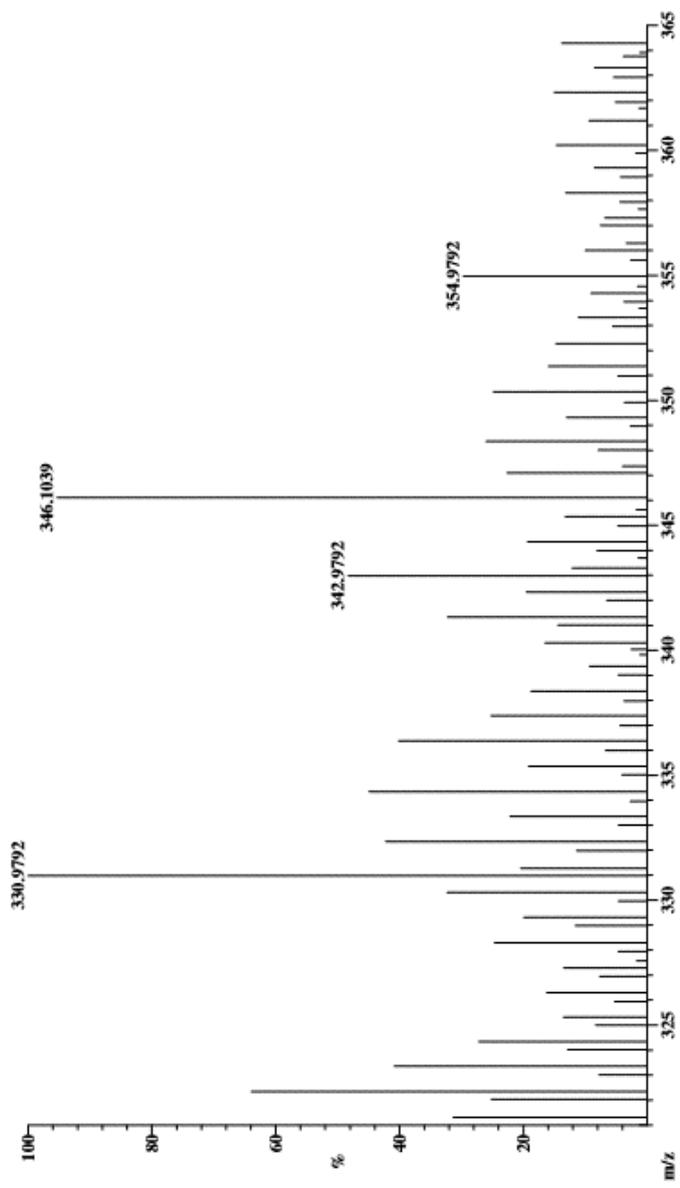


Figura 62. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de DOAcQ



**Figura 63.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DOAcQ



Selected Isotopes :  $H_{0.18}C_{0.18}O_{0.7}$

Error Limit : 100 ppm

<u>Measured</u> <u>Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated</u> <u>Mass</u>	<u>Error</u>
346.1039	95.3%	$C_{18}H_{18}O_7$	346.1053	-3.9

Figura 64. Espectro de masas de alta resolución de DOAcQ

# PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN



Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  
  
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:  
 Modelo Industrial     Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI  
 Sello  
 Folio de entrada  
 Fecha y hora de recepción

**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**  
 Dirección Divisinal de Patentes

Solicitud: MX/a/2015/016506  
 Expediente: 1/DIC/2015 Hora: 12:48:42  
 Folio: M/E/2015/087849 820827



Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al reverso

**I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor       El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
 2) Nacionalidad (es): MEXICANA  
 3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738  
 Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO  
 4) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 y 51975      5) Fax (clave): 55 51 193245

**II DATOS DEL (DE LOS) INVENTORES**

6) Nombre (s): CYNTHIA ORDAZ PICHARDO, ELEUTERIO BURGUEÑO TAPIA, ELIX ALBERTO DOMÍNGUEZ MENDOZA  
 7) Nacionalidad (es): MEXICANA  
 8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: TOLTECAS 57, UNIDAD EL ROSARIO, 02100  
 Población, Estado y País: AZCAPOTZALCO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO  
 9) Teléfono (clave): (55) 57 29 60 00 EXT.55535      10) Fax (clave):

**III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)**

11) Nombre (s): LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLÁNCO SALAZAR      12) R.G.P.: 27491  
 13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, C.P. 07738  
 Población, Estado y País: D.F., MÉXICO      14) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 y 51975      15) Fax (clave): 55 51193245  
 16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:  
 CARLOTA MARTÍNEZ MARTIN

17) Denominación o Título de la Invención:

**UNA MEZCLA ENRIQUECIDA CON LA ESTEREOQUÍMICA R,R DE 3',4'-DI-O-ACETIL-CIS-QUELACTONA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS**

18) Fecha de divulgación previa

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisinal de la solicitud

21) Fecha de presentación

22) Prioridad Reclamada:

País	Fecha de presentación			No. de serie
	Día	Mes	Año	



Certificado de acuse  
de recibo registro(s):  
MX/2015/087848

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES  
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE  
PATENTES  
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA  
Expediente de Patente de Invención Normal MX/a/2015/016506

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 19 de febrero de 2015

Claudia Alejandra BLANCO SALAZAR  
Apoderado de  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Edificio de la Dirección General, Av. Luis Enrique Erro S/N,  
Unidad Profesional Adolfo López Mateos  
Zacatenco  
07738, GUSTAVO A. MADERO, Distrito Federal, México

No. de Folio: 12411

RECIBI ORIGINAL  
Nombre:  
Fecha:  
Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su Solicitud presentada el 01/12/2015.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 16).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/08/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 26/01/2008, 09/05/2009, 06/01/2010, 18/08/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 07/09/2007); artículos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a) sub inciso i), segundo guión, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/06/2007); artículos 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores



MX/2015/12411

Av. del No. 240, Piso 3, Col. Puente de Santa María Terepán, Reclutamiento 14020, Ciudad de México.  
(55) 57543150 - [www.impi.gob.mx](http://www.impi.gob.mx)



Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subámbitos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

ATENTAMENTE  
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA

OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO.

OSGCPRELL2016

MX/2016/12411

Avenida No. 580, Piso 3, Col. Pueblo de Sanco Martín Tlalapa, No. 10, Ciudad de México  
(55) 53340700 - www.impi.gob.mx

Pág. 2

## Accepted Manuscript

Antidiabetic effect, antioxidant activity, and toxicity of 3',4'-Di-*O*-acetyl-*cis*-khellactone in Streptozotocin-induced diabetic rats

Elix Alberto Domínguez-Mendoza, Jorge Comejo-Garrido, Eleuterio Burgueño-Tapia, Cynthia Ordaz-Pichardo

PII: S0960-894X(16)30682-5  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>  
Reference: BMCL 24024

To appear in: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*

Received Date: 7 June 2016  
Accepted Date: 24 June 2016

Please cite this article as: Domínguez-Mendoza, E.A., Cornejo-Garrido, J., Burgueño-Tapia, E., Ordaz-Pichardo, C., Antidiabetic effect, antioxidant activity, and toxicity of 3',4'-Di-*O*-acetyl-*cis*-khellactone in Streptozotocin-induced diabetic rats, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>





## Antidiabetic effect, antioxidant activity, and toxicity of 3',4'-Di-O-acetyl-cis-khellactone in Streptozotocin-induced diabetic rats

Elix Alberto Domínguez-Mendoza<sup>a</sup>, Jorge Comejo-Garrido<sup>a</sup>, Eleuterio Burgueño-Tapia<sup>b</sup>,  
Cynthia Ordaz-Pichardo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, Edificio de Progreso, Primer Piso, Instituto Nacional de Medicina y Rehabilitación (INMER), Instituto Politécnico Nacional, Calles de México y Vigüera 229, Col. La Escalera del Camero A. México, 07200 DMX, México

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto Nacional de Ciencias Biológicas (INCB), Instituto Politécnico Nacional, Preingredios de Cerezo y Pico de Ayala s/n, Col. Sanco Tamiá, 11410 CDMX, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 June 2016

Accepted 24 June 2016

Available online xxxxx

#### Keywords:

Antidiabetic activity

Antioxidant activity

3',4'-Di-O-acetyl-cis-khellactone

Diabetes

### ABSTRACT

Pyranocoumarins are compounds with an important pharmacological profile, such as anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic, antiviral, antibacterial, and hypoglycemic effects. These molecules have a widespread presence as secondary metabolites in medicinal plants used to treat Diabetes Mellitus (DM). The aim of this work was to evaluate antidiabetic activity in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats and the antioxidant effects of 3',4'-Di-O-acetyl-cis-khellactone (DOAcK), as well as its toxic potential. We obtained DOAcK with an enantiomeric excess of 70% by chemical synthesis. Our results showed that this compound exerts an important antidiabetic effect: blood glucose decreased in groups treated with DOAcK by 60.9% at dose of 1.5 mg/kg ( $p < 0.05$ ) compared with the diabetic control group, and demonstrated a statistically significant increase in weight gain ( $45.7 \pm 9.7$  in the group treated with DOAcK vs.  $-23.0 \pm 33.1$  in the group with diabetes). In a biochemical profile, DOAcK did not modify lipid metabolism and did not cause damage at the renal level. DOAcK administration increased the activities of Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPe), and Super Oxide Dismutase (SOD) to levels near those of the healthy group. Histopathological analysis exhibited morphology similar to that of the healthy group and the group treated with DOAcK. DOAcK is not mutagenic by Ames test for *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, or TA102, and is not genotoxic by Micronucleus assay; median lethal dose ( $LD_{50}$ )  $> 2000$  mg/kg and, at this dose, no signs of toxicity or death were reported after 14 days of observation. These results indicate that DOAcK can improve glucose metabolism, which may be due to the increased antioxidant activity of CAT, GPe and SOD. In addition, DOAcK is not toxic in the studies tested.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease of impaired glucose metabolism characterized by hyperglycemia, which is caused by a deficiency in insulin secretion, insulin resistance, or both.<sup>1</sup> The World Health Organization (WHO) estimates that in 2012, hyperglycemia was the direct cause of 1.5 million deaths. Last year, 9% of adults worldwide had DM, and DM will be the 7th leading cause of death in 2030.<sup>2</sup> Treatment of type 2 DM (DM2) continues to present challenges because many patients have problems achieving adequate glucose levels. Despite the availability of many oral and injected antidiabetic drugs, therapeutic efficacy is regularly accompanied by side effects, such as hypoglycemia, weight increase, and cardiovascular complications, in addition to presenting high costs and, in many cases, drugs are not accessible to the entire popula-

tion. Therefore, the search for novel drugs with better risk-benefit profiles continues.<sup>3</sup> According to recent reviews, in Mexico there are at least 383 plant species employed for the treatment of Diabetes Mellitus (DM), but only a few of these have been investigated for their preclinical or clinical efficacy.<sup>4</sup> In a previous work, we found that the ethyl acetate extract of *Arrocuda toledensis* carries out significant hypoglycemic activity in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats,<sup>5</sup> being responsible for the biological activity, two of the major compounds: the chromone (S)-(+)-4'-O-acetylvisamminol, and the pyranocoumarin (3R,4R)-(-)-3'-O-acetyl-3'-O-acetyl-khellactone, also known as Prathuparin A.<sup>6</sup>

On the other hand, many works report that pyranocoumarin derivatives possess different biological activities, including cytotoxic, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, antibacterial, and hypoglycemic activity.<sup>7</sup> In patients with diabetes, there is a state of Oxidative Stress (OS), which it is due to a persistent product in

\* Corresponding author. Tel: +52 (55) 5729 6000x5556; fax: +52 (55) 5729 6000x5556.

E-mail address: [da\\_cynthia@hotmail.com](mailto:da_cynthia@hotmail.com) (C. Ordaz-Pichardo).

2

E.A. Dominguez-Mendoza et al. / Biorg. Med. Chem. Lett. xxx (2016) xxx–xxx

of Reactive Oxygen Species (ROS), Reactive Nitrogen Species (RNS), or a decrease in antioxidant enzyme activity.<sup>26</sup> Some coumarins, pyranocoumarins, and their related molecules have been evaluated in animal models, finding that they have hypoglycemic and antioxidant activity by increasing the activity of Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), and Super Oxide Dismutase (SOD).<sup>14,17</sup> Compounds that inhibit the increase in oxidant species may be drugs of interest for the treatment of DM.<sup>17</sup> Thus, we obtained the pyranocoumarin derivative **2**, *2',4'-Di-O-acetyl-6-hydroflavone* (DOAcK) with an enantiomeric excess of 70% by chemical synthesis, and evaluated its antioxidant and antidiabetic activity, as well as its possible toxic effects (Ames test, Micronucleus assay, Acute oral toxicity) in the search for a new drug that provides better quality of life for patients with diabetes.

Synthesis of DOAcK (Fig. 1) was performed in three reactions steps. In the first step, umbelliferone was reacted with 1,1-dithio-3-methyl-2-butene in a medium of xylene, obtaining sesoline as a yellow solid after purification by column chromatography (80%). Then, sesoline was reacted with AD-mix  $\alpha$  in water/tert-butanol to obtain *di-4-hydroflavone* with a yield of 80% and enantiomeric excess of 70% ( $[\alpha]_D^{25} = +23$ ). We compared this characteristic with those in the literature, and asymmetric dihydroxylation was stereo-selective primarily obtaining the RR configuration.<sup>27</sup> In the final step, DOAcK was obtained by the reaction of *di-4-hydroflavone* with acetyl chloride and DMAP in dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to obtain a white solid by column chromatography, for which the yield was 41%.

Administration of DOAcK increased Body Weight (BW) in a significant manner in comparison with untreated groups (Table 1). Dia-

betic and vehicle groups decreased and increased slightly in BW ( $-23.0 \pm 33.1$  Standard Error of the Mean [SEM]) and ( $2.2 \pm 18.5$ ), respectively, in contrast with the healthy group ( $64.3 \pm 28.9$ ). The group treated with Glibenclamide and DOAcK increased in  $54.8 \pm 20.4$  and  $45.7 \pm 9.7$ , respectively. There was significance between the treated and untreated groups; the group treated with DOAcK exhibited weight dose to that of the healthy group.

A survey of the literature illustrated that diabetic rats decrease their BW; however, treatment with extracts, fractions, or compounds from plants with antidiabetic activity can reverse this loss.<sup>28</sup> It has been found that Rutin exhibited an increase in BW up to 12.1%, and *Malthomys choroarum* can increase BW by 42.7%.<sup>14,17</sup>

Insulin comprises the most potent anabolic hormone known and Beta cells are responsible for producing; it is known that the death of these cells could be caused by hypoglycemia, and compounds with pyranocoumarin structure can improve it.<sup>29,30</sup> The increase in ROS can lead to death of Beta cells; therefore, an improvement in BW may be due to that DOAcK carries out better control of hypoglycemia by decreasing ROS.<sup>31</sup>

Coumarins and their derivatives have attracted attention due to their anti-inflammatory, antibacterial and antitumor activities,<sup>32,33</sup> as well as antidiabetic agents. In some studies it has been reported that different coumarins and pyranocoumarins decreasing blood glucose by up to 42%, and in some cases it has been demonstrated that this improvement is due to changes in the activity of Glucose-6-phosphatase and Fructose-1,6-bisphosphatase.<sup>33</sup> These and many other studies report that coumarins and their derivatives comprise a source of novel molecules of biological interest.

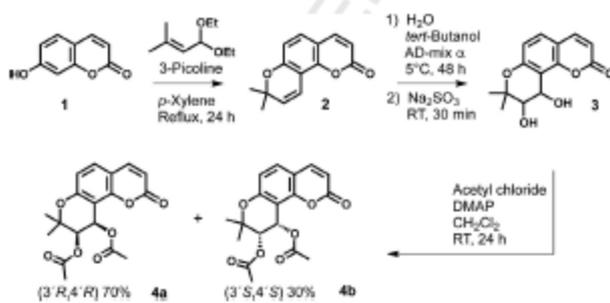


Figure 1. Synthesis of *2',4'-Di-O-acetyl-6-hydroflavone* (DOAcK).

Table 1  
Weight after 15-dose of DOAcK (15 mg/kg) in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat

Group	Day 0 (g)	Day 7 (g)	Day 21 (g)	Weight gain (g)
Healthy	334.5 ± 15.7	365.0 ± 15.8	388.8 ± 24.3	64.3 ± 28.9 <sup>a</sup>
Diabetic	371.6 ± 10.2	330.0 ± 12.0	346.6 ± 31.49	-23.0 ± 33.1 <sup>b</sup>
Diabetic + vehicle	321.5 ± 11.1	322.1 ± 6.4	323.8 ± 14.8	2.2 ± 18.5 <sup>b</sup>
Diabetic + Glibenclamide	320.7 ± 9.2	341.4 ± 12.1	365.5 ± 18.2	54.8 ± 20.4 <sup>c</sup>
Diabetic + DOAcK	319.4 ± 6.9	355.3 ± 10.9	365.1 ± 6.7	45.7 ± 9.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Statistically significant difference versus diabetic group by multiple comparison Dunnett test.

<sup>b</sup> Statistically significant difference versus healthy group by multiple comparison Dunnett test. Vehicle: Week 2-1 DM50. Glibenclamide was administered at 2.5 mg/kg. Weight gain = Weight on day 21, less weight on day 0 (n = 10; mean ± SEM; p < 0.05). Treatment was started on day 7 after STZ-induction; on day 21, 15-dose of DOAcK were completed (n = 10; mean ± SEM; p < 0.05).

Please cite this article in press as: Dominguez-Mendoza, E. A.; et al. Biorg. Med. Chem. Lett. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>

**Table 2**  
Fasting blood glucose after 15-days of DOAcK (15 mg/kg) in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat

Group	Day 0 (mg/dL)	Day 7 (mg/dL)	Day 14 (mg/dL)	Day 21 (mg/dL)	Day 21 (increased glucose) (mg/dL)	Decrease of blood glucose (mg/dL)
Healthy control	61.25 ± 3.0	106.80 ± 4.8	98.30 ± 3.1	90.50 ± 8.5	38.25 ± 8.7	–
Diabetic control	54.00 ± 2.6	371.80 ± 81.4	326.50 ± 72.3	327.50 ± 23.9	273.50 ± 21.8	–
Diabetic + vehicle	69.50 ± 8.5	270.00 ± 78.2	268.00 ± 65.3	406.30 ± 38.4	336.80 ± 24.8	–
Diabetic + Glibenclamide	63.75 ± 7.3	211.70 ± 45.2	282.80 ± 75.4	142.00 ± 5.5	78.25 ± 36.7	185.5 ± 24.5
Diabetic + DOAcK	72.80 ± 5.2	302.30 ± 70.3	280.70 ± 76.4	128.30 ± 6.4	55.5 ± 8.2	199.2 ± 24.7

\* Statistically significant difference versus diabetic group by multiple comparison Dunnett test. Vehicle: Water 2:1 DMSO. Glibenclamide was administered at 2.5 mg/kg increased glucose + Glucose on day 21, less glucose on day 0. Decrease of blood glucose = Glucose of diabetic group less glucose of treated group. Treatment was carried on day 7 after STZ-induction; on day 21, 15-days of DOAcK were completed. (n = 10, mean ± SEM; p < 0.05).

**Table 3**  
Biochemical profile in fasting blood after 15-days of DOAcK (15 mg/kg) in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat

Group	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Healthy control	0.53 ± 0.02	48.41 ± 3.26	70.54 ± 2.01	30.42 ± 1.57	21.66 ± 2.32
Diabetic control	0.58 ± 0.03	60.85 ± 6.89	68.30 ± 1.28	28.26 ± 1.54	12.67 ± 1.53
Diabetic + vehicle	0.56 ± 0.03	62.98 ± 6.21	80.09 ± 9.35	36.21 ± 0.51	23.11 ± 9.82
Diabetic + Glibenclamide	0.62 ± 0.05	58.43 ± 3.89	70.64 ± 2.79	35.60 ± 1.87	21.71 ± 4.68
Diabetic + DOAcK	0.51 ± 0.06	42.04 ± 6.99	70.84 ± 1.51	29.77 ± 1.09	22.38 ± 3.06

DOAcK = 2',6'-Di-O-acetyl-diosgenin. (N = 10; mean ± SEM; p < 0.05). Vehicle: Water 2:1 DMSO. (n = 10; mean ± SEM; p < 0.05).

**Table 4**  
Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), and Superoxide Dismutase (SOD) activity after 15-days of DOAcK (15 mg/kg) in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat

Group	CAT H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> consumed (µM/min/mg protein)	GPx NADPH consumed (µM/min/mg protein)	SOD unit of SOD (U/min/mg protein)
I Healthy control	132.2 ± 5.9	54.6 ± 5.5	0.83 ± 0.06
II Diabetic control	47.5 ± 2.6	20.8 ± 3.3	0.44 ± 0.01
III Diabetic + vehicle	68.9 ± 11.1	10.0 ± 0.6	0.22 ± 0.06
IV Diabetic + Glibenclamide	93.2 ± 4.9*	40.7 ± 5.8*	0.55 ± 0.02
V Diabetic + DOAcK	94.8 ± 7.8*	119.0 ± 20.7*	0.73 ± 0.03*

Vehicle: Water 2:1 DMSO. U of SOD: One unit (U) of SOD is defined as the amount in µg of enzyme that causes a 50% decrease of the NBT reduction. (n = 10, mean ± SEM; p < 0.05).

\* Statistically significant difference versus the diabetic group by the multiple comparison Dunnett test.

In Mexico, are at least 383 plant species employed for the treatment of DM.<sup>5</sup> We have evaluated extracts and compounds isolated from *A. tolucaensis*<sup>6</sup> with anti-inflammatory and antidiabetic activities in STZ-induced diabetic rats.<sup>6</sup> We now propose the evaluation of the biosynthetic one of the major metabolites of *A. tolucaensis*, DOAcK, which is an analogue of Praveruprin A; we expect that, due to a structural activity relationship, this compound will exhibit the same or better antidiabetic activity.<sup>20</sup> Table 2 shows the values of fasting blood glucose of the experimental groups. DOAcK treatment for 15 days at 15 mg/kg decreased blood glucose values. Blood glucose decreased in the groups treated with Glibenclamide and DOAcK by 56.6 and 60.9% (p < 0.05), respectively, when compared with the diabetic control group. These results indicate that DOAcK can improve glucose metabolism. Many works in the literature have evaluated the extracts of plants with antidiabetic activity. Toddalia stans (L.) Lam. Ethyl Acetate (EOAc) extract decreasing the blood glucose level from 290.38 ± 1.89 to 108.27 ± 4.38 mg/dL compared with the diabetic group. In addition, this extract increased SOD, CAT, and GPx activity,<sup>21</sup> and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *Kalanchoe pinnata* can decrease blood glucose in STZ-induced diabetic rats from 359 ± 11 to 109 ± 10 mg/dL.<sup>22</sup>

Other studies has been demonstrated that administration of Skimmin, a coumarin, decreased blood glucose from 494.4 ± 5.0 to 300.0 ± 10.1 mg/dL; in addition, Skimmin regulated Transforming Growth Factor beta-1 (TGF-β1) protein levels, which improved nephropathy in rats.<sup>23</sup> Chlorochromene and XLF-III-43, other coumarins, have been evaluated against diabetic nephropathy; both compounds improved diabetic complications by preserving the

blood-retinal barrier<sup>24</sup> and inhibiting advanced glycation end products.<sup>25</sup> The glucose values obtained in this study are similar to the studies discussed previously. DOAcK performed an antidiabetic effect, with a decrease of blood glucose of 199.2 ± 24.7 mg/dL compared with the untreated diabetic group. This result demonstrated that DOAcK possesses interesting antidiabetic activity. Table 3 depicts the biochemical profile in the experimental groups with and without treatment. No statistically significant differences were observed between all groups compared with healthy and diabetic controls; these results suggest that administration of DOAcK does not modify lipid metabolism and does not cause damage at the renal level. This is consistent with the absence of macroscopic pathologic lesions in the liver and kidney of animals treated with DOAcK.

Oxidative Stress (OS) produced by cellular respiration and environmental factors is the main cause of DM complications (protein oxidation, neuropathies, nephropathies, and neuropathies).<sup>26</sup> Superoxide anion, hydrogen peroxide and radical hydroxyl are the most dangerous radicals known. The cell possesses CAT, GPx, and SOD, enzymes that remove ROS, therefore, the increase of these enzymes provides protection against the harmful effects evoked by ROS.<sup>27</sup>

Extracts of *Stevia rebaudiana* and *Eucalyptus globulus* administered in animal models of diabetic rats increased CAT and GPx activities.<sup>28,29</sup> We performed an evaluation of DOAcK on CAT, GPx and SOD activities. Table 4 illustrates the effect on the antioxidant level in the liver of STZ-induced diabetic rats. Administration of DOAcK and Glibenclamide increased CAT activity to levels near

Please cite this article in press as: Domínguez-Mendoza, E. A.; et al. Biorg. Med. Chem. Lett. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>

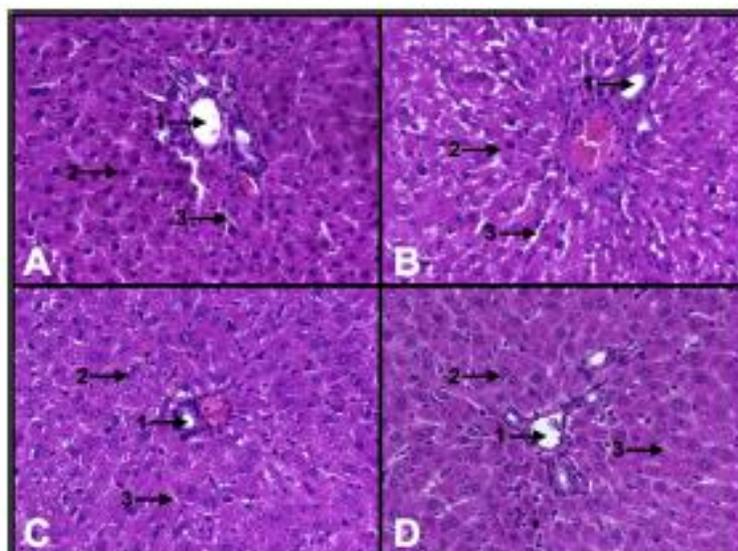


Figure 2. Histopathological analysis of liver in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. (A) Healthy control, (B) Diabetic control, (C) Diabetic + Glibenclamide, (D) Diabetic + DOAcK. (1) Central vein, (2) Hepatocyte, (3) Sinusoids. Images are representative of each experimental group (200 $\times$ ).

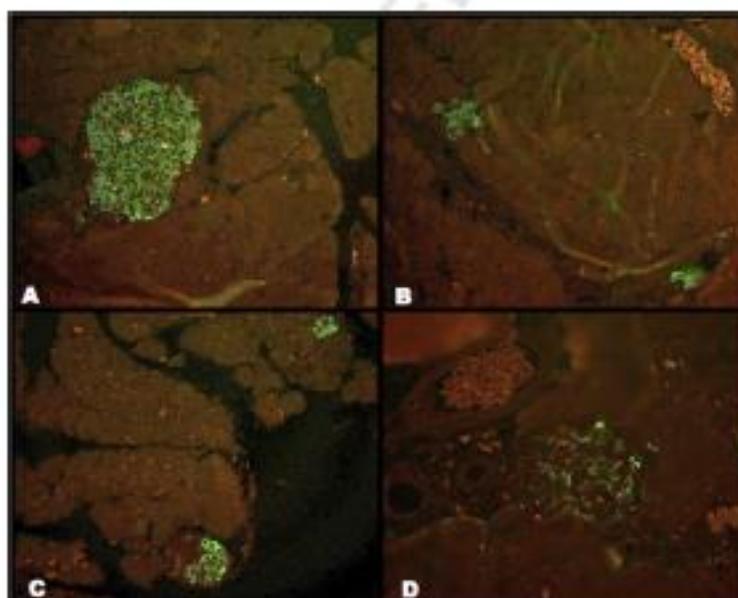


Figure 3. Fluorescence microphotographs of the livers of Langhans of Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Insulin is displayed in green. (A) Healthy control, (B) Diabetic control, (C) Diabetic + Glibenclamide, (D) Diabetic + DOAcK. Images are representative of each experimental group (200 $\times$ ).

those of the healthy group, but interestingly, DOAcK increased GPx activity more than Glibenclamide treatment. On the other hand, administration of DOAcK increased SOD activity of a statistically sig-

nificant manner. CAT, GPx, and SOD are three of the major antioxidative enzymes. It is known that there are compounds that are able to increase the expression of these enzymes. The thiazolidine-

Please cite this article in press as: Dominguez-Mendoza, E. A.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>

**Table 5**  
Mutagenicity Index of DOAcK in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, and TA102

Substance	Concentration $\mu\text{M}/\text{plate}$	TA98		TA100		TA102	
		With S9	Without S9	With S9	Without S9	With S9	Without S9
DOAcK	8.65	1.1	0.7	0.9	1.3	0.8	0.7
DOAcK	17.30	1.2	1.0	0.9	1.0	1.2	0.7
DOAcK	34.60	1.2	0.8	0.8	1.0	1.4	1.0
DOAcK	50.00	1.1	1.1	0.9	0.9	1.2	1.1
DOAcK	100.00	1.4	0.4	1.0	1.4	0.9	0.8
DMSO 0.1%	141.00	1.1	0.4	0.9	1.0	1.1	1.0
Picmonic acid	0.19		27.3				
N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	0.007				22.9		
4-Nitroquinoline-1-oxide	0.003						2.1
2-Aminonaphthalene	0.005	54.1		19.1		2.5	

DMSO = Dimethyl sulfoxide

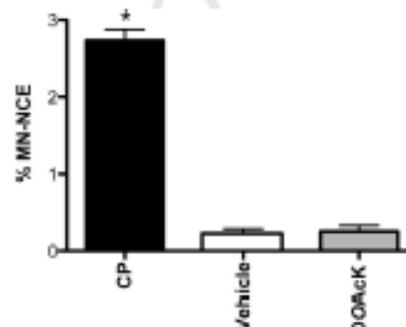
dioxins comprise a family of compounds that possess this activity; however, their toxic effects have removed some of these compounds.<sup>20</sup> Our results provide evidence that DOAcK can increase the activity of CAT, GPx and SOD, thus increasing antioxidant activity in order to attenuate damage generated by ROS. These results are in agreement with the results obtained in the Ames assay: DOAcK are not mutagenic on the TA102 strain, which is able to detect chemical compounds with the ability to generate ROS.

Histopathological analysis of the healthy rats group demonstrated normal architecture with a central vein and hepatocytes surrounding this vein, while the diabetic group exhibited more sinusoidal spaces due to hepatocyte inflammation and even death. Groups treated with Glimeclamide and DOAcK showed a morphology similar to that of the healthy group (Fig. 2); this could be due to improved glucose control. In other studies it has been reported that *Cyclocarya pouteria* and mangiferin in STZ-induced diabetic rats, can decrease the damage observed in different tissues, in contrast with the untreated groups.<sup>21,22</sup>

Figure 3 depicts the Islets of Langerhans of the experimental groups. The diabetic untreated group exhibits a constriction of these islets, as well as a decrease of  $\beta$ -cells versus the healthy group. In contrast, the DOAcK-treated group demonstrated morphology close to that of the healthy group. Patients with diabetes exhibited a decrease of  $\beta$ -cells after having been diagnosed with DM, due to progressive damage by OS evoked by ROS and hyperglycemia.<sup>23</sup> The morphology observed in the group treated with DOAcK is probably due to attenuation in ROS levels.

None of the five DOAcK concentrations tested were mutagenic for *S. typhimurium* strains TA98, TA100, or TA102 in the absence or presence of the S9 fraction. There are natural products that possess potential mutagenic activity, such as flavonoids and alkylphenoxones;<sup>24</sup> therefore, in order to avoid potential health risks, we evaluated the mutagenic potential of DOAcK by means of the Ames test. Only positive controls increased the revertants number under all conditions. Table 5 presents the mutagenic index of the doses used, which were determined as follows: the average number of revertants per plate test divided by the average number of revertants per baseline control plate. Since 1983, Ohta found that coumarin and 7-hydroxy-coumarin have antimutagenic effects;<sup>25</sup> furthermore, in 2004, Marquez and Lin found that 4-hydroxy-coumarin can be an antimutagen agent. This compound might form hydrogen-bonds between its carbonyl group and amino group of mutagenic compounds to produce stable complexes.<sup>26</sup> Although it is necessary to conduct other studies, we think that DOAcK and other coumarins would possess a mechanism similar to that demonstrated by 4-hydroxy-coumarin.

In vivo Micronucleus assay can detect genotoxic agents that cause damage to the chromosomes or to the mitotic spindle.<sup>27</sup> We evaluated the potential of DOAcK to produce micronucleus



**Figure 4.** Percentage of erythrocytes with micronuclei in the different groups. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the Mean (SEM). Significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) against the negative control. CP-Cyclophosphamide; vehicle (water 2:1 DMSO).

48 h after treatment was administered. Figure 4 depicts the percentage of micronuclei of treated groups. The positive control (Cyclophosphamide) was significantly increased compared with the vehicle control (water 2:1 DMSO), whereas administration of DOAcK did not affect the percentage of micronuclei. When a new drug is proposed for use in humans, it is necessary to analyze its toxic activity in order to avoid partial or mortal complications. Glimeclamide has been reported as not evoking any significant increase in the frequencies of micronucleated cells.<sup>28</sup> However, recently it was reported that Metformin and Glimepiride increased the frequency of micronucleated cells.<sup>29</sup> The presence of genotoxicity in drugs currently employed to treat DM is evident; in contrast, our results show that DOAcK are not aneuploid or clastogenic agent.

The OECD-423 test was conducted to evaluate the acute toxicity of DOAcK at the initial dose of 2,000 mg/kg.<sup>30</sup> At this dose, no signs of toxicity or death were reported after 14 days of observation. Animals treated with DOAcK increased BW in the same manner as the untreated control group (Table 6). Hence, according to the Globally Harmonized System (GHS) system, the LD<sub>50</sub> of DOAcK is >2000 mg/kg. Although DOAcK LD<sub>50</sub> has not been previously determined, its precursor, the coumarin, has an LD<sub>50</sub> >700 mg/kg,<sup>31</sup> both toxicity values suggesting that the acute toxicity of this family of compounds is relatively elevated. The biochemical profile in diabetic rats showed similar values to healthy group, indicating no toxic activity at the dose tested (Table 3).

**Table 6**  
Body weight (BW) of animals after 14 days of treatment with 2000 mg/kg of DOAcK

	Day 1		Day 14		Weight gain 14	
	Control	DOAcK	Control	DOAcK	Control	DOAcK
Weight	22.3 ± 1.8	21.0 ± 1.0	35.7 ± 1.5	34.0 ± 0.0	13.3 ± 0.2	13.0 ± 1.0

The search for new drugs to treat DM is essential, despite that there are many medications available to the public and many others under investigation; these drugs have different degrees of effectiveness and side effects. The pyrazolopyrimidines are compounds that possess an important pharmacological profile; we have provided evidence regarding how DOAcK can improve glucose metabolism, which may be due to the increased antioxidant activity of CAT, GPx, and SOD, in addition to not presenting high toxicological potential. Therefore, DOAcK could be an alternative in treating DM. However, more studies are necessary to warrant this: it is important to evaluate DOAcK in a different animal model of diabetes and to determine its sub-chronic and chronic oral toxicity. In this moment, we are evaluating DOAcK in an animal model of diet-induced obese mice to evaluate its potential for treating metabolic syndrome.

#### Acknowledgments

We thank Rita Iñigo García-González, MVZ, for his excellent technical support in the model of Streptozotocin-induced diabetic rats. The authors are very grateful for the financial support from SIP-IPN (20140974 and 20150719). Our thanks also go to CONACYT for the fellowship granted to EAD-M (240114), he studied in the program of Doctorate of Science in Biotechnology on Network of the National Polytechnic Institute.

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.071>.

#### References and notes

- WHO Diabetes Fact Sheet No. 312; World Health Organization, 2015.
- WHO Diabetes Programme 2015; World Health Organization, 2015.
- Kahn, S. E.; Cooper, M. E.; Del Prato, S. *Lancet* 2014, 383, 1068.
- Mata, R.; Cristóbal, S.; Escandon-Rivera, S.; Juárez-Royas, R.; Romero-Cruz, I. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 468.
- García-Galicia, M. C.; Burgaño-Tapia, E.; Romero-Rojas, A.; García-Zabala, J. C.; Consejo-Garrido, J.; Ordaz-Pichardo, C. *J. Ethnopharmacol.* 2014, 152, 91.
- Burgaño-Tapia, E.; Ordaz-Pichardo, C.; Baeza-Trujillo, A. I.; Chagoy-Aconito, F. J.; Joseph-Nathan, R. *Phytochem. Lett.* 2012, 5, 804.
- Wenigopal, K. N.; Radeni, V.; Odhav, B. *Biomol. Res. Int.* 2013, 9(2)248.
- Rain, J. L.; Jain, S. K. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 2011, 278, 567.
- Kumar, A.; Masura, R. A.; Sharma, S.; Ahmad, P.; Singh, A. B.; Bhatia, G.; Srivastava, A. K. *Bioorg Med Chem. Lett.* 2009, 19, 6447.
- Pati, L.; Rajarajewari, N. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 181, 292.
- Beltrán-Martínez, G. J.; Godínez-Fernández, J. R. *Biom.* 2014, 6, e94995.
- Song, Y. L.; Zhang, Q. W.; Li, Y. R.; Yan, R.; Wang, Y. T. *Molecules* 2012, 17, 4226.
- Kamalakannan, N.; Prince, P. S. M. *Ind. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 98, 97.
- Saravanan-Iyengar, C.; Sathya, S.; Anbarasi, C.; Prathyusha, N.; Ramakrishnan, G.; Kalivani, P.; Jyothi-Miya, R.; Selvarajan-Kesavanarayana, K.; Varammal-Mahadevan, M.; Thankachandran, S. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 142, 201.
- Ortiz, F.; Manó, M.; Celi, M. L.; Cunha, D. A.; Gurev, E. N.; Akgün, F.; Charlier, A.; Bédik, D. L. *FEBS Lett.* 2012, 585, 984.
- Siddiq, A. R.; Kahn, C. R. *Nature* 2001, 414, 799.
- Randhan, D. M.; Semari, G. S.; Peddathur, V. V.; Kalid, A. A.; Sathya, S. *Pharmacol. Rep.* 2016, 68, 370.
- Aggarwal, R.; Kumar, S.; Kaushik, P.; Kaushik, D.; Gupta, G. K. *Int. J. Med. Chem.* 2013, 62, 508.
- Hemshelkar, M.; Sindhu, K.; Thudara, R. M.; Santhosh, M. S.; Sundaram, M. S.; Kemparaja, K.; Girish, K. S. *Biochimie* 2013, 95, 1206.
- Pazani, G. A.; LaViole, E. *J. Chem. Res.* 1996, 95, 3147.
- Joseph, Indrajani, S.; Surali, C.; Duripandijyan, V.; Igudumathu, S. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 140, 515.
- Pati, S. B.; Dongam, V. R.; Kakani, C. R.; Jagdekar, M. M.; Arvindkar, A. U. *Phyto. Res.* 2013, 51, 1411.
- Zhang, S.; Yang, J. Z.; Li, H. Y.; Li, Y.; Liu, Y.; Zhang, D. M.; Zhang, F. R.; Zhou, W. Q.; Chen, X. G. *Int. J. Med. Chem.* 2012, 60, 78.
- Baumli, C.; Ward, K. W.; Mazon, E.; Cuzcoova, S.; Drago, F. *Invert. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008, 50, 3846.
- Li, H. Y.; Zhang, X. G.; Wang, H. B.; Zhang, Y.; Xu, H. Q.; Chen, X. G. *Int. J. Med. Chem.* 2010, 627, 240.
- Reber, R. J.; Yan, D. X.; Omana, C.; Gilio, E. *J. Biomed. Sci.* 2000, 7, 444.
- García, F.; Browne, M. *Chir. Res.* 2010, 107, 1058.
- Srivastava, N.; Nalka, M.; Khansari, F.; Kasl, V. K. *J. Diabetes Complicat.* 2013, 27, 103.
- Ahlem, S.; Khalid, H.; Wafa, M.; Sofiane, B.; Mohamed, D.; Jean-Claude, M.; Abdelkattab, E. F. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 181, 71.
- Chang, M.-C.; Chen, Y.; Huang, R.-N. *Neurobiol. Dis.* 2012, 45, 322.
- Wang, Q. Q.; Jiang, C. H.; Fang, S. Z.; Wang, J. H.; Ji, Y.; Zhang, X. L.; Ni, Y. C.; Yin, Z. Q.; Zhang, J. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 150, 1119.
- Sellamuthu, R. S.; Anukavan, P.; Kamalini, S.; Fakurazi, S.; Randaumy, M. *EBV Pharmacol.* 2013, 20(2), 750109.
- Cefali, W. T. *Chin. Pharmacol. Ther.* 2007, 31, 616.
- Reijnen, I. M.; Bovenma, M. G.; van der Waals, H.; Jeurissen, S. M.; Schute, M. E.; Aalk, G. M. *Metab. Res.* 2005, 574, 124.
- Obay, T.; Watanabe, K.; Moriya, M.; Shimizu, Y.; Kado, T. *Metab. Res.* 1983, 1(7), 125.
- Marques, A. D.; Liu, C. T. *J. Pharmacol. Pharmacol.* 2004, 74, 63.
- Scheidt, W. *Metab. Res.* 1985, 2(1), 9.
- de Saiz'Anna, J. R.; Franco, C. C. D.; Marbini, P. C. D.; de Castro-Rado, M. A. A. *Plant One* 2016, 10, e0120675.
- Harithanlar, M. K.; Iyeghwaran, S.; Sujewan, S.; Anjitha, K. N.; Danila, M. A.; Davi, A. *Red. Clin. Toxicol.* 2015, 32, 146.
- OECD Guide Book for the Testing of Chemicals, Section 4, *Weight Effects*; OECD: 2014.
- Egan, D.; O'Leary, R.; Moran, E.; Cox, D.; Prosser, E.; Thomas, R. D. *Drug Metab. Rev.* 1990, 22, 303.



## Instituto Politécnico Nacional Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:

### ELIX ALBERTO DOMÍNGUEZ MENDOZA

por su asistencia a las

### VII JORNADAS ACADÉMICAS DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Celebradas el 19 y 20 de mayo de 2014  
en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-Tlaxcala.

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara  
Director Interino del CIBA-Tlaxcala



Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa  
Coordinadora de nodo CIBA  
del Doctorado en Ciencias en Biotecnología



## Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala



### AWARDS THIS CERTIFICATE OF PRESENTATION

to:

**Dominguez-Mendoza Elix Alberto, Cornejo-Garrido Jorge,  
Burgueño-Tapia Eleuterio and Ordaz-Pichardo Cynthia**

for presenting the contribution entitled:

**EFFECT OF AN ANALOGUE OF PRAERUPTORIN A IN  
STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS**

IN THE

**1<sup>ST</sup> BIOTECHNOLOGY  
WORLD SYMPOSIUM**

&

**9<sup>º</sup> ENCUENTRO NACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN**

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Norma Solís Oba

Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

La Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales,  
el Centro de Investigación Científica de Yucatán,  
la Universidad Autónoma de Yucatán y el Instituto Mexicano del Seguro Social  
otorgan la presente

# Constancia

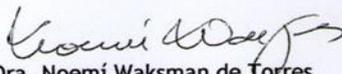
a:

**Elix Alberto Dominguez Mendoza, Eleuterio Burgueño Tapia,  
Cynthia Ordaz Pichardo**

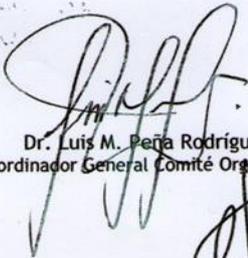
por la presentación del cartel

**“EFECTO DE UN ANÁLOGO DE PRAERUPTORINA A EN UN MODELO DE RATA  
DIABÉTICA INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA”**

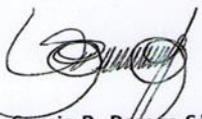
en el 10<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales  
celebrada del 21 al 24 de mayo de 2014.



Dra. Noemí Waksman de Torres  
Presidenta de la AMIPRONAT



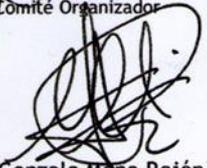
Dr. Luis M. Peña Rodríguez  
Coordinador General Comité Organizador



Dr. Sergio R. Peraza Sánchez



Dra. Gloria María Molina Salinas



Dr. Gonzalo Mena Rejón

La Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica y la Universidad Veracruzana.

ortogan la presente

## Constancia

Cynthia Ordaz Pichardo, Jorge Cornejo-Garrido, Eleuterio Burgueño Tapia, Elix Alberto Domínguez Mendoza.

a:

Por la presentación del cartel titulado:

**EFFECTO DE 3',4'-DI-O-ACETIL-CIS-QUELACTONA EN MODELOS ANIMALES DE DIABETES Y OBESIDAD.**

En la 12ª Reunion Internacional de Investigación en Productos naturales, celebrada en la ciudad de Xalapa, Veracruz los días 18, 19 y 20 de Mayo del 2016.



**12ª** Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales  
Xalapa, Veracruz 2016  
Homenajado  
**Dr. Miguel Ángel Domínguez Ortiz**

Dra. Noemí Waksman de Torres  
Presidenta AMIPRONAT

Dra. Mariela Vázquez Hernández  
Coordinadora de la unidad SARA

Dr. Alberto Sánchez Medina  
Coordinador del Comité Organizador

**Amipronat**  
Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales

**SARA**  
Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica

Universidad Veracruzana