BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Tesis presentada para obtener en grado de Maestría en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular

"OBTENCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS DE ORIGEN NATURAL CON ACTIVIDAD REGULADORA SOBRE LA ADIPOGÉNESIS"

PRESENTA:

I.B. MARÍA DEL ROSARIO SÁNCHEZ ROMERO.

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. IRMA FABIOLA DOMÍNGUEZ AVILÉS
Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS

DRA. NORA HILDA ROSAS MURRIETA
Centro de Química-Instituto de Ciencias, BUAP

PUEBLA, PUE., DICIEMBRE 2019

BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Irma Herrera Camacho, Dra. Maria Luisa Villareal Ortega, Dra. Paola Maycotte González y el Dr. Gerardo Santos López, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Obtención de nuevos fármacos de origen natural con actividad reguladora sobre la adipogénesis"**, que presenta la alumna **Maria del Rosario Sánchez Romero** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los tres días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve.

ATENTAMENTE

Dra. Irma Pilar Herrera Camacho

Dra. Maria Luisa Villareal Ortega

Dra. Paola Maycotte González

Dr. Gerardo Santos López

Agradecimientos

La posibilidad de cursar la Maestría en Ciencias Químicas área Bioquímica y Biología Molecular, realizar el trabajo de investigación y la redacción de esta tesis, ha sido gracias al apoyo económico y moral de muchas instituciones y personas, por ello mi agradecimiento:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los dos años de estudios.

De igual manera agradezco el apoyo y dedicación de mis directores de tesis Dra. Irma Fabiola Domínguez Avilés y Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta. A mis revisores de tesis, por el tiempo prestado y sugerencias para la mejora de este trabajo; por ello agradezco al Dra. Irma Pilar Herrera Camacho, a la Dra. María Luisa Villareal Ortega, a la Dra. Paola Maycotte González y al Dr. Gerardo Santos López.

Agradezco también a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo llegara a buen término y que no menciono en estos agradecimientos.

1. Introducción 1

2. Antecedentes 4

2.1 Obesidad 4

2.1.1 El índice de masa corporal 4

2.1.2 La obesidad en México 5

2.1.3 Mecanismos biológicos de la obesidad 5

2.1.4 Alternativas actuales, para el manejo y control de la obesidad. 6

2.2 Modelos experimentales para el estudio de la obesidad. 9

2.2.1 Modelos experimentales *in vivo* 9

2.2.2 Modelos experimentales *in vitro* 10

2.2.2.1 Línea celular 3T3-L1 11

2.3 Metabolismo lipídico 13

2.4 Tejido adiposo 15

2.4.1 Tejido adiposo marrón 15

2.4.2 Tejido adiposo blanco 16

2.4.3 Distribución del tejido adiposo 16

2.5 Adipocitos 17

2.5.1 Desarrollo y metabolismo del adipocito 17

2.5.1.1 Lipogénesis 17

2.5.1.2 Lipólisis 18

2.6 Adipogénesis 19

2.6.1 Diferenciación de los adipocitos 20

2. 7 El género *Bauhinia* 22

2.7.1. Descripción Botánica y Distribución 23

2.7. 1.1. Composición química reportada 25

2.7.1.2. Actividades Biológicas 26

3. Justificación 28

4. Planteamiento del problema 29

5. Hipótesis 30

5. Objetivos 31

6. Material y métodos 32

6.1 Cultivo y propagación de las células 3T3-L1 32

6.2 Diferenciación *in vitro* de las células 3T3-L1 32

6.3 Colecta y autentificación de especies vegetales 32

6.4 Obtención de los extractos químicos bajo condiciones controladas 33

6.4.1 Evaluación de viabilidad/ muerte por los métodos de MTT y tinción por ioduro de propidio (IP) 34

6.4.2 Determinación del contenido de lípidos totales mediante la tinción de rojo oleoso O 35

6.4.3. Determinación de Inhibición de la actividad de la lipasa pancreática (LPP) 35

6.4.4. Identificación de los compuestos presentes en el extracto activo por cromatografía liquida asociada a masa (LC/MS) 36

Resultados 38

Discusión 52

Conclusiones 54

Perspectivas 55

Referencias 56

Índice de figuras

Figura 1. Líneas celulares de ratón para estudiar el proceso de adipogénesis..... 11
Figura 2. Factores de transcripción que son efectores positivos de desarrollo del adipocito. 21
Figura 3. *Bauhinia variegata l.*..... 22
Figura 4. Ejemplares herborizados de las tres especies colectadas de *Bauhinia*..... 33
Figura 5. Identificación de las especies del género *Bauhinia*..... 38
Figura 6. Efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* en la viabilidad celular en preadipocitos y adipocitos inmaduros. 41
Figura 7. Cambios morfológicos durante la diferenciación adipocítaria de las células 3T3-L1. 42
Figura 8. Acumulación de lípidos de los adipocitos tras la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 tratadas con el extracto acuoso de *B. blakeana, B. divareigata* y *B. variegata*..... 45
Figura 9. Acumulación de lípidos de los adipocitos tras la diferenciación adipocítica de las células 3t3-l1 tratadas con el extracto etanólico de *B. Blakeana, B. Divareigata* y *B. variegata*..... 46
Figura 10. Evaluación de los extractos etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* en la muerte celular mediante la tinción con ioduro de propidio [% de confluencia de células ip y se normalizó al % de confluencia total]..... 47
Figura 11. Evaluación de los extractos acuosos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* en la muerte celular mediante la tinción con ioduro de propidio [% de confluencia de células pi y se normalizó al % de confluencia total]. 48
Figura 12. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la actividad de la lipasa pancreática por el extracto acuoso de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* 49
Figura 13. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la actividad de la lipasa pancreática por el extracto etanólico de *B. blakeana* y *B. divariegata*..... 49
Figura 14. Cromatografía líquida asociada a masas del extracto etanólico de *B. variegata*.51

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS 4
Tabla 2. Parámetros de extracción..... 34
Tabla 3. Identificación botánica 38
Tabla 4. Compuestos identificados en el extracto etanólico de *B. variegata*..... 51

Índice de abreviaturas

AGL: Ácidos grasos libres

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

DEX: Dexametasona

DIO: Obesidad Inducida por la Dieta

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

ENSANUT MC: Encuesta de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos Americanos

IBMX: Isobutilmetilxantina

IL 1-β: Interleucina 1-β

IL6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

PPARγ: Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma

TA: Tejido adiposo

TAB: Tejido adiposo blanco

TAM: Tejido adiposo marrón

TAS: Tejido adiposo subcutáneo

TAV: Tejido adiposo visceral

TG: Triglicéridos

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

Resumen

La obesidad es una de las enfermedades con mayor prevalencia en las últimas décadas, los casos de obesidad se han triplicado a nivel mundial, México ocupa el primer lugar en obesidad infantil y segundo en obesidad en adultos. La obesidad se desencadena debido a un desequilibrio calórico, lo que conduce a un aumento de tamaño y volumen de los adipocitos, y acumulación de grasa en los tejidos. La reducción del número de adipocitos al inducir apoptosis y la inhibición de la adipogénesis; o la inhibición de enzimas como las lipasas podrían ser un blanco terapéutico para reducir la obesidad y trastornos relacionados. Durante décadas, se ha investigado el potencial antiadipogénico de diversos extractos de plantas. La diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 se indujo mediante la adición de un coctel de diferenciación que contenía insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina (IBMX). El efecto sobre la acumulación de lípidos de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata,* se determinó mediante la tinción con rojo oleoso O (oil red o (Tinción ORO)). Además, se examinó si los extractos presentaban efecto sobre la inhibición de la lipasa pancreática, mediante un ensayo *in vitro* y su actividad sobre la viabilidad de los preadipocitos y adipocitos maduros. Los extractos acuosos y etanólicos de *B. divariegata* inhibieron la acumulación de lípidos de forma no dependiente de la dosis a concentraciones de 5 y 100 µg/ml respectivamente, así como una disminución en la viabilidad celular. Por otro lado, el extracto acuoso *B. variegata* mostró un porcentaje de inhibición de la lipasa de 48.19 % a la concentración de 10 µg/ml, y con el extracto etanólico de *B. blakeana* se obtuvo un porcentaje de inhibición de 43.82% a la concentración de 50 µg/ml. Estos resultados indican que los extractos tanto acuoso como etanólico de *B. divariegata* inhiben la acumulación de lípidos y posiblemente la adipogénesis. Además de que el extracto acuoso como el etanólico de *B. variegata* también muestran un efecto sobre la inhibición de la lipasa. El extracto que tiene las mejores características sobre la inhibición de la viabilidad celular de preadipocitos y adipocitos maduros, así como en la inhibición en la acumulación de lípidos fue el extracto de *B. divariegata,* lo cual lo convierte en un fuerte candidato para proseguir investigaciones sobre su mecanismo de acción en la inhibición, así como su escalamiento a modelo murino, en la búsqueda de una alternativa farmacológica en el tratamiento de la obesidad.

1. Introducción

La obesidad está caracterizada por la acumulación de grasa. Ocurre cuando la ingesta de alimentos excede los requerimientos de energía del cuerpo durante un período sostenido. El tejido adiposo es un importante regulador endócrino del metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética, y el exceso de tejido adiposo conduce a la resistencia a la insulina, lo que aumenta el riesgo de diabetes tipo 2, hiperlipidemia y enfermedad cardiovascular (1, 2).

La reducción en el contenido de grasas en la dieta combinada con un incremento en la actividad física ha mostrado un efecto positivo sobre la prevención de la obesidad. Otra opción es la cirugía bariátrica es cara y aproximadamente el 0.9 % de los pacientes son candidatos para esta cirugía (3). Los diversos fármacos antiobesidad han sido anorexigénicos que parecían ser efectivos y fueron retirados del mercado por producir reacciones adversas tales como la fenilpropanolamina, fluoxetina, lorcaserina, rimonabant y la sibutramina, ya que aumentaron el riesgo de complicaciones cardiovasculares, así como diversos efectos secundarios como cefaleas, fatiga, pérdida de memoria, somnolencia, insomnio, dificultad para concentrarse, parestesia, vértigo, anorexia y litiasis renal (4). Otro tipo de medicamento es Orlistat, un fármaco que actúa a nivel gastrointestinal para prevenir la absorción de grasas ingeridas en la dieta. El mecanismo de acción de orlistat consiste en inhibir la lipasa pancreática, enzima clave para la hidrólisis de triglicéridos. La inhibición tiene efectos adversos sobre el sistema gastrointestinal como diarrea, gases intestinales y dolor abdominal (5).

Los preadipocitos 3T3-L1 pueden diferenciarse en adipocitos en cultivo celular cuando se tratan con una mezcla inductora que incluye insulina, dexametasona e IBMX. Durante la diferenciación, cambian de morfología extendida similar a fibroblastos a una redonda con vesículas lipídicas citoplasmáticas que contienen triglicéridos (6). La diferenciación y los cambios morfológicos son el resultado de la expresión de genes específicos de adipocitos, que incluyen el receptor γ activado por el proliferador de peroxisoma γ (PPARγ), las proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBP), el factor 1 dependiente de la diferenciación/factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroles 1 (ADD1 / SREBPI) (7).

La regulación de la adipogénesis, diferenciación, proliferación y la lipolisis de adipocitos, así como la liberación de adipocinas pueden ser una vía para el tratamiento de la obesidad. La identificación de dianas moleculares adipogénicas pueden ser moduladas por factores externos como productos naturales que pueden contribuir en gran medida al tratamiento de la obesidad. Cualquier fármaco que regule estos procesos podría tener una potencial aplicación terapéutica y conferir un beneficio en la prevención y/o tratamiento de las enfermedades que engloban el síndrome metabólico.

Se han logrado avances sustanciales en el desarrollo de extractos de plantas que pueden prevenir la obesidad y contribuir con efectos beneficiosos para la salud sin ningún efecto secundario nocivo conocido. Por lo tanto, los productos naturales capaces de inhibir la adipogénesis e inducir la apoptosis de los adipocitos tendrían un gran potencial para tratar y prevenir la obesidad.

Existen diversas publicaciones que confieren actividades antiadipogénicas a ciertos compuestos como la genisteina, una isoflavona que se encuentra en las leguminosas, la cual demostró tener efectos anti-adipogénicos en células 3T3-L1 al bloquear la unión al ADN y la activación transcripcional de C/EBPβ, que a su vez inhibió la expresión de PPARγ (8). La berberina, un alcaloide que mostró actividad sobre la inhibición de PPARγ al afectar los niveles de ARNm y proteína PPARγ, así como la actividad transcripcional de PPARγ en células 3T3-L1 (9). Curcumina, un polifenol que mostró efectos anti-adipogénicos asociados con la activación de la señalización de Wnt/β en células 3T3-L1 (10). La isoquercitrina y la isorhamnetina, flavonoides activos en el extracto de *Persicaria hydropiper* inhiben la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 mediante la activación de la vía de señalización Wnt/β-catenina (11) . El resveratrol es un polifenol que desempeña un papel muy importante en el tejido adiposo, que incluye la proliferación de adipocitos, la adipogénesis, la lipólisis y la apoptosis; la baja-regulación de la adipogénesis está asociada con un incremento de expresión de ARNm de sirtuína 1 (Sirt 1), que a su vez reprime la expresión de PPARγ (12). Los ácidos linoleico conjugados, esculetina, resveratrol, quercetina, genisteína, EGCG y capsaicina indujeron apoptosis de adipocitos 3T3-L1 maduros o adultos a través de la represión en la fosforilación de ERK1/2 y la activación de la vía mitocondrial (13). También se ha demostrado que el extracto de *Momordica charantia*

(melón amargo) estimula la absorción de glucosa en células L6 de una manera similar a la insulina. Además, demostró ser capaz de mejorar la captación de glucosa en concentraciones óptimas de insulina en adipocitos 3T3-L1, que estuvo acompañada por un aumento en la secreción de la adiponectina (14).

En el presente estudio, se evaluó el efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *Bauhinia blakeana*, *Bauhinia divariegata* y *Bauhinia variegata*, sobre la inhibición del proceso adipogénico, así como sobre la muerte celular post confluentes en adipocitos maduros para determinar si alguno de estos extractos disminuye el número de células y la acumulación de lípidos en adipocitos. Así mismo, se evaluó el efecto sobre la lipasa pancreática, para determinar si podía tener un efecto farmacológico dual, esto es, sobre la adipogénesis y sobre los alimentos altos en grasas que se ingieren, al inducir su absorción. Actualmente no existen en el mercado fármacos antiadipogénicos pero si inhibidores de la lipasa pancreática y en este caso, se evaluó contra el mejor fármaco en el mercado, el Orlistat.

El género *Bauhinia* (*Leguminose, Fabaceae)*, conocida como pata de vaca o pata de cabra, comprende aproximadamente 300 especies que se encuentran en las regiones tropicales del planeta (15). Además de su actividad hipoglucémica, se le atribuyen actividades antioxidantes y hepatoprotectoras. Se ha demostrado la actividad hepatoprotectora para *Bauhinia forficata*, *Bauhinia racemosa Lam* y *Bauhinia variegata* (16) (17, 18). Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los extractos de *Bahuinia* spp sobre la inhibición del proceso adipogénico, la viabilidad adipocitaria, la muerte celular y la inhibición de la lipasa pancreática.

2. Antecedentes

2.1 Obesidad

La Organización Mundial de la Salud define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que es perjudicial para la salud (19). Se caracteriza por un desbalance de energía, que ocurre cuando la ingesta calórica excede el gasto energético, generando un aumento en la acumulación de grasa corporal y, en consecuencia, del peso corporal (20). La acumulación excesiva de lípidos tiene efectos adversos sobre la salud, como la diabetes mellitus tipo II (DM2), hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer y osteoartritis (21). La localización de la acumulación de grasa en la región abdominal y visceral se relaciona con este conjunto de anomalías y se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades (22, 23).

2.1.1 El índice de masa corporal

La clasificación mundial de la obesidad propuesta por la OMS está basada en el índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet, el cual se determina con el peso corporal expresado en kilogramos y el cuadrado de la altura, expresada en metros (24). Las personas que presenten un IMC igual o mayor a 30 kg/m2 son consideran obesas (Tabla 1) (19). El IMC se interpreta como una medida de la forma en que la masa del individuo se distribuye por unidad de área corporal (25).

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS

Clasificación	**IMC (kg/m^2)**
Normo peso	18.5-24.9
Exceso de peso	≥ 25
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad grado I (Moderada)	**30-34.9**
Obesidad grado II (Severa)	**35-39.9**
Obesidad grado III (Mórbida)	**≥40**

Tomada y modificada de (25).

Se considera sano, a un hombre adulto que presenta un porcentaje de grasa en un rango del 15-20% del peso corporal total, y las mujeres sanas, entre el 25-30% del peso corporal total. Las mujeres tienen una mejor distribución de la grasa corporal que los hombres, debido a que gran parte de la grasa se distribuye en comportamientos subcutáneos y periféricos como mamas, glúteos y muslos, mientras que en hombres el exceso de grasa tiende acumularse en el abdomen, tanto grasa subcutánea como intraabdominal (24).

2.1.2 La obesidad en México

La obesidad es un problema de salud pública que ha aumentado en los últimos años en todo el mundo. La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en México de acuerdo con la Encuesta de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC), en la población de edad escolar (5-11 años) fue de 33.2%. La prevalencia de sobrepeso fue de 17.9% y obesidad de 15.3%. Se observó una mayor prevalencia de obesidad en los niños de 18.3% en comparación con las niñas con 12.2%. En adolescentes (12-19 años) fue de 36.3%; la prevalencia de sobrepeso fue de 22.4% y de obesidad de 13.9%, el sobrepeso en las mujeres fue mayor con 26.4% al observado en los hombres de 18.5%. La obesidad en adultos de 20 o más años la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 72.5%, la prevalencia de sobrepeso es mayor en mujeres con 75.6% que en los hombres 69.4%; y la prevalencia de obesidad es más alta en mujeres con 38.6% que en hombres con 27.7%; la obesidad mórbida es 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres. Estas cifras mantienen a México entre los países con mayor número de adultos con sobrepeso u obesidad (26).

2.1.3 Mecanismos biológicos de la obesidad

La obesidad es el resultado del desequilibrio entre el consumo y el aporte de energía, la energía que el organismo requiere proviene de carbohidratos, proteínas y grasas. La capacidad de almacenar carbohidratos en forma de glucógeno es limitada. Los depósitos de grasa son capaces de expandirse con facilidad para dar cabida a niveles de almacenamiento superiores a los necesarios. Los alimentos que no se consumen como energía, se almacenan en forma de grasa y dan origen a la obesidad. Los carbohidratos son el principal suministro de energía, cuando el consumo de carbohidratos excede los requerimientos, estos se convierten en grasa. En ausencia o con niveles muy bajos de glúcidos, las proteínas, a través de los aminoácidos, son utilizados para producción de energía o para la movilización de

energía, utilización y almacenamiento de lípidos, glucogénesis, en el cual los aminoácidos son convertidos, por múltiples reacciones, en piruvato que deriva en glucosa; esta glucosa formada es oxidada para la formación de triglicéridos (TG) mediante su conversión a glicerol. Las grasas que se ingieren son utilizadas principalmente como fuente de almacenamiento en forma de TG en los adipocitos, o para la producción de hormonas y sus componentes celulares. Cuando los almacenes primarios de energía agotan sus reservas, son las grasas las encargadas de suministrar en energía y se movilizan, proceso en el cual las proteínas participan activamente (27).

La obesidad está relacionada con la resistencia a la insulina y un estado de inflamación de bajo grado caracterizado por una elevación de citocinas proinflamatorias en sangre y los tejidos (28). Los ácidos grasos libres (AGL) aumentan en la obesidad y esto representa un factor importante para la asociación entre la obesidad y la DM2; los AGL pueden inducir la resistencia a la insulina, inhibir la producción y liberación de insulina de las células beta pancreáticas (29).

2.1.4 Alternativas actuales, para el manejo y control de la obesidad.

Existen varias alternativas y estrategias para el tratamiento de la obesidad han mostrado ser efectivo en la prevención de la obesidad.

1. Las modificaciones del estilo de vida requieren autodisciplina, persistencia para garantizar y mantener la pérdida de peso (30).
2. La banda gástrica es cara y aproximadamente sólo el 1% de los pacientes son candidatos a esta cirugía (31).
3. En el ámbito del tratamiento farmacológico, los principales blancos terapéuticos han sido anorexigénicos, la inducción de la saciedad a través de gomas y/o mucílagos y aquellos fármacos que reducen la absorción de grasas a través de la inhibición de la lipasa pancreática (30).

Los medicamentos efectivos y seguros que han sido autorizados para el tratamiento de la obesidad por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos Americanos (FDA, *Food and Drug Administration*), son cinco: Orlistat (xenical), fentermina/topiramato (Adipex-P), Liraglutida (Saxenda), Lorcaserina (Belviq), y

naltrexona/bupropion. Sin embargo, las monoterapias presentan una eficiencia limitada, debido la activación de vías alternativas y contra reguladoras. De acuerdo a la Endocrine Society, estos medicamentos están indicados para uso a largo plazo en pacientes con IMC ≥ 30 kg/m^2, o para aquellos con IMC ≥ 27 kg/m^2 que presente alguna comorbilidad asociada como DM2, dislipidemia o hipertensión arterial sistémica Dicha organización recomienda la suspensión y cambio de tratamiento en caso de que los pacientes no disminuyan al menos 5% de peso a las 12 semanas. En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) únicamente ha aprobado el orlistat y la liraglutida para el tratamiento contra la obesidad (30) (32).

En 1999, la FDA aprobó el **Orlistat** como un fármaco coadyuvante en el tratamiento de la obesidad, en 2006 este se convirtió en el único fármaco de venta libre. Orlistat es un inhibidor de la lipasa gastrointestinal y pancreática que impide la adsorción de aproximadamente el 30% de la grasa proveniente de la dieta, en promedio reduce el peso alrededor de 3 kg y disminuye la progresión a DM2 en pacientes de alto riesgo; los efectos adversos son gastrointestinales: heces grasas y aceitosas, e incontinencia fecal (33).

En 2012 la FDA aprobó la combinación de **fentermina/topiramato** para el tratamiento de la obesidad. En los Estados Unidos América ambos son comercializados en una sola tableta de liberación prolongada, en México se comercializan por separado. La fentermina es un estimulante del sistema nervioso central, que aumenta la liberación de catecolaminas y disminuye el apetito (efecto anorexigénico); este medicamento está contraindicado en pacientes con hipertensión, cardiopatía isquémica, hipertiroidismo y arritmias cardiacas. El topiramato es un inhibidor de los canales de sodio y potenciador del ácido gamma-aminobutírico (GABA), empleado como anticonvulsivo y como profilaxis para la migraña; su mecanismo, aunque no es muy claro respecto a la pérdida de peso, se plantea que tiene un efecto anorexigénico, modulando el comportamiento y disminuyendo las conductas compulsivas que aumentan la ingesta calórica. Los principales efectos adversos son parestesias, boca seca, constipación, disgeusia, insomnio y mareo (32).

La **liraglutida** es un análogo del péptido similar al glucagón, que forma parte de la familia de las incretinas, que en primera instancia fueron utilizados como fármacos antidiabéticos, su uso se asocia a la disminución de la progresión de la diabetes y mejora los parámetros

como albuminuria, las concentraciones séricas de insulina, los TG y la glucosa en ayuno. Las incretinas son responsables de la liberación postprandial de la insulina por parte de las células beta pancreáticas, así como de la inhibición de la liberación de glucagón por parte de las células alfa. El mecanismo de acción es mixto ya que regula el apetito a nivel del sistema nervioso central y por otro lado retrasa el vaciamiento gástrico, causando saciedad. Los efectos adversos más comunes que presenta el uso de liraglutida son náuseas, diarrea, constipación y vomito (32).

2.2 Modelos experimentales para el estudio de la obesidad.

Se emplean diversos modelos celulares para estudiar las vías moleculares de la obesidad tanto *in vitro* como *in vivo.* Los modelos celulares se clasifican en dos grupos, el primero incluye fibroblastos pluripotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares, que incluyen miocitos, condrocitos y adipocitos (7). Los modelos animales más ampliamente utilizados son las ratas o los ratones, en donde para producir el modelo de obesidad se emplean diferentes técnicas como la lesión ventromedial hipotalámica, por administración de glutamato monosódico o por lesión eléctrica directa, alimentación con dietas hipercalóricas o manipulación genética (34).

2.2.1 Modelos experimentales *in vivo*

Los modelos animales de obesidad son pequeños roedores (ratas o ratones), que difieren ampliamente en tipo y grado de obesidad. Los modelos animales de obesidad más utilizados son animales con mutaciones espontáneas como el ratón ob /ob deficiente en leptina o el ratón db/db deficiente en receptor de leptina (con defectos en el sistema de señalización), los inducidos por un dieta alta en grasas, animales genéticamente modificados (ratones con interrupción del gen 4 de melanocortina) o mecanismos de intervención (lesión química del hipotálamo ventromedial) (35).

Los modelos de obesidad inducidos por la dieta (DIO) se emplean para estudiar las causas poligénicas de la obesidad. La obesidad que presentan los animales DIO es semejante a la obesidad en humanos que la mayoría de los modelos modificados genéticamente y podrían ser la mejor opción para evaluación terapéutica. Los modelos transgénicos o los modelos con mutaciones espontáneas pueden emplearse para la evaluación de un posible tratamiento terapéutico y determinar si se compromete con un blanco celular específico o vía de señalización *in vivo,* además de que se pueden utilizar para explorar el papel de objetivos moleculares específicos y en vías fisiológicas relacionadas con la ingesta de alimentos y su papel potencial en la obesidad (36).

Los modelos con alguna modificación en la vía de señalización de leptina en el hipotálamo desarrollan un fenotipo con obesidad mórbida. Los modelos incluyen animales que carecen de producción de leptina y/o que son insensibles a la leptina debido a mutaciones del receptor de leptina. Las mutaciones son espontáneas o genéticamente modificadas. El ratón ob /ob

(Lep ob/Lepo b) sufre una mutación espontanea que conduce al fenotipo notable de la obesidad, este modelo ha sido reconocido desde la década de 1950. Una mutación espontánea de una sola base del gen ob impide la secreción de leptina bioactiva ya que la síntesis de la leptina termina prematuramente. La leptina es sintetizada principalmente en los adipocitos blancos y su secreción es directamente proporcional a la cantidad de TG almacenados. La deficiencia de leptina conduce a un fenotipo que se caracteriza por hiperfagia, gasto energético reducido e hipotermia, hipercorticosteroemia, resistencia a la insulina que se asocia con hiperglucemia e hiperinsulinemia, hipotiroidismo y deficiencia de la hormona del crecimiento. Los ratones ob/ob son infértiles (36).

2.2.2 Modelos experimentales *in vitro*

Los modelos celulares para estudiar la adipogénesis y la función de los adipocitos *in vitro* se clasifican en dos grupos. El primer grupo incluye fibroblastos pluripotentes que tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células, incluyendo los miocitos, los condrocitos y los adipocitos. Esta clase incluye a las líneas celulares de fibroblastos **10T1/2**, **BALB/c-3T3**, **RCJ3.1** y **CHEF/18**. El segundo grupo comprende preadipocitos similares a los fibroblastos que se comprometen a diferenciarse en adipocitos maduros e incluyen preadipocitos **3T3-L1**, **3T3-F422A**, **1246**, **Ob1771**, **TA1** y **30A5**. Este segundo grupo es el más empleado para estudiar la adipogénesis (7).

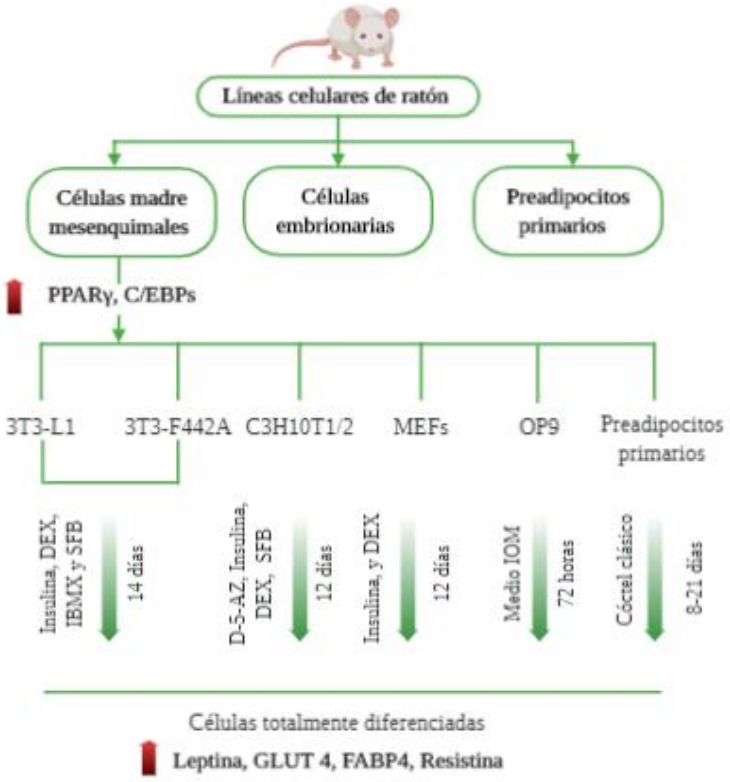

Figura 1. Líneas celulares de ratón para estudiar el proceso de adipogénesis.
Tomada y modificada de (36).

2.2.2.1 Línea celular 3T3-L1

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 fue desarrollada originalmente por expansión clonal, esta línea se deriva de embriones de ratón suizo 3T3 de 17 a 19 días de edad, debido a su potencial para diferenciarse de fibroblastos a adipocitos. Cuando las células entran en un estado de reposo acumulan grasa y se convierten en adipocitos (37) (38). Para diferenciar las células 3T3-L1 de su fenotipo fibroblástico a adipocitos maduros, se requiere de un coctel suplementado con glucocorticoides y hormonas para inducir la adipogénesis. Los agentes más empleados son la insulina (1µg / ml,) la dexametasona (DEX) (0.25 µM) y la isobutilmetilxantina (IBMX) (0.5 mM). Aproximadamente 4 días después de agregar el coctel, las células comienzan acumular lípidos en forma de gotas que crecen en número y tamaño con el tiempo (37). Esta línea celular se prefiere porque desarrolla poblaciones

homogéneas de adipocitos maduros morfológicamente y bioquímicamente similares a los adipocitos *in situ* (7).

2.3 Metabolismo lipídico

Los lípidos son esenciales para mantener la homeostasis energética, la fisiología reproductiva y orgánica, también están vinculados a diferentes procesos patológicos, como la obesidad, la DM2, las enfermedades cardíacas y la inflamación. Diferentes tipos de tejidos requieren una demanda de lípidos, el cuerpo humano ha desarrollado un sistema de transporte de lipoproteínas para administrar colesterol y ácidos grasos a la periferia. Las lipoproteínas están compuestas de TG, ésteres de colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas, que modulan el catabolismo de las lipoproteínas. En el sistema de transporte directo, las lipoproteínas de muy baja densidad ricas en TG (VLDL) liberadas por el hígado entregan ácidos grasos a los adipocitos para su almacenamiento y al músculo cardíaco y esquelético para el consumo de energía. La lipoproteína lipasa (LPL) es secretada por el adipocito, el músculo y los macrófagos, quienes son los encargados de liberar ácidos grasos VLDL y su posterior transformación en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL ricas en ésteres de colesterol, son las encargadas de entregar colesterol en los tejidos periféricos para la esteroidogénesis y mantener la integridad de la membrana celular. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) transportan el exceso de colesterol de las células extrahepáticas (39).

La principal reserva de energía en los mamíferos consiste en la grasa almacenada en el tejido adiposo (TA). Cuando se presenta un consumo excesivo de energía, los lípidos de la dieta son absorbidos por los adipocitos en el TA y esterificados en TG, que se almacenan en gotitas de lípidos en el citoplasma. Cuando se requiere la movilización de las reservas de energía endógenas, en condiciones de ayuno y actividad física, los TG se hidrolizan a través de la lipólisis y se liberan a la circulación como AGL, los cuales se entregan a los tejidos periféricos donde son empleados como sustrato para la β oxidación y la producción de adenosín trifosfato (ATP). Los adipocitos son los únicos capaces de secretar AGL a la circulación (40).

Alteraciones en la lipogénesis y la lipólisis, son mecanismos importantes involucrados en la regulación del almacenamiento de TG, que están estrechamente asociadas con la obesidad. La vía de la lipogénesis se ve influenciada por el suministro de ácidos grasos – coenzima A o glicerol fosfato, o por la actividad de enzimas en las etapas posteriores de la síntesis de TG. La fosforilación del glicerol por la glicerol cinasa (GyK) y la gluconeogénesis están

involucradas en la disponibilidad de fosfato de glicerol. Un paso regulador de la gluconeogénesis es la conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato, catalizado por la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK). La desregulación de PEPCK podría influir en la deposición de lípidos y contribuir a la obesidad y la DM2 (41).

2.4 Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es un órgano dinámico que lleva a cabo varios procesos fisiológicos importantes. El TA es el órgano más variable del cuerpo, el TA de un paciente delgado representa sólo un pequeño porcentaje de la masa corporal, mientras que en pacientes obesos puede representar más del 50% de la masa total del cuerpo. El papel principal del TA es el almacenamiento del exceso de energía, es reconocido como un órgano endócrino (42). En el organismo, los lípidos se almacenan en dos tipos de TA: el tejido adiposo blanco (**TAB**) y el tejido adiposo marrón (**TAM**) (43). El TA se desarrolla en el feto durante el segundo trimestre. El TA subcutáneo se desarrolla antes que el TA intrabdominal (**ATI**) y el TAM se desarrolla antes que el TAB. Los adipocitos son los encargados de almacenar lípidos dentro de TA. El depósito de grasa primario se encuentra en el tejido subcutáneo del cuerpo. La capacidad de las células de grasa subcutáneas para absorber una gran cantidad de lípidos actúa como amortiguador para evitar que la grasa se acumule en lugares donde las consecuencias metabólicas son más impactantes (42).

El almacenamiento intraabdominal de TAB se asocia con una mayor incidencia de resistencia a la insulina y a enfermedades metabólicas como la DM2. Los depósitos adiposos son heterogéneos, con diferentes ubicaciones que tienen diferentes composiciones. El TA está altamente estructurado y contiene varios tipos celulares que incluyen preadipocitos, adipocitos (blancos, marrones y beige), macrófagos residentes en el TA y reclutados por hipoxia y otros por estimulación, matriz extracelular y vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nerviosos. El TA es un gran reservorio de células madre mesenquimales que son progenitoras de múltiples líneas celulares (42).

2.4.1 Tejido adiposo marrón

El TAM está formado por adipocitos marrones que son altamente oxidativos. Se han identificado áreas en el cuerpo que tienen una concentración de TAM. Los adipocitos marrones presentan una abundancia de mitocondrias. Las mitocondrias son los orgánulos centrales de una célula que metabolizan los ácidos grasos para producir energía. Los adipocitos marrones son los únicos que contienen la proteína de desacoplamiento especifica 1 (UCP-1), proteína encargada del acoplamiento de la cadena respiratoria a la ATP sintetasa, permitiendo de esta forma la generación de calor, mediante la termogénesis (43) (42).

2.4.2 Tejido adiposo blanco

Los adipocitos blancos forman el componente principal del TAB. La función del adipocito blanco es almacenar triglicéridos que pueden ser movilizados como energía durante los períodos de ayuno y producir hormonas proteicas que influyen en el metabolismo. El número de adipocitos se establece durante la infancia y la adolescencia temprana (42). El TAB es el principal tejido de almacenamiento de energía del organismo, además de que cumple una función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales. Se había considerado un tejido inerte, pero hoy se sabe que es altamente dinámico ya que es capaz de sintetizar y secretar numerosos factores, no solo lipídicos sino también proteicos, que intervienen en procesos fisiológicos y metabólicos (43).

Los adipocitos pueden aumentar en número (hiperplasia) sin embargo, la mayor parte del aumento en el TA proviene del almacenamiento en exceso de lípidos dentro del adipocito (hipertrofia), la capacidad del TAB subcutáneo para aumentar la hiperplasia e hipertrofia amortigua otros órganos para almacenamiento de grasa ectópica, esto provoca el almacenamiento en ubicaciones ectópicas y lipólisis continua. Los adipocitos blancos pueden ser remodelados bajo ciertos estímulos para transformarse en un fenotipo más oxidativo que se asemeje a los adipocitos marrones, a esto se conoce como pardeamiento. Este pardeamiento de los adipocitos blancos da como resultado la formación de los adipocitos BRITE también llamados beige. Los adipocitos beige comparten linaje con los adipocitos marrones y generan energía térmica, se estimulan en respuesta al frío, el ejercicio y el lactato. El pardeamiento del TAB puede ser una respuesta al lactato producido por el estrés oxidativo pero cuando el estímulo se detiene la célula vuelve a ser adipocito blanco (42).

2.4.3 Distribución del tejido adiposo

La distribución del TA en el cuerpo se refiere a la cantidad relativa de grasa almacenada. El TA localizado entre la dermis y la aponeurosis y fascia de los músculos donde se incluye el tejido mamario, se llama tejido adiposo subcutáneo (TAS), mientras que el que se ubica en el interior del tórax, abdomen y pelvis se denomina tejido adiposo visceral (TAV) (43). El TAV se caracteriza por tener una concentración alta de adrenoreceptores β, que aumentan la sensibilidad a catecolaminas, la estimulación de estos receptores favorece la lipólisis, generando una liberación de ácidos grasos libres del TAV al hígado. El TAV presenta

receptores afines a andrógenos y estrógenos. En hombres, la tetosterona inhibe la actividad de la lipasa lipoproteica y estimula la movilización de TG en el TAV, lo cual genera menor acumulación de este tejido. En mujeres, los estrógenos tienen control sobre la lipasa lipoproteica y reducen el crecimiento del TAV, lo que sugiere que una disminución de la secreción de las hormonas sexuales favorece la acumulación del TAV (7).

2.5 Adipocitos

Existen tres tipos de adipocitos de acuerdo al color del TA: blancos, marrones o beige. La función principal de los adipocitos blancos es almacenar energía y la de los adipocitos marrones es disipar energía durante la termogénesis. La función de los adipocitos beige es menos clara (44).

Los adipocitos del TAB contienen una gran gota lipídica que ocupa el 90% del volumen celular, el citoplasma y un número limitado de orgánulos ocupan el resto de los espacios periféricos. Los lípidos representan el 60-85% del peso total del tejido adiposo blanco, del cual el 90-99% se compone de TG (45). Los adipocitos tienen tres funciones importantes dar sensibilidad a la insulina, almacenar lípidos y secretar hormonas que actúan en tejidos distantes. Las hormonas que se producen exclusivamente en los adipocitos son la leptina y la adiponectina, las cuales tienen varias funciones entre ellas destacan la regulación de la ingesta de alimentos y la modulación de la sensibilidad a la insulina (44).

2.5.1 Desarrollo y metabolismo del adipocito

La obesidad se presenta como una acumulación excesiva de TAB, un órgano que se compone principalmente de adipocitos blancos, la expansión del TAB se asocia con hiperplasia, que es el aumento en el número de adipocitos o hipertrofia, un aumento en el tamaño de los adipocitos. La hipertrofia sin hiperplasia genera adipocitos que no son metabólicamente saludables. El aumento en el número de adipocitos se genera por la activación de vías biológicas que favorecen la diferenciación de los adipocitos, es decir, la formación de adipocitos a partir de células precursoras (44).

2.5.1.1 Lipogénesis

La síntesis de TG es un proceso crucial y estrictamente regulado que ocurre principalmente en el TA, pero también en el hígado, músculos, corazón y páncreas. La lipogénesis es la

reacción bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos de cadena larga esterificados (unidos con el glicerol) para formar TG o grasas de reserva. Esta vía del TA se utiliza para mantener y controlar la homeostasis energética mediante una comunicación continua entre los tejidos oxidativos y los órganos periféricos (46). La lipogénesis *de novo* ocurre tanto en el hígado como en el TA y es estimulada principalmente por las dietas altas en carbohidratos y grasas. Estos ácidos grasos se incorporan a los TG para el almacenamiento de energía. Es importante destacar que la síntesis hepática de TG después de una alta carga de carbohidratos puede conducir a un aumento en la síntesis y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL ingresan a circulación y los TG pueden sufrir hidrólisis dentro de TA y el músculo principalmente. Los AGL pueden reesterificarse y almacenarse como TG o pueden oxidarse para obtener energía (47).

El proceso de esterificación de ácidos grasos en TG implica la transformación de AGL en Acetil-CoA a través de la formación de monoacilglicerol (MAG) y diacilglicerol (DAG) al reaccionar con glicerol-3-fosfato (G3P). Las hormonas que controlan la lipogénesis incluyen la insulina que estimula la síntesis de lípidos y la adipogénesis, mientras que el glucagón y las catecolaminas promueven la fosforilación de acetil-CoA carboxilasa (ACC) e inhiben la síntesis de ácidos grasos. Las fuentes de G3P y Acetil-CoA son glicerol en plasma y AGL, estos sustratos se pueden sintetizar *de novo* (46).

2.5.1.2 Lipólisis

La lipólisis es el proceso catabólico que permite la movilización de lípidos que constituyen la reserva de combustibles en el TA hacia los tejidos periféricos para cubrir las necesidades energéticas del organismo. Mediante la lipólisis los TG son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol. La vía lipolítica está estrechamente regulada por factores hormonales y nutricionales. Cuando las condiciones de equilibrio energético son negativas, como el ayuno y el ejercicio, la lipólisis produce un aumento en la liberación de AGL del tejido adiposo. Esta respuesta es crucial para proporcionar al organismo un suministro suficiente de sustrato para el metabolismo oxidativo (48, 49). La lipólisis en el TA es crucial para el mantenimiento de la homeostasis energética (40). En la obesidad se presenta un incremento en la lipolisis que da como resultado un aumento en la liberación de ácidos grasos libres (AGL). Este incremento intracelular de ácidos grasos y diacilglicerol (DAG) activan a la proteína cinasa

C (PKC), proteína involucrada en la inhibición de las señales intracelulares de la insulina, por medio de la fosforilación del receptor del sustrato de insulina tipo 1 y 2 (IRS-1/2) (50). Esto inhibe la actividad de la vía IRS / PI3 cinasa / Akt que controlan el metabolismo de la insulina, incluída la absorción de glucosa, la síntesis de glucógeno, la glucogenólisis y la lipólisis. Esta vía también es importante para la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial y la producción de óxido nítrico. Los AGL pueden reducir la producción de óxido nítrico a través de un segundo mecanismo mediante la estimulación de la NAD (P) H oxidasa y conducirá a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de óxido nítrico (28). Estos cambios son dañinos para las células endoteliales ya que disminuyen la vasodilatación e incrementan la hipertensión. Los AGL intracelulares activan vías de señalización relacionadas con la inflamación como la vía NFκB y c-Jun N-terminal cinasa tipo 1 (JNK-1), lo que resulta en una mayor expresión hepática de citocinas proinflamatorias que incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), Interleucina 1-β (IL 1-β), Interleucina 6 (IL6) y el aumento de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). El aumento de niveles plasmáticos de MCP-1 da como resultado el reclutamiento de macrófagos en los sitios de inflamación, por lo tanto, se explica la infiltración de macrófagos en el TA (28).

Los datos descritos, demuestran que la grasa abdominal desarrolla una mayor actividad lipolítica y su acumulación ocasiona una serie de alteraciones sobre hígado, músculo esquelético, páncreas, endotelio y miocardio con sus respectivas consecuencias, teniendo así un impacto devastador, por las grandes pérdidas en años de vida saludable, calidad de vida, incapacidad laboral, costos económicos, sociales y familiares.

2.6 Adipogénesis

El proceso de adipogénesis implica cambios en la morfología celular de los preadipocitos donde se aumentan la síntesis y acumulación de lípidos hasta un adipocito maduro. La adipogénesis se describe como un proceso de dos etapas que incluye la proliferación y diferenciación celular, lo que resulta en un aumento de la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. La primera etapa es la determinación, los preadipocitos proliferan a través de la activación de la vía de señalización Akt y ERK, esta etapa da como resultado la conversión de células madre en preadipocitos. La segunda etapa es la diferenciación terminal, los

preadipocitos adquieren las características del adipocito maduro; adquieren la maquinaria necesaria para el transporte y síntesis de lípidos, la acción de la insulina y la secreción de proteínas específicas de los adipocitos maduros. La diferenciación requiere de la activación de factores de transcripción que son responsables de la inducción coordinada y el silenciamiento de más de 2, 000 genes relacionados con la regulación del adipocito, tanto morfológicamente como fisiológicamente (51).

2.6.1 Diferenciación de los adipocitos

La diferenciación de adipocitos terminales implica una serie de procesos transcripcionales. La primera etapa de la adipogénesis, que es la diferenciación temprana consiste en la inducción transitoria de C/EBP-β y C/EBP- δ, que es estimulada *in vitro* por el coctel de diferenciación hormonal. C/EBP-β y C/EBP- δ comienzan a acumularse dentro de las 24 h después de la inducción de la adipogénesis y las células retoman el ciclo celular. En la conversión de la etapa G1 a S C/EBP-β se hiperfosforila y se activa secuencialmente por la glucógeno sintasa cinasa-3β y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), esta etapa incluye la activación de miembros de la familia de los factores de transcripción de la proteína 1 activadora (AP-1). Luego, tanto C/EBP-β como C/EBP- δ inducen directamente la expresión de PPARγ y C/EBP-α, factores clave proadipogénicos críticos. PPARγ y C/EBP-α inician la retroalimentación positiva para inducir su propia expresión y activan un gran número genes diana cuya expresión determina al adipocito. En el día dos del curso de la diferenciación la proteína C/EBP-α comienza a acumularse y es fosforilada por la ciclina D3, induciendo un efecto de inhibición de la proliferación en las células, lo que permite comenzar la fase de diferenciación final de la adipogénesis. Para el día 8 después de la diferenciación, más del 90% de los adipocitos ya están maduros (51). Otros factores de transcripción involucrados que facilitan la maduración de los adipocitos incluyen a los STAT, los miembros de la familia de las proteínas KLF y la proteína de unión al elemento de respuesta al esterol 1 (SREBP-19). Los principales represores negativos de la diferenciación de adipocitos incluyen al factor preadipocito-1 (Pref-1) y miembros de las familias GATA y Wnt (43) (Figura 2).

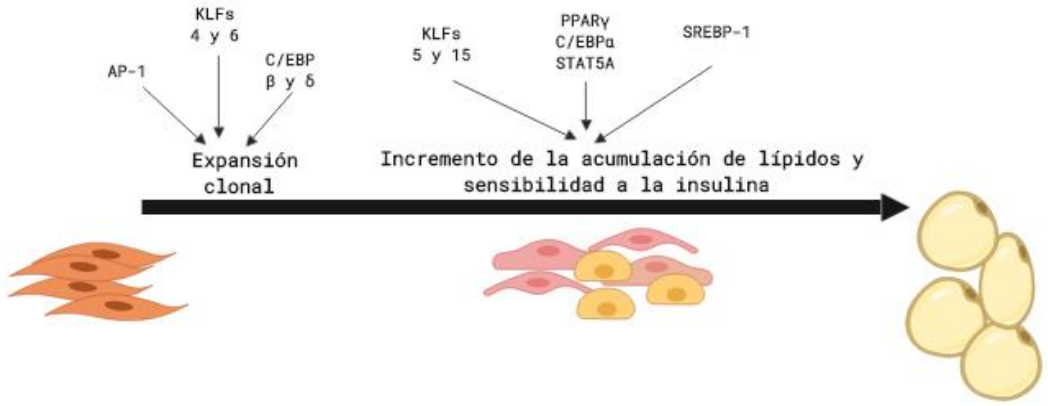

Figura 2. Factores de transcripción que son efectores positivos de desarrollo del adipocito.
Tomada y modificada de (43).

2. 7 El género *Bauhinia*

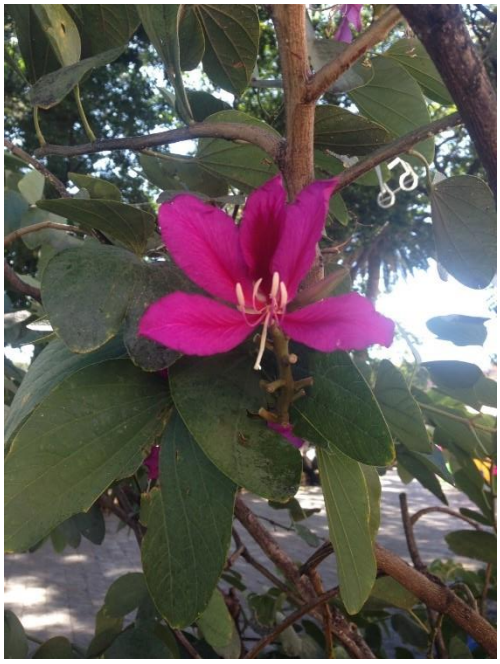

Figura 3. *Bauhinia variegata* L.
Tomada por María del Rosario Sánchez Romero.

El género *Bauhinia* comprende cerca de 300-500 especies de arbustos y pequeños árboles de regiones tropicales. Es una de las familias botánicas de mayor interés debido a que tiene una amplia aplicación en la medicina tradicional que comprenden cerca de 18, 000 especies en dividida en 619 géneros y cuatro subfamilias: *Caesalpinioideae, Cercideae, Faboideae, Mimosoideae* (52). Las especies de este género se utilizan en la medicina tradicional en diversas regiones del mundo, como África, Asia y América central y del sur, en el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se destacan el uso como astringente, analgésico, antimicrobiano, antioxidante, antiparasitario, antirreumático, hipocolesterolémico, diurético, antídoto para venenos y picaduras de escorpión, así como contra el asma, trastornos gastrointestinales, úlceras y heridas, dolor e inflamación, y especialmente diabetes. En la literatura la acción hipoglucémica se encuentra entre todas las acciones terapéuticas reportadas del género *Bauhinia* (52).

2.7.1. Descripción botánica y distribución

El género *Bauhinia* se reconoce con facilidad por sus hojas enteras, bilobadas o bifolioladas; las flores tienen el cáliz espatáceo y los pétalos unguiculados de color blanco, rojo, violeta, verde, amarillo y rosado. Las especies de *Bauhinia* tienen un importante potencial ornamental por lo atractivo de sus flores y también se les atribuyen propiedades medicinales, alimenticias y maderables (53).

Bauhinia variegata Linn. (*Ceasalpiniaceae*) es un árbol caducifolio de tamaño pequeño a mediano con un tronco corto y una copa que se extiende, alcanza una altura de 15 m y un diámetro de 50 cm. En bosques secos el tamaño es más pequeño. La corteza es gris parduzco claro, liso a ligeramente fisurado y escamoso. La corteza interna es rosada, fibrosa y amarga. Las ramas son delgadas, cuando es joven verde claro, ligeramente velluda y angulosa, y se vuelve gris parduzco. Las hojas tienen estípulas diminutas de 1-2 mm, pecíolo puberuloso a glabro, lámina ampliamente ovalada a circular, más ancha que larga de 6-16 cm de diámetro; 11-13 nervios; puntas de los lóbulos ampliamente redondeadas, base cordada. Las flores no están ramificadas en los extremos de la rama, tienen tallos cortos y gruesos, y un tubo basal verde y estrecho similar a un tallo. El cáliz de color verde claro y bastante velludo forma un brote puntiagudo y se abre por un lado permaneciendo unido; los pétalos ligeramente desiguales, ondulados con márgenes y estrechos a la base; estambres curvos; pistilo muy delgado, acechado, curvado, con ovario estrecho, verde, unicelular, estilo y estigma punteado. Vainas dehiscentes, en forma de correa, oblicuamente estriadas, larga, dura, y planas (54).

Bauhinia blakeana es un pequeño árbol de floración de hoja perenne a semiperenne a menudo de múltiples troncos con forma de paraguas con una corona redondeada irregular. Por lo general, crece hasta 6 m de altura, pero ocasionalmente en condiciones óptimas hasta 12 m de altura. Este híbrido no tiene territorio nativo como tal porque sólo se lo conoce hoy en día a partir de árboles propagados de un solo híbrido accidental descubierto en la naturaleza y recolectado en 1880 cerca de las ruinas de una casa a lo largo de la costa de la isla de Hong Kong, cerca de Pok Fu Lam. Las flores rosas rosadas a rosa carmesí de 12-15 cm de ancho, son flores parecidas a las orquídeas, con venas más pálidas, florecen durante un largo período tardío de otoño a primavera. Cada flor tiene una corola de 5 pétalos con el pétalo superior

más oscuro hacia la base. Las flores tienen forma de algunas orquídeas. Las flores de este híbrido son más grandes que las flores de las especies vegetales. Las hojas bilobuladas de color verde claro a medio tienen venas de color verde amarillento. Las hojas son profundamente hendidas en el ápice y la base, produciendo un efecto de doble hoja. Los árboles son parcialmente caducifolios (55).

2.7. 1.1. Composición química reportada

Las propiedades biológicas del género *Bauhinia* son atribuidos a los componentes fenólicos. La fitoquímica de Bauhinia reveló la presencia de compuestos como lupeol tetracíclico, betulina, β-sitosterol y tetracíclico 2,2-dimetil cromano, los cuales fueron aislados de las raíces. La corteza del tallo reveló la presencia de alcaloides, glucósidos, carbohidratos, saponinas, flavonoides, triterpenoides (β-amirina), antroquinonas, esteroides (β-sitosterol), estilbeno (resveratrol) (56). De acuerdo a esto, *Bauhinia forficata* subsp. *Pruinosa* es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) por acción de flavonoides específicamente derivados de quercetina y kaempferol. Estas características pueden ser importantes en enfermedades en donde hay un aumento en el estrés oxidativo, como la DM2 y sus complicaciones (57).

El extracto de corteza de tallo de *B. variegata*, contiene 5,7 dihidroxi y 5,7-dimetoxi flavanona-4-O-α-L- ramnopiranosil-β-D-glucopiranosidos, Kaempferol-3-glucósido, lupeol y betasitosterol. El tallo produce sitosterol, lupeol, kaempferol-3-glucósido y 5,7-dihidroxi y 5,7-dimetoxi flavanona-4-O-L-ramnopiranosil-D glucopiranosidos. Las semillas contienen proteínas, ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico y ácido esteárico. Las flores contienen cianidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, malvidina-3-diglucósido y peonidina, 3-diglucósido, kaempferol-3-galactósido y kaempferol-3-ramnoglucósido. La raíz contiene glucósidos de flavonol, la corteza de raíz produce una nueva flavanona: (2S) –5,7-dimetoxi3′- 4 ′ -metileno dioxifvanona y una nueva dihidrobenzoxepina 5,6-dihidro-1,7dihidroxi-3,4- 2,3 dimetoxi-2-metildibenz (b, f) oxepina (54, 58).

2.7.1.2. Actividades biológicas

En algunas de las especies del género *Bauhinia* se han reportado actividades hipoglucemiantes, actividad antioxidante y hepatoprotectora. Los extractos de *Bauhinia forficata* y *Bauhinia cheilandra* presentaron actividad hipoglucemiante en ratas diabéticas. El efecto antioxidante y hepatoprotector está demostrada para *Bauhinia forficata* Linn, *Bauhinia racemosa* Lam. y *Bauhinia variegata* (57). Las hojas de varias especies de *Bauhinia* son utilizadas en el tratamiento de la diabetes por muchas poblaciones en el mundo (59).

En la medicina tradicional mexicana *Bauhinia variegata* Linn. es utilizada para el tratamiento de la bronquitis, lepra y tumores. La corteza del tallo se emplea como astringente, tónico y antihelmíntico. La infusión de hojas y corteza, como laxante, además de presentar actividad antidiabética. Se ha reportado que la corteza del tallo tiene actividad antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiulcerosa y hepatoprotectora (58). La raíz es carminativa, se usa en dispepsia y flatulencia, y se usa una decocción para prevenir la obesidad. Se reportó que el extracto etanólico de *B. variegata* posee un efecto antitumoral en los linfomas ascíticos de Dalton, actividad antiulcerosa y efecto tóxico en el tumor hepático contra dietil nitrosamina, y el extracto metanólico posee un efecto antibacteriano significativo (60).

Se ha reportado que *Bauhinia blakeana* Dunn tiene propiedades hipoglucémicas, ya que generalmente se usa como alternativa terapéutica en el tratamiento de la diabetes, al consumir sus hojas en forma de té (52). La acción antidiabética de diferentes fracciones del extracto de *Bauhinia candicans Benth*, actúa reduciendo significativamente los niveles de glucosa en sangre, estos resultados sugieren que el extracto de *Bauhinia candicans* incrementa el metabolismo de glucosa y podría contener principios activos con propiedades hipoglucémicas. Sin embargo, también se encuentran resultados divergentes, en los extractos etanólicos de *Bauhinia forficata* en los cuales, no se demostró la actividad antidiabética en ratas.

El extracto acuoso de *Bauhinia divaricata* mostró un efecto significativo en la prueba de la actividad hipoglucemiante en ratas. Estudios sobre la acción farmacológica de los extractos etanólicos y acuosos de *Bahunia variegata* presentaron resultados positivos sobre la disminución de la tasa de glucemia, colesterol, actividad sobre la secreción de insulina en

líneas celulares; los extractos etanólicos mostraron actividad quimiopreventiva y efectos citotóxicos en tumores de hígado de ratón y líneas celulares de cáncer de origen humano (52).

3. Justificación

La obesidad es un problema de salud grave en nuestro país. Se presenta como el primer lugar mundial en obesidad infantil y el segundo en obesidad en adultos. En la actualidad a nivel mundial existen más de mil millones de adultos con sobrepeso y al menos 300 millones son obesos. Se estima que, en México, los costos directos e indirectos de la obesidad durante el año 2010 fueron de 806 millones de dólares y se prevé que esta tendencia aumente a 1.2 mil millones de dólares para el 2030. El gobierno mexicano ha promovido un acuerdo nacional para mejorar la colaboración intersectorial para abordar el control de la obesidad, que implica acciones dentro de los sectores público y privado que incluyen una nueva legislación a través de impuestos sobre bebidas azucaradas y comida chatarra. A pesar de los esfuerzos la obesidad va en aumento. Se calcula que una reducción del 1% del índice de masa corporal disminuiría considerablemente los gastos en salud pública que generan las enfermedades secundarias a la obesidad. Los medicamentos que se han utilizado para tratar la obesidad tienen principalmente una actividad anorexigénica y han tenido que salir del mercado debido a sus efectos secundario sobre el sistema nervioso central. Actualmente, no existen medicamentos para la obesidad con efectos directos sobre el tejido adiposo visceral, que es el que origina todos los procesos inflamatorios que darán origen al síndrome metabólico. Todo ello, hace prioritaria la investigación y búsqueda de fármacos con actividad sobre la adipogénesis del tejido adiposo visceral.

México cuenta con una amplia diversidad vegetal, que es fuente de un gran número de compuestos con diversas actividades farmacológicas. En nuestros laboratorios hemos encontrado plantas y compuestos con actividad sobre la glucosa vía el incremento de la insulina, al mismo tiempo que observamos una disminución del tejido adiposo en los modelos murinos. Es por ello, que en el presente proyecto de investigación planteamos la evaluación de diferentes especies del género *Bauhinia*, conocida generalmente como pata de vaca, para identificar y aislar los metabolitos secundarios de origen natural (*Bauhinia sp.*) con actividad sobre los procesos anti adipogénicos en modelos *in vitro*, que nos dirija en la obtención futura de fármacos contra la obesidad.

4. Planteamiento del problema

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y todas las enfermedades que conforman el síndrome metabólico, una agrupación de factores de riesgo de origen metabólico (obesidad abdominal, dislipidemia, glucemia elevada y presión arterial alta) que llevan a desarrollar enfermedades cardíacas y diabetes debido al aumento de la glucosa en sangre, presión arterial, bajo nivel del colesterol de alta densidad (HDL), altos índices de triglicéridos y excesivo perímetro de cintura (obesidad o sobrepeso). Las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus y la obesidad constituyen en conjunto o por separado, grandes desafíos para la salud pública y los sistemas sanitarios en el siglo XXI.

Existen diferentes alternativas para reducir de peso en pacientes con obesidad. Una de estas alternativas es el cambio de hábitos alimenticios. Sin embargo, se ha estimado que más del 90% de las personas obesas que pierden peso haciendo modificaciones en su dieta vuelven a su peso original dentro de 2-5 años posteriores. El tratamiento farmacológico que ha existido actúa de diferente manera (a) induciendo una sensación de saciedad, (b) alterando el apetito, (c) reduciendo la grasa absorbida. La mayoría de los medicamentos anorexigénicos como dinitrofenol, mazindol, sibutramina, rimonabant, entre otros, han salido del mercado debido a sus indeseables efectos secundarios, incluyendo alteraciones en los sistemas cardiovasculares, hepáticos, renales y sobre todo sobre sistema nervioso central

La distribución anatómica de la grasa constituye un elemento ampliamente reconocido como factor determinante del riesgo de complicaciones asociadas con el síndrome metabólico. La obesidad derivada del aumento de la adiposidad visceral supone un mayor riesgo de aparición de complicaciones metabólicas y cardiovasculares que la adiposidad subcutánea. Actualmente, no existe ningún fármaco que regule la adipogénesis o la lipólisis del tejido adiposo visceral. Por todo lo anterior, la adipogénesis, la diferenciación y la proliferación de adipocitos, son un mecanismo importante que lleva al aumento de peso y la obesidad. Es importante desarrollar productos farmacéuticos y tratamientos para la obesidad que actúen directamente regulando la adipogénesis. Cualquier fármaco que regule estos procesos podría tener una potencial aplicación terapéutica y conferir un beneficio clínico adicional en el esfuerzo de prevenir y/o tratar las enfermedades relacionadas al síndrome metabólico.

5. Hipótesis

Los extractos acuosos y etanólicos de *Bauhinia* presentan efectos anti-obesidad en modelos *in vitro* de adipogénesis mediante la lipólisis, acumulación de lípidos y la diferenciación celular adipocitaria.

5. Objetivos

Objetivo general

Obtener de nuevos compuestos de origen natural, con actividad reguladora sobre la adipogénesis.

Objetivos específicos

1. Colectar e identificar botánicamente las especies de *Bauhinia sp*.
2. Obtener extractos acuosos y etanólicos bajo condiciones controladas de *Bauhinia sp.* (*B. blakeana, B. variegata y B. divariegata*).
3. Determinar el efecto tóxico de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. variegata y B. divariegata* sobre la línea celular de preadipocitos 3T3-L1.
4. Determinar el efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. variegata y B. divariegata* sobre la maduración de los adipocitos.
5. Determinar el efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. variegata y B. divariegata* sobre la lipogénesis.
6. Determinar la actividad inhibitoria de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. variegata y B. divariegata* sobre la lipasa pancreática.
7. Identificar los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. variegata y B. divariegata* con efecto sobre la maduración de los adipocitos, la lipogénesis y la inhibición de la lipasa pancreática.

6. Material y métodos

6.1 Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

El modelo de diferenciación adipocitaria que se empleó fue la línea celular de fibroblastos de embrión de ratón 3T3-L1, donada por el Dr. Ángel Josabad Alonso Castro de la Universidad de Guanajuato. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero de ternera al 10%, y 1% de penicilina-estreptomicina (100 U/ml -100 µg/ml, P/S). Se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2.

6.2 Diferenciación *in vitro* de las células 3T3-L1

Para su diferenciación de las células 3T3-L1 se cultivaron hasta una confluencia del 80% (48 h) y este momento se tomó como el día 0 (D0). Dos días después que se observó la confluencia requerida, las células se estimularon con un coctel de diferenciación que consiste en 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 µM dexametasona (DEX), 10 µg/ml de insulina, 1% P/S en DMEM durante 48 h (D2). Cumplidas las 48 h, se realizó el cambio de medio de mantenimiento, el cual consistió de DMEM con 10 % de SFB, 10 µg/ml de insulina y 1% P/S. Se realizó cambio de medio, cada 48 h hasta que las células se diferenciaron completamente. Para la evaluación de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana*, *B. divariegata* y *B. variegata*, los extractos se administraron en el medio de mantenimiento, con cambios de medio cada 48 h, durante 10 días. Los controles empleados fueron, control sin tratamiento donde sólo se administró el medio de mantenimiento (vehículo) y un control positivo de adipogénesis donde se administró rosiglitazona al 0.5 µM, fármaco sensibilizador de insulina, como inductor de diferenciación.

6.3 Colecta y autentificación de especies vegetales

La colecta de las tres especies de *Bauhinia* se llevó acabo en la ciudad de Atlixco, Puebla. Los ejemplares colectados contaban con hojas, tallo y flores o fruto. Los ejemplares se montaron en papel, se etiquetaron y se prensaron. La identificación botánica de las plantas herborizadas se realizó en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el cual, se quedaron en depósito estos ejemplares a los cuales les asignaron un número de identificación necesarios para futuros reportes científicos.

Se colectaron hojas de las diferentes especies, para la elaboración de los extractos etanólicos y acuosos. Las hojas se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron en un molino de café a nivel polvo, para tener mayor superficie de contacto y mejorara la extracción.

Figura 4. Ejemplares herborizados de las tres especies colectadas de *Bauhinia*.
Tomada por María del Rosario Sánchez Romero

6.4 Obtención de los extractos químicos bajo condiciones controladas

La obtención de los extractos de las tres especies a evaluar *Bauhinia blakeana, Bauhinia divariegata y Bauhinia variegata*, se llevó a cabo mediante extracción exhaustiva en un equipo Soxhterm (Gerhardt). De cada especie se obtuvieron dos diferentes extractos, las variables fueron etanol y agua, como solventes. Se emplearon 20 g de hojas secas y pulverizadas, utilizando como solventes agua y etanol. Se diseñó un sistema de extracción para cada solvente en el programa Soxthem Manager, Tabla 2. Los seis extractos obtenidos se evaporaron a sequedad en un rotaevaporador (Heildoph) para obtener los respectivos extractos secos, se determinó el peso crudo de los seis extractos por diferencia de pesos. Los extractos crudos se resuspendieron con agua inyectable a una concentración 1:10 (P/V), se centrifugaron a 5 000 rpm 5 min. Para disminuir las partículas de pigmentos, además de la centrifugación se realizaron diferentes filtrados con filtros de tamaño de poro 0.45 µm y de 0.20 µm. Los extractos se alicuotaron y conservaron a 4°C.

Tabla 2. Parámetros de extracción

	Agua	Etanol
Temperatura de clasificación	300 °C	300 °C
Temperatura de extracción	100 °C	120 °C
Intervalo de reducción	2 min 6 s	2 min 6 s
Extracción en caliente	0 h 20 min	0 h 20 min
Evaporación A	0 x Interval	0 x Interval
Tiempo de extracción	1 h	1 h
Evaporación B	0 x Interval	0 x Interval
Evaporación C	0 min	0 min
Programa	1 h 20 min	1 h 20 min

6.4.1 Evaluación de viabilidad/ muerte por los métodos de MTT y tinción por ioduro de propidio (IP)

El ensayo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es una prueba de viabilidad que depende de la conversión enzimática del MTT a un producto cromogénico por las células vivas, la conversión de MTT, soluble en agua y color amarillo, en formazán, púrpura e insoluble, por la acción de las reductasas mitocondriales y celulares (61).

Se sembraron preadipocitos 3T3-L1 a una densidad de 10, 000 células/pozo en una placa de 96 pozos. Después de 24 horas de cultivo, las células se trataron con siete diferentes concentraciones de los extractos acuosos y etanólicos de las tres especies de *Bauhinia* (1.25, 2.5, 5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml) y se incubaron por 24 h. Cumplido el tiempo de incubación se retiró el medio con tratamiento, se realizó un lavado con PBS, se agregaron 37 µl de solución de trabajo MTT (10% de stock MTT, 7% de SFB y 1% de antibióticos) a cada pozo y se incubaron durante 4 horas a 37°C en oscuridad. Después de la incubación, se añadieron 70 µl de DMSO por pozo y las placas se agitaron por 15 min a 470 rpm. Cuando se solubilizaron los cristales de MTT-formazán, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm con un lector Multi-Modal de Microplacas Synergy, el porcentaje de viabilidad celular se expresó como: $\frac{DO\ de\ celulas\ tratadas}{DO\ de\ celulas\ control} \times 100$.

El ioduro de propidio (IP) es un agente intercalante fluorescente, se une al ADN intercalándose entre las bases y se utiliza para teñir ADN para evaluar la muerte celular. El

IP no es permeable a la membrana, por lo que es útil para diferenciar las células necróticas, apoptóticas y sanas en función de la integridad de la membrana (62) (63).

La muerte celular se evaluó después de 10 días de tratamiento con los extractos, con la tinción de IP, se incubaron las placas con 10 µl de 10 µM de IP durante 10 min. Se tomaron fotografías de fluorescencia en el sistema IncuCyte ZOOM y la muerte celular se expresó como: $\%\ de\ confluencia\ rojo\ (IP+) / \%\ de\ confluencia\ total$.

6.4.2 Determinación del contenido de lípidos totales mediante la tinción de rojo oleoso O

El rojo oleoso O es un colorante lisocromo (liposoluble) utilizado para la tinción de triglicéridos y lípidos neutros. Esta tinción permite realizar análisis cualitativo y cuantitativo de la diferenciación de adipocitos. Para realizar las mediciones cualitativas, el rojo oleoso O se diluye usando isopropanol, y la absorbancia se determina fotométricamente a una absorbancia máxima de 518 nm (64).

La tinción con rojo oleoso O, se realizó al día 10 de tratamiento con los extractos. Las células se lavaron con una solución salina tamponada con fosfatos (PBS), se fijaron con formaldehido al 4% durante 20 min, seguido de un lavado un PBS y se incubaron con una solución de trabajo de oil red O durante 1 h. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces con PBS y se fotografiaron mediante el sistema de análisis de células vivas de IncuCyte Zoom de EssenBioScience, con un objetivo de 20x. Alternativamente, para un ensayo cuantitativo, se extrajo el colorante Oil Red O con 100 µl de isopropanol y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm con un lector multimodal de microplacas Synergy (BioTek).

6.4.3. Determinación de Inhibición de la actividad de la lipasa pancreática (LPP)

Se preparó un tampón enzimático mediante la adición de 20 µl de solución de lipasa pancreática porcina (2.5 mg / ml en 10 mM de ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) y 1 mM de EDTA, pH 6.8) a 175 µl de solución tampón Tris-HCl (100 mM Tris-HCl y 5 mM de CaCl2, pH 7.0), que se mezcló con 5 µl de los diferentes extractos de *Bauhinia*, se incubó durante 15 min a 37 °C y 30 rpm, con 5 µl del sustrato (10 mM p-NPB (butirato de p-

nitrofenilo) en dimetilformamida). La reacción enzimática se llevó a cabo durante 30 minutos a 37 °C. La actividad de la lipasa se determinó mediante un lector multimodal de microplacas Synergy (BioTek). La inhibición de la lipasa se expresó como el porcentaje de disminución en la densidad óptica cuando la LPP se incuba con los extractos de ensayo. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente formula:

$$\%\, inhibición = 100 - ((B - b)/(A - a)\ \ x\, 100)$$

Donde A es la actividad sin inhibidor, a es el control negativo sin inhibidor, B es la actividad con inhibidor, y b es el control negativo con inhibidor.

6.4.4. Identificación de los compuestos presentes en el extracto activo por cromatografía liquida asociada a masa (LC/MS)

Para el análisis químico, cada 100 mg de muestra para el sistema LC/MS, se mezclaron con 1.5 ml de metanol: agua: ácido fórmico (25: 24: 1, v: v: v), luego se agitó en vórtex y se sonicó en un baño ultrasónico durante 60 min a temperatura ambiente. Las muestras se mantuvieron a 4 ° C durante la noche y se sonicaron nuevamente durante 60 min. Se realizó una centrifugación durante 10 min a 10000 rpm para separar el sobrenadante del residuo sólido. El sobrenadante se filtró a través de un filtro PVDF de 0.22 µm antes del análisis (Millipore, EE. UU.). Los análisis cromatográficos para la identificación de compuestos se llevaron a cabo en una columna Luna C18 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido).

Se usaron agua / ácido fórmico (99: 1, v / v) y acetonitrilo como las fases móviles A y B, respectivamente, con un caudal de 1 ml / min. El gradiente lineal comenzó con 8% de solvente B, alcanzando 15% de solvente B a los 10 min, 30% a los 30 min, y 40% a los 40 min seguido de 20 min para lavar la columna y volver a las condiciones iniciales. El volumen de inyección fue de 20 µL, y los análisis HPLC-DAD-ESI-MSn se llevaron a cabo utilizando un modelo de la serie Agilent HPLC 1100 equipado con un detector de matriz de fotodiodos y un detector de masas en serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El equipo consiste en una bomba binaria (modelo G1312A), un inyector automático (modelo G1313A), un desgasificador (modelo G1322A) y un detector de matriz de fotodiodos (modelo G1315B). El sistema HPLC fue controlado por el software ChemStation (Agilent, versión

08.03). El detector de masas es un espectrómetro de trampa de iones (modelo G2445A) equipado con una interfaz de ionización por electropulverización controlado por el programa LCMSD (Agilent, versión 4.1). Las condiciones de ionización fueron 350 ° C y 4 kV, para temperatura capilar y voltaje, respectivamente. La presión del nebulizador y el flujo de nitrógeno fueron 65.0 psi y 11 L / min, respectivamente. La masa de exploración completa cubrió el rango de m / z de 100 a 1200. Se realizaron experimentos de fragmentación inducida por colisión en la trampa de iones usando helio como gas de colisión, con ciclos de aumento de voltaje de 0.3 a 2 V. Los datos de espectrometría de masas fueron adquiridos en el modo de ionización positiva para antocianinas y en el modo de ionización negativa para otros flavonoides. El MSn se llevó a cabo en el modo automático en el fragmento ión más abundante en MS (n-1).

Resultados

Las especies colectadas de *Bauhinia* fueron identificadas botánicamente por el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el cual nos proporcionó el número de identificación y nombre científico, como se muestra en la Tabla 3, figura 5.

Tabla 3. Identificación botánica

Número de identificación	Nombre	Familia
IMSSM 16419	*Bauhinia divariegata*	*Fabaceae*
IMSSM 16420	*Bauhinia variegata L.*	*Fabaceae*
IMSSM 16421	*Bauhinia blakeana Dunn*	*Fabaceae*

Figura 5. Identificación de las especies del género *Bauhinia*.
a) Bauhinia divariegata, b) Bauhinia variegata L., c) Bauhinia blakeana Dunn. Tomadas por María del del Rosario Sánchez Romero.

Antes de evaluar el efecto antiadipogénico, era importante evaluar el posible efecto citotóxico o un posible efecto en la proliferación o muerte celular de los extractos sobre la línea celular 3T3-L1 y, por tanto, evaluar un posible papel sobre la viabilidad celular de los preadipocitos y adipocitos. Para ello se realizaron pruebas de MTT. Para establecer la concentración del tratamiento del material, cada extracto de cada una de las tres especies de *Bauhinia*, se evaluaron a concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml agregadas a las células para verificar su tasa de supervivencia. La viabilidad por MTT se comparó contra un control sin tratamiento sólo era vehículo y contra la rosiglitazona, un fármaco hipoglucemiante oral del grupo de las tiazolidinedionas, el cual que aumenta la sensibilidad a la insulina. No existen en el mercado medicamentos que actúen como antagonistas de PPARγ, pero si como agonistas, la rosiglitazona actúa como agonista selectivo de la isoforma gamma del receptor nuclear activador de la proliferación de peroxisoma (PPARγ). Estos receptores se encuentran en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado y su activación regula la transcripción de los genes que responden a la insulina y que están implicados en el control, transporte y utilización de la glucosa; también participan en la regulación del metabolismo de ácidos grasos. Este fármaco, se utilizaba en pacientes diabéticos, pero se retiró del mercado porque originaba diversos efectos secundarios como edema, aumento de peso e insuficiencia cardiaca congestiva, accidente cerebrovascular, etc.

Para los preadipocitos, en la figura 6, (6A y 6B) los extractos acuosos de las 3 especies lograron disminuir la viabilidad de las células. En contraste, con los extractos etanólicos no se indujeron disminución en la viabilidad celular. Los extractos se comportaron de diferente forma en los preadipocitos que en los adipocitos, pero en todos los casos, se observó menor disminución en la viabilidad celular inducida por los extractos etanólicos que por los acuosos.

Para los adipocitos maduros, como los resultados nos muestran (Figura 6C y 6D), los diversos extractos de *Bahuinia* tanto acuosos como etanólicos a las concentraciones estudiadas, el extracto acuoso que más afectó la viabilidad celular fue el de *B. variegata* con alrededor de un 23 a 24% al 5 µg / ml. Para los extractos etanólicos de las 3 especies, el extracto que más afectó la viabilidad celular fue el de *B. blakeana* en alrededor del 34% a 50 µg / ml. A bajas concentraciones, todos los extractos tuvieron una disminución de la viabilidad de alrededor del 8% al 10%. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los extractos afectan la viabilidad

en preadipocitos y adipocitos maduros. Los extractos con mayor efecto sobre la disminución en la viabilidad fueron los acuosos. La disminución de la viabilidad no es dependiente de la dosis administrada, pero sí del tipo de solventes en los extractos y de la especie botánica analizada, lo cual quiere decir que son diferentes tipos de metabolitos los obtenidos en cada extracto.

Estos resultados indican que el extracto de *B. divariegata*, podría alterar la masa grasa al afectar directamente la viabilidad celular en preadipocitos maduros e inducción de apoptosis en adipocitos y, por lo tanto, podría tener futuras aplicaciones para el tratamiento de la obesidad. Para ello, sería necesario evaluar en un futuro, mediante que ruta se lleva a cabo la disminución de la viabilidad celular. ¿Mediante apoptosis?, esto debido a que la diferenciación de preadipocitos y la inducción de vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de los lípidos incluye la expresión de varios genes específicos de adipocitos como el PPARγ y la CCAAT, así como otras que regulan el proceso de lipólisis

Podríamos plantear en estos primeros resultados sobre viabilidad, que fue una buena decisión hacer diferentes tipos de extractos para cada una de las tres especies, porque al parecer sí hay diferentes metabolitos secundarios en uno y otro tipo de extracto. Más adelante analizaremos los resultados sobre los metabolitos secundarios presentes.

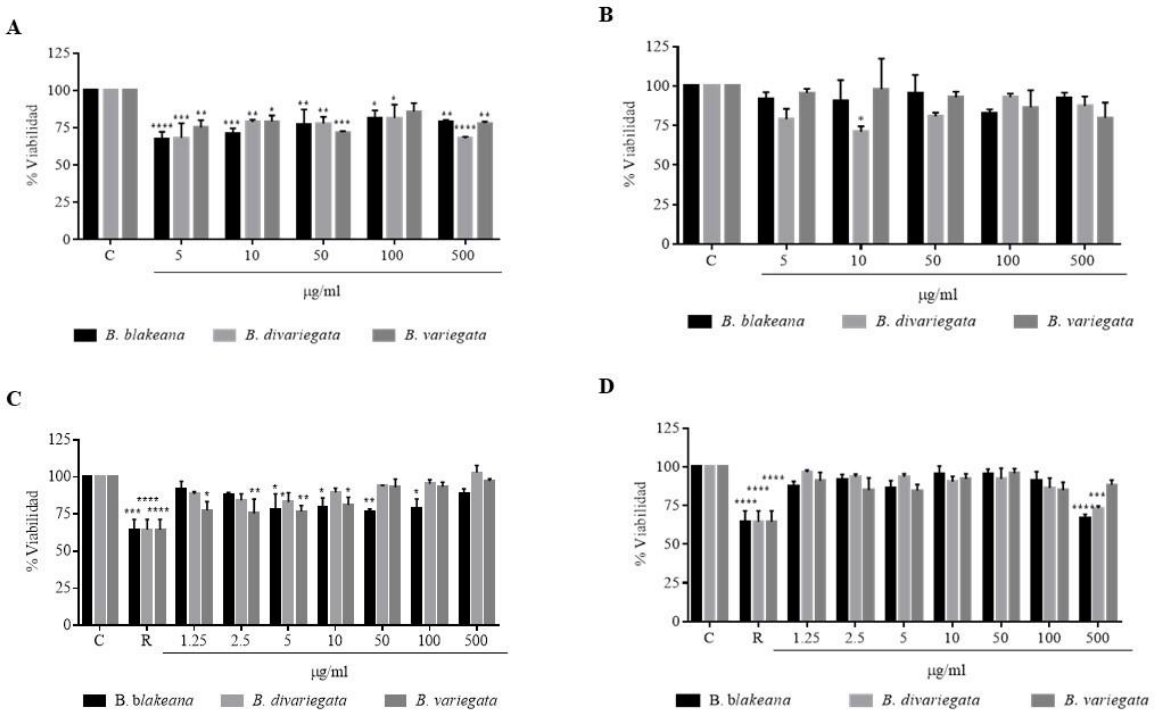

Figura 6. Efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana*, *B. divariegata* y *B. variegata* en la viabilidad celular en preadipocitos y adipocitos inmaduros.
A) Los preadipocitos se incubaron con los extractos acuosos de *Bauhinia* (5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml) por 24 h. B) Los preadipocitos se incubaron con los extractos etanólicos de *Bauhinia* (5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml) por 24 h. C) Los adipocitos inmaduros se incubaron con los extractos acuosos de *Bauhinia* (1.25, 2.5, 5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml) por 24 h. D) Los adipocitos inmaduros se incubaron con los extractos etanólicos de *Bauhinia* (1.25, 2.5, 5, 10, 50, 100 y 500 µg/ml) por 24 h. La viabilidad celular después de los tratamientos con los extractos acuosos y etanólicos de *Bauhinia* mediante el ensayo MTT. Los valores se presentan como las medias ± EEM. Las barras con * muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Dunnet.

Para probar los efectos de los extractos de las diferentes especies de Bauhinia en el proceso adipogénico se utilizaron las células murinas 3T3-L1. Esta línea celular permite la investigación de estímulos y mecanismos que regulan la replicación de preadipocitos por separado de aquellos que regulan la diferenciación a adipocitos. Como preadipocitos, estas células tienen una apariencia fibroblástica, se replican en cultivo hasta formar una monocapa confluente, después de lo cual el contacto célula-célula desencadena la detención del crecimiento G0 / G1 (65). La posterior estimulación con IBMX, dexametasona y altas dosis

de la insulina durante 2 días hace que estas células se sometan expansión clonal mitótica post confluente, salir del ciclo celular, y comenzar a expresar genes específicos de adipocitos. Aproximadamente cinco días después de la inducción de la diferenciación, el 90% de las células muestran la característica fenotípica de adipocitos llenos de lípidos (Figura 7). Enseguida, veremos, los efectos que los diferentes extractos ejercieron sobre proceso adipogénico descrito.

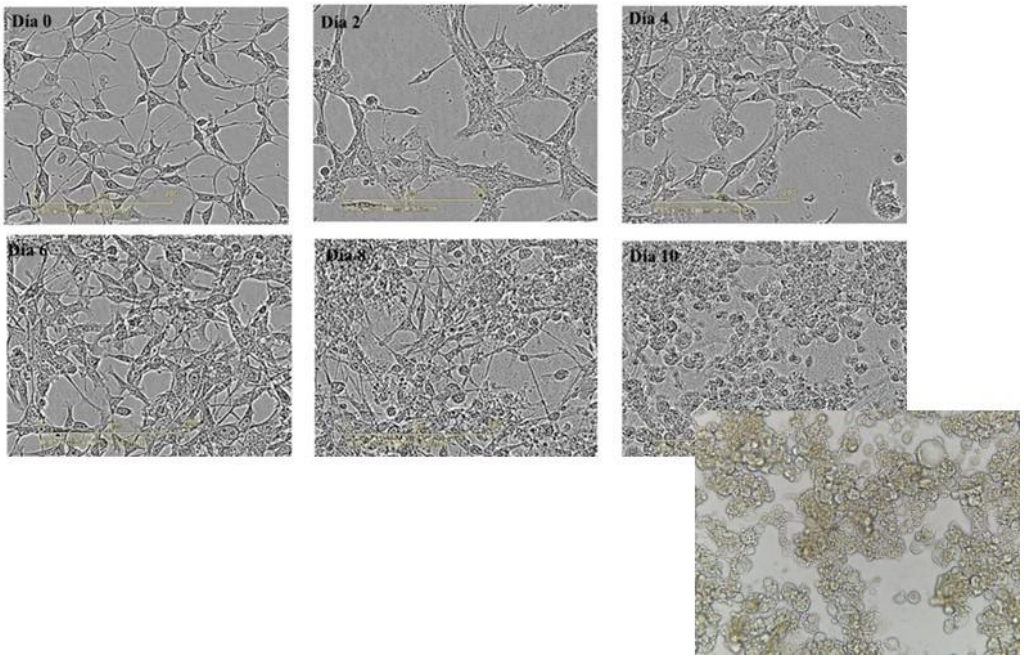

Figura 7. Cambios morfológicos durante la diferenciación adipocitaria de las células 3T3-L1.
Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 10 días, se tomaron fotografías con el equipo Incucyte cada 48 h (20X).

Efecto inhibitorio de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* sobre la adipogénesis

El efecto inhibitorio de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* sobre la adipogénesis de preadipocitos y adipocitos maduros de células 3T3-L1 fue evaluado a diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 50 100 y 500 µg/ml). Cuanto más diferenciados se encuentren los adipocitos, mayor será el número de células teñidas con rojo oleoso O debido a la acumulación de lípidos.

En las observaciones microscópicas de la tinción de células con rojo oleoso O, la diferenciación fue muy evidente con la imagen control porque se observa un aumento en el número y tamaño de las gotas lipídicas teñidas. Los tratamientos con los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* mostraron una reducción gradual en las gotas de lípidos teñidas (Figuras 9A y 10A).

Los efectos inhibitorios del proceso adipogénico son notables aún en las observaciones microscópicas, pero esta inhibición también se cuantificó para tener los datos contundentes y objetivos sobre esta actividad que estamos buscando. Como era de esperarse la rosiglitazona, aumentó notablemente las cantidades de adipocitos maduros porque, como ya se explicó, este fármaco aumenta el índice de masa corporal en los pacientes. Por lo tanto, los extractos disminuyeron la diferenciación adipocitaria. El extracto acuoso de *B. divariegata* a una concentración de 5 µg / ml disminuyó la acumulación de triglicéridos en un 61.54 % en 10 días (Figura 9B) y el extracto etanólico de *B. divariegata* y *B. variegata* a una concentración de 100 µg/ml disminuyeron los niveles de triglicéridos en un 50.50 % en 10 días (Figura 10B) al compararse con el control sin tratamiento. Este efecto sobre la acumulación de lípidos se logró a concentraciones que no afectaron la viabilidad celular según el ensayo MTT (Figura 6), lo que siguiere un efecto importante de estos extractos sobre la diferenciación celular o acumulación de lípidos más que sobre la viabilidad de los adipocitos.

En los extractos etanólicos, los resultados fueron más similares entre las concentraciones y especies vegetales. El mejor extracto sigue siendo *B. divariegata,* pero a una concentración mayor de 100 µg / ml. Estos resultados son sumamente alentadores, ya que logramos obtener extractos acuosos que disminuyen en un 61.54 % y 50% la acumulación lipídica, comparado

con controles no tratados y sin inducir cambios en la viabilidad celular. La diferencia en la actividad biológica depende mucho de la concentración evaluada. Pero, en resumen, la mejor especie que reduce la acumulación de lípidos fue *B. divariegata* a una concentración de 5 µg/ml.

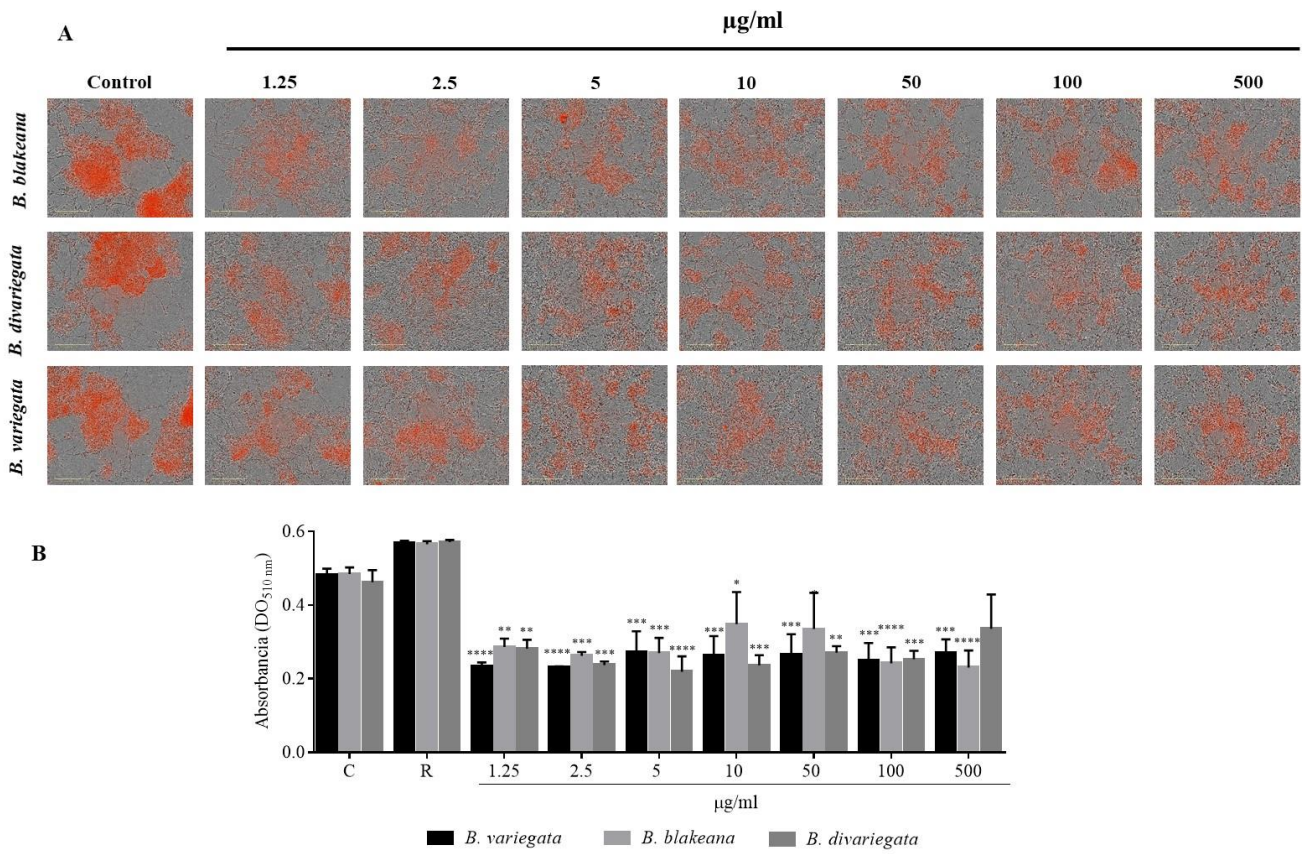

Figura 8. Acumulación de lípidos de los adipocitos tras la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 tratadas con el extracto acuoso de *B. blakeana, B. divareigata* y *B. variegata*.

A) El tratamiento con los extractos acuosos de *B. blakeana*, *B, divariegata* y *B. variegata* en los adipocitos 3T3-L1 disminuyó la acumulación de lípidos. Los preadipocitos se diferenciaron en adipocitos en medio que contenía diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *B. blakeana*, *B, divariegata* y *B. variegata*, durante 10 días. La tinción con rojo oleoso O se realizó el día 10. B) Los extractos acuosos de *B. blakeana*, *B, divariegata* y *B. variegata*, disminuyeron la acumulación de TG en células 3T3-L1 diferenciadas. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los valores se representan como las medias ± EEM. Las barras con * son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Dunnet.

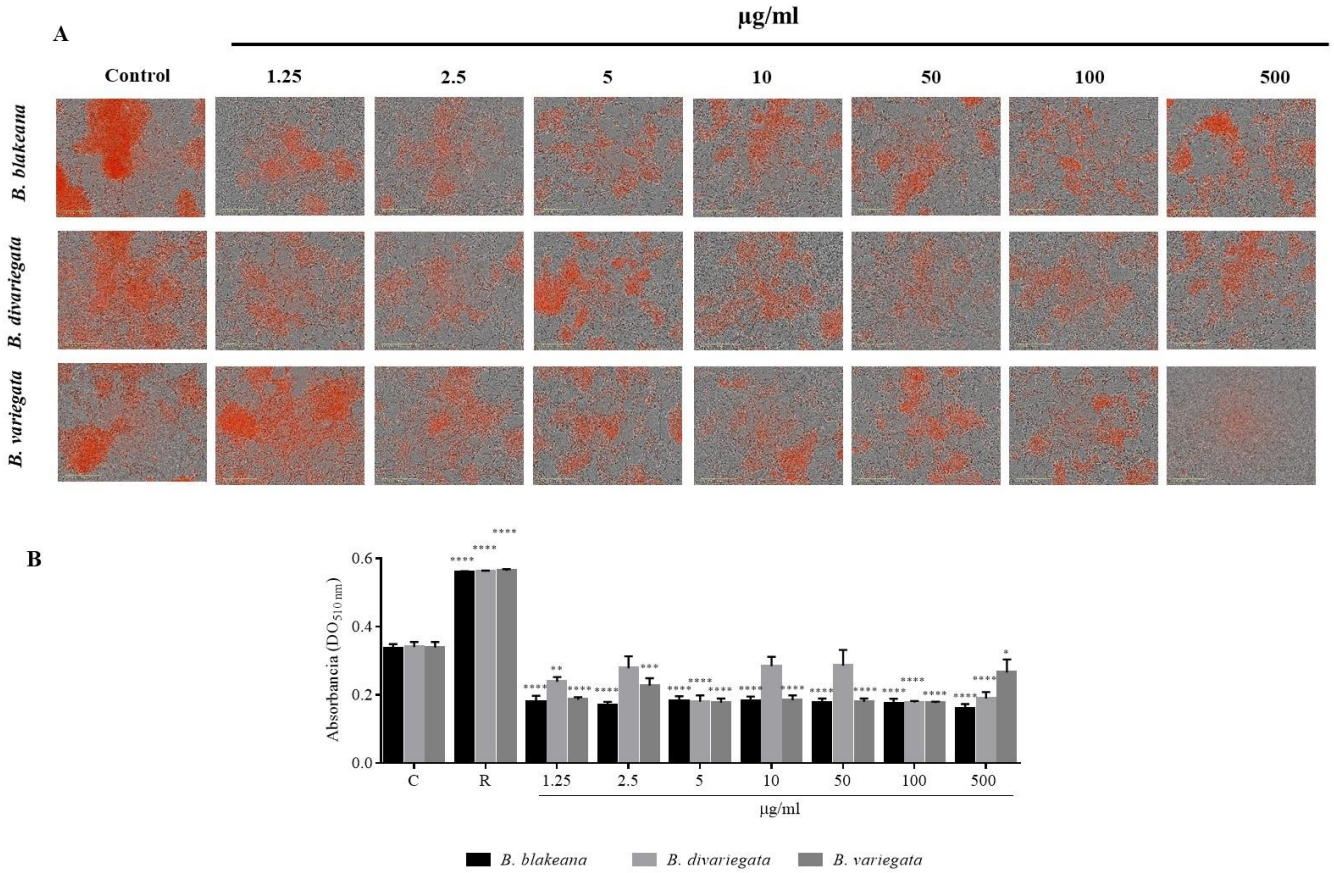

Figura 9. Acumulación de lípidos de los adipocitos tras la diferenciación adipocítica de las células 3T3-L1 tratadas con el extracto etanólico de *B. blakeana, B. divareigata* y *B. variegata*.

A) Los preadipocitos se diferenciaron en adipocitos en medio que contenía diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de *B. blakeana*, *B, divariegata* y *B. variegata*, durante 10 días. La tinción con rojo oleoso O se realizó el día 10. B) Los extractos etanólicos de *B. blakeana*, *B, divariegata* y *B. variegata*, disminuyeron la acumulación de TG en células 3T3-L1 diferenciadas. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los valores se representan como las medias ± EEM. Las barras con * son significativamente diferentes ($p < 0.05$) según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Dunnet.

Además de cambios asociados al metabolismo, los cambios observados en la reducción del MTT después del tratamiento con los diferentes extractos, podrían deberse a una disminución en la proliferación o a la inducción de muerte celular. Para evaluar si los extractos estaban teniendo un efecto sobre la proliferación celular o muerte celular en los adipocitos, se determinó la muerte celular utilizando ioduro de propidio (IP), en condiciones normales, el IP es impermeable a las células. Las células muertas con la membrana plasmática dañada son permeables al IP y los núcleos se tiñen de rojo, esto representa a las células muertas. Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas a IP normalizadas contra el porcentaje total de confluencia celular. Los extractos etanólicos de *B. blakeana* y *B. variegata* (500 µg/ml), ocasionan muerte en los adipocitos después de 10 días de administración, ya que la tinción con IP aumenta, además de que se observó una disminución en la proliferación, mientras que con los tratamientos a dosis bajas (1.25, 2.5, 5, 10, 50 y 100 µg/ml) no se observó una disminución significativa en la confluencia celular (no mostrado) y no se observó inducción de muerte celular (figura 11). . Los extractos acuosos de *B. blakeana*, *B. divariegata* y *B. variegata* no presentaron una disminución significativa en la confluencia celular (no mostrado) y no se observó inducción de muerte celular respecto al control (figura 12).

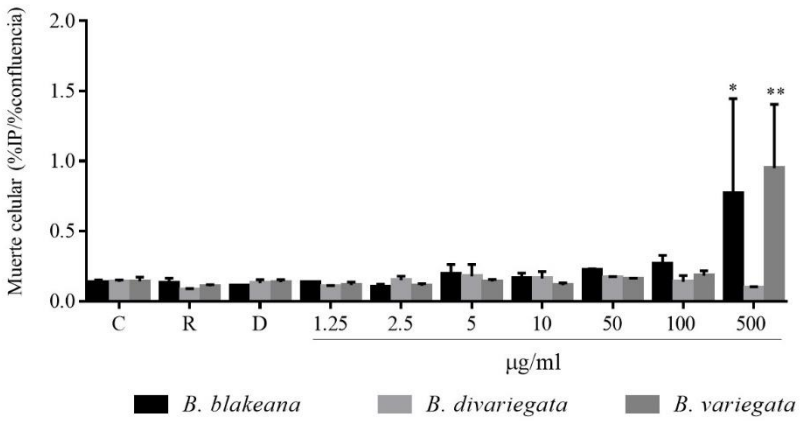

Figura 10. Evaluación de los extractos etanólicos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* sobre la muerte celular mediante la tinción con ioduro de propidio (% de confluencia de células IP y se normalizó al % de confluencia tota).
Los valores se presentan como las medias ± EEM. Las barras con * muestran resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Dunnet.

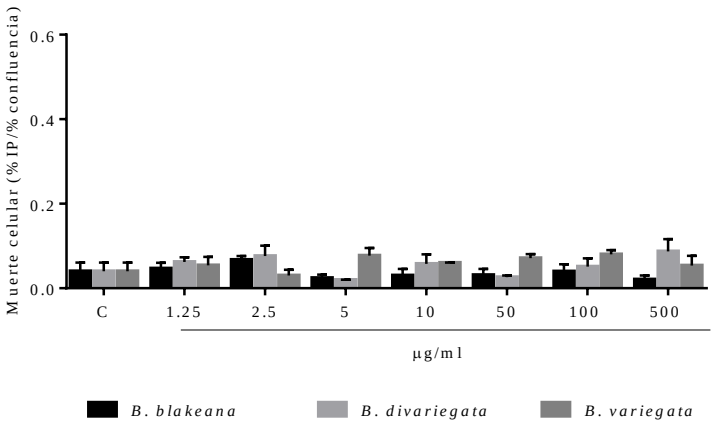

Figura 11. Evaluación de los extractos acuosos de *B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata* sobre la muerte celular mediante la tinción con ioduro de propidio (% de confluencia de células PI y se normalizó al % de confluencia total).
Los valores se presentan como las medias ± EEM. Las barras con * muestran resultados significativamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de rango múltiple de Dunnet.

Además de realizar la experimentación de las diferentes especies de *Bauhinia* sobre el proceso adipocitario, se evaluó la actividad de estos extractos sobre la inhibición de la lipasa pancreática para saber si podría tener un efecto dual sobre la obesidad. Esto es, la inhibición adipocitaria y la inhibición de lípidos sería una actividad biológica sobre los adipocitos ya presentes en el cuerpo y la inhibición lipasa pancreática, tendría un efecto sobre la inhibición de la absorción de las grasas de la comida, en el momento de la ingesta, y así bajar el consumo calórico.

En este estudio se utilizó un fármaco de uso en el mercado, que sería el estándar de oro para inhibir la lipasa pancreática, el Orlistat®. En este ensayo el extracto acuoso de *B. variegata* presentó un porcentaje de inhibición (%I) del 48.19% a una concentración de 10 µg/ml, el que mostró la mayor actividad sobre la inhibición de la lipasa pancreática a una baja concentración (Figura 13). El extracto etanólico de *B. blakeana* presentó un porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática de 43.82% a la concentración de 50 µg/ml, (Figura 14). El extracto de acuoso de *B. blakeana* muestra un porcentaje %I = 49.94 a la concentración de 500 µg/ml, el de *B. divariegata* %I= 51.07 a la concentración de 500 µg/ml y el de *B. variegata* %I= 48.19 a la concentración de 10 µg/ml, estas concentraciones presentaron los porcentajes más altos de inhibición enzimática.

El extracto etanólico de *B. blakeana* muestra un %I = 43.82 a la concentración de 50 µg/ml y el de *B. divariegata* %I= 51.48% a la concentración de 500 µg/ml. Estas concentraciones fueron las que presentaron los porcentajes más altos de inhibición enzimática.

Nuevamente, el extracto acuoso de *B. variegata* a una concentración de 10 µg/ml inhibió a la enzima en un 48.19. Por lo tanto, estos resultados se suman a la actividad inhibitoria adipocitaria, sobre lípidos.

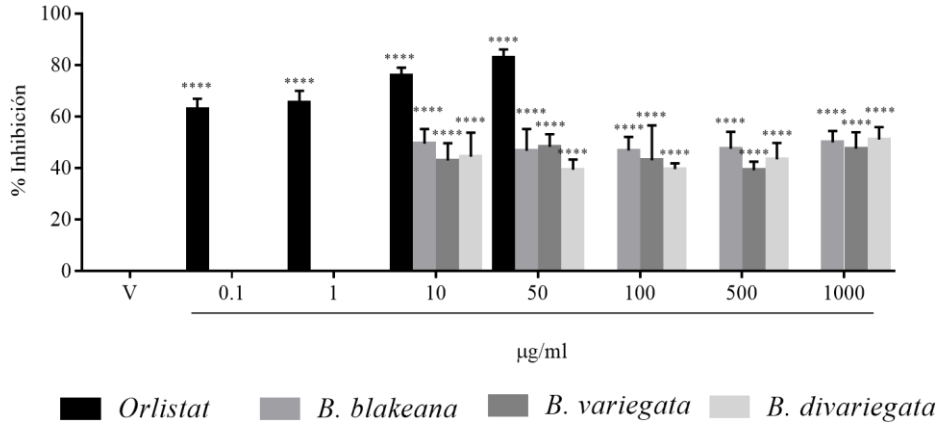

Figura 12. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la actividad de la lipasa pancreática por el extracto acuoso *de B. blakeana, B. divariegata* y *B. variegata*
El extracto de acuoso de *B. blakeana* muestra un %I = 49.94 a la concentración de 500 µg/ml, el de *B. divariegata* %I= 51.07 a la concentración de 500 µg/ml y el de *B. variegata* %I= 48.19 a la concentración de 10 µg/ml, estas concentraciones presentaron los porcentajes más altos de inhibición enzimática.

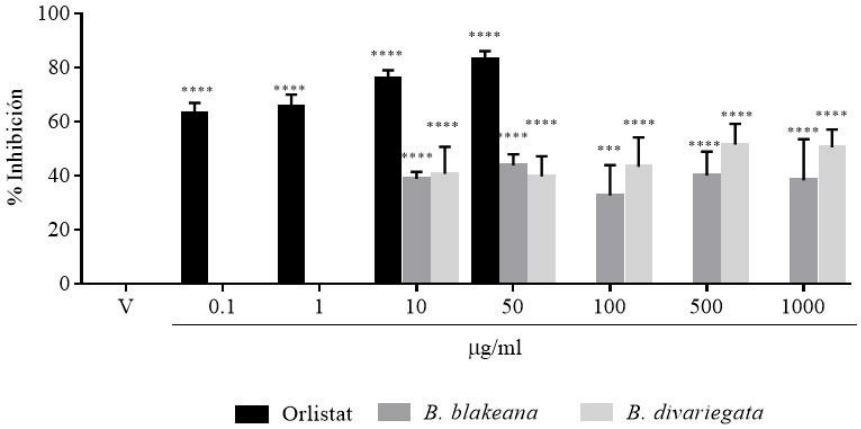

Figura 13. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la actividad de la lipasa pancreática por el extracto etanólico de *B. blakeana* y *B. divariegata*.

El extracto etanólico de *B. blakeana* muestra un %I = 43.82 a la concentración de 50 µg/ml y el de *B. divariegata* %I= 51.48% a la concentración de 500 µg/ml, estas concentraciones fueron las que presentaron los porcentajes más altos de inhibición enzimática.

Identificación de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de *Bauhinia variegata*

De acuerdo con los resultados, se determinó que el extracto etanólico de *B. variegata* fue el que presentó el mayor efecto sobre la inhibición de la adipogénesis y la acumulación de lípidos, así como la inhibición de la lipasa pancreática, mostrando un posible efecto dual sobre obesidad. Es por ello, que se realizó cromatografía liquida asociada a masas para este extracto. Los compuestos identificados son conjugados de quercetina como rutina, hiperina, isoquercetina como se muestra en la Figura 14 y Tabla 4. Los compuestos conjugados de quercetina, al parecer, pueden tener un efecto directo sobre el metabolismo de las grasas., como lo describe Sun *et.al.*, cuyos resultados sugieren que los derivados de la quercetina pueden mejorar directamente el metabolismo de los lípidos y la glucosa al reducir el estrés oxidativo y aumentar la β oxidación (66). También, Iwashita *et al.* el efecto de los flavonoides en la dieta (flavona, isoflavona, flavanona, chalcona, flavonol y derivados de flavonol) sobre la diferenciación adipocitaria *in vitro* de 3T3-L1, observando una baja disminución en la acumulación de lípidos en las células teñidas con rojo oleoso O después del tratamiento de estos flavonoles. En este trabajo, la acción antidiferenciación de la quercetina fue más potente que el de sus derivados (67).

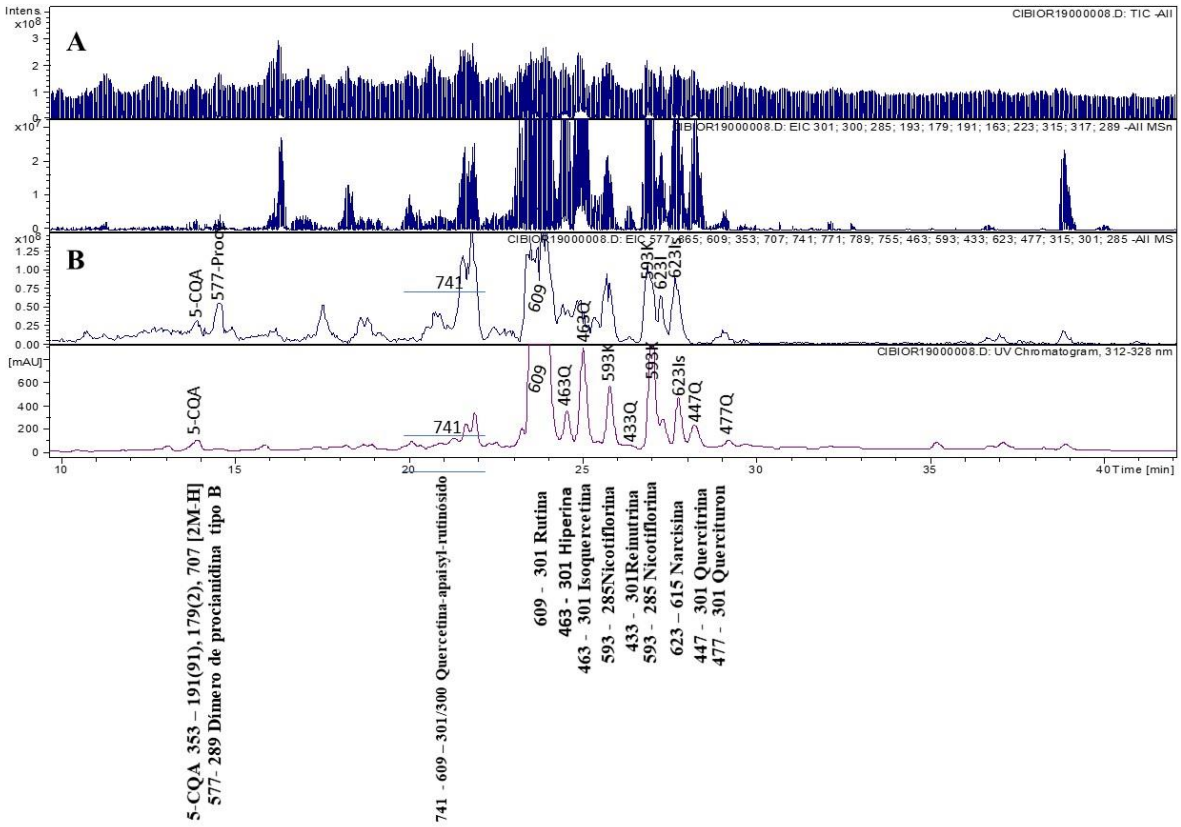

Figura 14. Cromatografía líquida asociada a masas del extracto etanólico de *B. variegata.*

Tabla 4. Compuestos identificados en el extracto etanólico de *B. variegata*.

No. de pico	Tiempo de retención	Nombre
1	20.887	Ácidos cafeoilquínicos (CQA)
2	21.621	Dímero de procianidina tipo B
3	21.872	Quercetina-apaisyl-rutinósido
4	23.505	Rutina
5	23.802	Hiperina
6	23.972	Isoquercetina
7	24.529	Nicotiflorina
8	24.991	Reinutrina
9	25.758	Nicotiflorina
10	26.959	Narcisina
11	27.281	Quercitrina
12	27.727	Querciturón

Discusión

El proceso de diferenciación celular conduce a la formación de células especializadas, capaces de almacenar y movilizar lípidos en forma de triglicéridos. Éstas cumplen un papel endocrino importante para la homeostasis del organismo. En el nivel molecular, el proceso de diferenciación adiposa es el resultado de la remodelación transcripcional que conduce a la activación de una gran cantidad de genes relacionados con la adipogénesis. La reprogramación genética que ocurre en la adipogénesis está bajo el estricto control de hormonas, citocinas, nutrientes y moléculas de señalización que cambian la expresión y / o actividad de una variedad de factores transcripcionales, que a su vez regulan el sentido y la magnitud del proceso de adipogénesis. Los factores de transcripción que son reguladores clave del proceso de adipogénesis incluyen la proteína de unión potenciadora de CCAAT (C/EBP-α, -β y -δ), el receptor activado proliferador de peroxisomas (PPAR-γ y -β/-δ), y las familias hélice-asa-hélice (HLH) (SREBP-1c) (43) (68).

En el presente trabajo, como primer paso fue necesario disponer de un modelo de adipogénesis para poder evaluar los efectos de los extractos acuosos y etanólicos de *B. blakeana*, *B. divariegata* y *B. variegata* sobre la diferenciación de adipocitos (adipogénesis). Un modelo ampliamente utilizado es el de las células 3T3- L1, cuya diferenciación puede ser inducida *in vitro*. Se ha descrito la implementación de dicho modelo experimental en el laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, estudiando algunas características de crecimiento y diferenciación del cultivo celular. En cuanto al proceso de adipogénesis inducido *in vitro*, este significó profundos cambios morfológicos y funcionales, las células diferenciadas tienden a adquirir morfología redondeada y acumulan lípidos, observados como gotas de lípidos citoplasmáticas que son teñidas de rojo con rojo oleoso O. Estos resultados nos permitieron corroborar que el cultivo respondió al estímulo de diferenciación y que las células se transformaron en adipocitos maduros.

En este trabajo, observamos que el extracto acuoso de *B. divariegata* y el extracto etanólico de *B. divariegata* inhibieron significativamente la acumulación de lípidos, la viabilidad celular y la lipasa pancreática (Figura 7 y 8, 12 y 13). La diferenciación de los adipocitos y la acumulación de lípidos está relacionada con el desarrollo de la obesidad.

Los tratamientos con los extractos acuosos y etanólico de *B. divariegata* disminuyeron la acumulación de lípidos según se determinó mediante la tinción rojo oleoso O y, por tanto, la cuantificación de triglicéridos. Estos resultados indican que estos extractos disminuyeron la acumulación de lípidos según se determinó mediante la tinción de rojo oleoso O y la cuantificación de triglicéridos y que, los extractos sobre todo en los adipocitos maduros podrían suprimir la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 mediante la inhibición de la expresión de factores de transcripción relacionados con la adipogénesis. Estas propiedades pueden atribuirse a los metabolitos secundarios presentes en las plantas del género *Bauhinia* como los flavonoides rutina y quercetina. Al respecto, un estudio realizado sobre la inhibición de la adipogénesis en adipocitos 3T3-L1, sugieren que quercetina y rutina juegan un papel importante en la acumulación de triglicéridos, donde los datos revelaron que rutina tenía la más alta inhibición sobre la acumulación de triglicéridos (83%). Además de que rutina inhibió la expresión de PPARγ, C/EBPα y leptina y condujo a una regulación positiva de la adiponectina (69).

Se han descrito efectos sobre las enzimas que regulan el metabolismo de lípidos en ratas diabéticas y obesas, como el ácido graso sintasa y carnitina palmitoil tranferasa que afectan los procesos de beta oxidación y transporte de ácidos grasos. Algunos estudios muestran que un efecto inhibidor de la lipasa pancreática en el intestino disminuye la hidrólisis de los triglicéridos de la dieta en glicerol y ácidos grasos libres, de esta manera, se reducen los niveles de colesterol total, colesterol LDL y aumento de colesterol HDL (70). El efecto observado tuvo como blanco la enzima lipasa de distintos flavonoides como kaempferol, quercetina, luteolina y rutina, siendo más activo, kaempferol 3-O-rutinósido. La rutina al poseer un grupo hidroxilo más en el anillo B de la cadena de flavonoide que kaempferol 3-O-rutinósido, hace que la inhibición de la lipasa por parte de la rutina sea 51 veces más débil que kaempferol 3-O-rutinósido. Los otros flavonoides luteolina y quercetina, mostraron un menor efecto sobre la enzima (71). En este trabajo, observamos que el extracto acuoso de *B. variegata* y el extracto etanólico de *B. blakeana* inhibieron significativamente la actividad de la enzima lipasa, estos resultados pueden atribuirse a los metabolitos presentes en los extractos del género *Bauhinia*.

Conclusiones

Los extractos acuoso y etanólico de las tres especies de *Bauhinia* disminuyeron la acumulación de lípidos, posiblemente mediante la inhibición la adipogénesis, aunque es necesario realizar más estudios para confirmar la activación de la señalización adipogénica. Los extractos acuosos y etanólicos de las tres especies de *Bauhinia* mostraron efectos significativos sobre la inhibición de la enzima lipasa. Por lo tanto, los extractos acuosos y etanólicos del género *Bauhinia* pueden representar una alternativa en el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad. Los extractos evaluados presentan efectos a diferentes niveles disminuyendo la acumulación de lípidos y la actividad de la lipasa, efecto que no presentan las terapias que se encuentran en el mercado, además de que estos efectos no afectan la viabilidad celular.

Perspectivas

Analizar el efecto de rutina y isoramnetina sobre la acumulación de lípidos en adipocitos.

Evaluar la ruta de inhibición de la adipogénesis y la expresión de genes específicos como PPARγ y la CCAAT.

Referencias

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. 2018 Febrero 16. Available from: http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.

2. Cantiello F., Cicione A., Salonia A., Autorino R., De Nunzio C., Briganti A, *et al*. Association between metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus and oncological autcomes of bladder cancer: A systematic review. International journal of Urology. 2015; 22 (1): 22-32.

3. Guilbert L.J., P. Ortiz, C. Sepúlveda, E. Alabi, F. León, A. Piña, T. Zerrweck, C. Seguridad y eficacia de la cirugía bariátrica en México: análisis detallado de 500 cirugías en un centro de alto volumen. Revista de Gastroenterología de México. 2019; 84 (3): 296-302.

4. G.A. B, D.H. R. Drug treatment of obesity. Psychiatr Clin North Am. 2011; 34 (4): 871-880.

5. Londoño Lemos M.E. Tratamiento farmacológico contra la obesidad. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2012; 41 (2): 217-61.

6. Green H., Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell. 1975; 5: 19-27.

7. Sarjeant K., Stephens J. Adipogenesis. Cold Spring Harb Perspect Bio. 2012; 4(9).

8. Patel A., Harmon Y. Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBPβ) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. Biochem. 2002; 367: 203-208.

9. Ahn J., Lee H., Kim S., Ha T. Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/β-catenin signaling. Am J Physiol-Cell Physiol. 2010; 298: C1510-C1516.

10. Huang C., Zhang Y., Gong Z., Sheng X., Li Z., Zhang W., *et al*. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPARγ pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 348: 571-578.

11. Lee S., Kim B., Oh M., Yoon J., Kim H., Lee K., *et al*. Persicaria hydropiper (L.) Spach and its Flavonoid Components, Isoquercitrin and Isorhamnetin, Activate the Wnt/β-catenin Pathway and Inhibit Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells. Am J Phytother. 2011; 25: 1629-1635.

12. Baile C., Yang J., Rayalam S., Hartzell D., Lai C., *et al*. Effect of resveratrol on fat mobilization. Ann N Y AcadSci. 2011; 1215: 40-47.

13. Saito T., Abe D., Sekiya K. Nobiletin enhances differetiation and lipolysis of 33-L1 adipocytes. Biochemical and biophysical research communications. 2007; 357: 371-376.

14. Aguilar Valles A., Inoue W., Rummel C.L.. Obesity, adipokines and neuroinflammation. Neuropharmacology. 96; 96: 124-134.

15. Filho V.C. Chemical composition and biological potentialtial of plants from the genus *Bauhinia*. Phytotherapy Research. 23; 23(10): 1347-1354.

16. Damasceno E.R., Volpato G.T., Calderon Paranhos D.M., Aguilar R., Rudge M.V.C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. Phytomedicine. 2004; 11 (2-3): 196-201.

17. Bodakhe S.H., Ram A. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. Yakugaku Zasshi. 2007; 127(9): 1503-1507.

18. Gupta M., Mazumder U.K., Kumar T.S., *et al*. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Bauhinia racemosa* against paracetamol and carbon tetra-chloride induced liver damage in rats. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics. 2004; 3: 12-20.

19. Obesity: preventing and managing the global epidemic report of a WHO consultation on obesity. Geneva, Switzerland; 2000.

20. Barquera Cervera S., Campos Nonato I., Rojas R., Rivera J. Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. Gaceta Médica de México. 2010; 146: 397-407.

21. Kopelman P.G. Obesity as a medical problem. Nature. 2000; 404: 635-643.

22. Miguel Soca P., Niño Peña A. Conseceuncias de la obesidad. ACIMED. 2009; 20(4): 84-92.

23. Raimannt X. Obesidad y sus complicaciones. Rev Med Clin Condes. 2011; 22(1): 20-6.

24. Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23 (2): 124-128.

25. Gutiérrez Monterrey P., Porrata Maury C. Procedimientos gráficos para la evaluación del estado nutricional de los adultos según el índice de masa corporal. Cubana Aliment Nutr. 2001; 15(1): 62-67.

26. Méndez I.V., Rojas, Rosalba, Barquera, Simón. *et. al*. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Instituto Nacional de Salud Pública; 2016.

27. Rodríguez Scull L.E. Obesidad: fisiología, etiopatogenia y fisiopatología. Revista Cubana de Endocrinología. 2003; 14.

28. Boden G. Obesity and Free Fatty Acids (FFA). Endocrinol Metab Clin North Am. 2008; 37 (3): 635-639.

29. Arner P., Rydén M. Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance. Obesity Facts. 2019; 8(2): 147-155.

30. Narayanaswami V., Dwoskin L.P. Obesity: Current and Potential Pharmacotherapeutics and Targets. Pharmacol Ther. 2017; 170: 116-1147.

31. Alonso Castro A.J., Dominguez F., Zapata Morales J.R., Carranza Alvarez C. Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. J Ethnopharmacol. 2015; 175: 335-345.

32. Ferreira Hermosillo A.S., Cuenca Abruch D. Tratamiento farmacológico de la obesidad. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2018; 56: 395-409.

33. Padwal R.S., Majumdar S.R. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. Lancet. 2007; 369 (9555): 71-77.

34. Suárez Román, Alfredo. Clapés Hernández, Sonia. Fernández Romero, Tammy. Egaña Morales, Esteban. Estandarización de un modelo para inducir obesidad. MediSur. 2013; 11(5).

35. Tschöp M., Heiman M.L. Rodent obesity models: An overview. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2001; 109: 307-319.

36. Lutz T.A., Woods S.C. Overview of Animal Models of Obesity. Curr Protoc Pharmacol. 2012; CHAPTER: Unit5 61.

37. Zebisch K., Voigt V., Wabitsch M., Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. Anal Biochem. 2012; 425 (1): 88-90.

38. Greeb H., Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell. 1974; 3 (2): 127-133.

39. Lee C.H., Olson P., Evans R.M., *et al*. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. Endocrinology. 2003; 144(6): 2201-2207.

40. Catherine Inesa, Langin. Adipose tissue lipolysis. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2010; 13(4): 377–381.

41. Garrido Sánchez L.V., Fernández García Joan, Ceperuelo-Mallafré Diego, Victoria. Chacón, Matilde. Ocaña-Wilhelmi, Luis. Alcaide, Juan. Tinahones, Francisco. García-Fuentes, Eduardo. De Novo Lipogenesis in Adipose Tissue Is Associated with Course of Morbid Obesity after Bariatric Surgery. PLOS ONE. 2012; 7(2).

42. R.P. B. The Biology of Adipose Tissue. Obesity: Springer, Cham; 2016.

43. Sarjeant K., Stephens J.M.. Adipogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 4(9).

44. Stephens J. The Fat Controller: Adipocyte Development. PLoS Biol. 2012; 10(11).

45. Zhang Y., Zeng X., Jin S. Autophagy in adipose tissue biology. Pharmacological Research. 2012; 66: 505-512.

46. Saponaro C., Gaggini M., Carli F., Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. Nutrients. 72015. p. 9453-74.

47. Strable M.S., Ntambi J.M. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2010; 45(3): 199-214.

48. Langin D., Dicker A., Tavernier G., Hoffstedt J., Mairal A., Rydén M., *et al*. Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. 2005.

49. Svava Nielsen T.J., Niels. L Jørgensen, Jens Otto. Møller, Niels. Lund, Sten. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. Journal of Molecular Endrocrinology. 2014; 52(3): R199–R222.

50. Irecta Najera, Guadalupe del Carmen. Mecanismos moleculares de la obesidad y el rol de las adipocinas en las enfermedades metabólicas. Rev Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2016; 35.

51. Moreno Navarrete, J.M. Adipocyte Differentiation. Adipose Tissue Biology. 2017: 69-90.

52. Penteado F.S.C., Nascimento C.C.H.C., Vasconcelos S.D.D., Camacho A.C.L.F., S.F. N, Nogueira R.I., *.et al*. Evaluation of the biological effects of aqueous extracts from the leaf of *Bauhinia Blakeana* Dunng. World Journal Of Pharmaceutical And Medical Research 2017; 3(8): 01-8.

53. Torres Colín, Rodrigo. Lorena Can, Lilia. El género *Bauhinia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae) en la península de Yucatán (México, Belice y Guatemala). Revista mexicana de biodiversidad. 2009; 80(2): 293- 301.

54. Parveen S.A.H., Syed. Khan, Neelofar. *Bauhinia variegate* Linn. : Traditional and Scientific Validation. Advances in Bioresearch. 2016; 8(1): 78-83.

55. Lau C.P., Ramsden L., Saunders R.M. Hybrid origin of "*Bauhinia blakeana*" (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. Am J Bot. 2005; 92(3): 525-533.

56. Kumar V., Rathore K., Jain P., Ahmed Z. Biological activity of *Bauhinia racemosa* against Diabetes and Interlinked Disorders like Obesity and Hyperlipidemia. Clinical Phytoscience. 2017; 3 (1): 1-9.

57. Andréia C., Fernandes S., Vanderlei F., Marianne P.S., *et al*. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016; 2016: 1-8.

58. Rajani G.P., Ashok P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. Indian J Pharmacol. 2009; 41 (5): 227-232.

59. Kumar P., Baraiya S., Gaidhani S.N., Gupta M.D., Wanjari M.M. Antidiabetic activity of stem bark of *Bauhinia variegata* in alloxan-induced hyperglycemic rats. J Pharmacol Pharmacother. 32012. 64-66.

60. Balamurugan G.P.M. Antiobesity effect of *Bauhinia variegata* bark extract on female rats fed on hypercaloric diet. Bangladesh Journal of Pharmacology. 2010; 5(1): 8-12.

61. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018; 2018 (6).

62. PubChem. Propidium iodide 2019 [Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/.

63. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. Exp Cell Res. 2002; 277(1): 1-14.

64. Kraus N.A., Ehebauer F., Zapp B., Rudolphi B., Kraus B.J., Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. http://dxdoiorg/101080/2162394520161240137. 2016.

65. Howard G.O., Kehinde. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. Cell. 1974; 1 (3): 113-116.

66. Sun X.Y., Katsube, T. Shiwaku, K. Effects of quercetin derivatives from mulberry leaves: Improved gene expression related hepatic lipid and glucose metabolism in short-term high-fat fed mice. Nutr Res Pract. 2014; 9 (2): 137-143.

67. Harmon A.W., Harp J.B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280(4): C807-813.

68. Feve B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2005; 19 (4): 483-499.

69.Chin-Lin, Yen. Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. J Agric Food Chem. 2007; 55 (21).

70. Hamden K., Mnafgui K., Amri Z., Aloulou A., Elfeki A. Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats. Sci Pharm. 2013; 81 (1): 233-246.

71. Habtemariam S. Antihyperlipidemic components of Cassia auriculata aerial parts: identification through *in vitro* studies. Phytother Res. 2013; 27(1): 152-155.