



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIADIPOGÉNICO DE  
COMPUESTOS DE COORDINACIÓN SOBRE LA LÍNEA  
CELULAR 3T3.***

*Tesis*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**PRESENTA**

**Tannya Karen, Castro Jimenez**



**MÉXICO, D.F. a septiembre AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Francisco Hernández Luis
VOCAL:	Profesor: María Eva González Trujano
SECRETARIO:	Profesor: Francisco Sánchez Bartéz
1er. SUPLENTE:	Profesor: Martha Patricia Neri Páez
2º SUPLENTE:	Profesor: María Isabel Gracia Mora

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA (UNIPREC).  
FACULTAD DE QUÍMICA, CONJUNTO E, UNIVERSIDAD 3000, CIUDAD UNIVERSITARIA, COYOACÁN, 04350, CIUDAD DE MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.

ASESOR DEL TEMA: M EN C. FRANCISCO SÁNCHEZ BARTÉZ\_\_\_\_\_

SUPERVISOR TÉCNICO: M EN C. MARÍA ISABEL GRACIA MORA\_\_\_\_\_

SUSTENTANTE: TANNYA KAREN CASTRO JIMÉNEZ\_\_\_\_\_

# 1 Índice

## Tabla de contenido

<b>1</b>	<b>Índice.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
3.1	Justificación.....	7
3.2	Hipótesis.....	8
3.3	Objetivos.....	8
3.3.1	<i>General</i> .....	8
3.3.2	<i>Específicos</i> .....	8
<b>4</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>9</b>
4.1	La obesidad en México.....	9
4.2	Síndrome Metabólico.....	12
4.3	Diabetes.....	13
4.4	Hipertensión.....	16
4.5	Dislipidemias.....	18
4.6	Tejido adiposo.....	19
4.7	Diferenciación adipogénica <i>in vitro</i> .....	20
4.8	Importancia de los compuestos de coordinación.....	23
4.9	Evaluación de un fármaco.....	24
4.10	Investigación y desarrollo.....	25
4.11	Etapa preclínica.....	25
4.12	Etapa clínica.....	26
<b>5</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>27</b>
5.1	Reactivos:.....	27
5.2	Compuestos a evaluar:.....	28
<b>6</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Apéndice.....</b>	<b>58</b>
10.1	Definiciones.....	58

## 2 Abreviaturas

**C -LDL:** Colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

**HAS:** Hipertensión Arterial Sistémica.

**IDL:** Lipoproteína de densidad intermedia.

**IRO:** Incorporación de rojo oleoso.

**IMC:** Índice de Masa Corporal.

**HC:** Hidratos de Carbono.

**Kcal:** Kilocaloría.

**cal:** Caloría.

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

**Kg/m<sup>2</sup>:** Kilogramos por metro de estatura al cuadrado.

**Lp:** Lipoproteínas.

**Kg:** Kilogramo.

**g:** Gramos.

**mg:** Miligramo.

**µg:** Microgramo.

**mg/día:** Miligramos por día.

**mg/dL:** Miligramos por decilitro.

**ml/día:** Mililitros por día.

**mL:** Mililitro.

**mm de Hg:** Milímetros de mercurio.

**mmol/l:** Milimoles por litro.

**m:** Metro.

**h:** Horas.

**min:** Minutos.

**TG:** Triglicéridos.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

**DM:** *Diabetes mellitus*.

**DMT-2:** *Diabetes mellitus* Tipo 2.

**EVC:** Enfermedad cerebro vascular.

**FR:** Factor de riesgo.

**HTA:** Hipertensión arterial.

**%:** Por ciento.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**P.A.:** Presión arterial.

**PAD:** Presión arterial diastólica.

**PAS:** Presión arterial sistólica.

**>** Mayor que.

**<** Menor que.

**≥** Mayor o igual que.

### 3 Introducción

Uno de los principales problemas de salud en el mundo, y México no es la excepción, es la obesidad; la cual esta asociada causalmente a otras patologías como cardiovasculares, diabetes tipo 2 y una deteriorada calidad de vida. Todo lo anterior implica un fuerte impacto en la inversión de gasto público destinado a la atención de la salud. Nuestro país es líder, ocupa el primer lugar tanto en obesidad infantil como adulta por lo que existe un incremento en la investigación enfocada a desarrollar nuevos fármacos que prevengan y controlen esta condición. A pesar del gran intento por desarrollar nuevos fármacos que contrarresten la obesidad, muchos de ellos han sido retirados del mercado debido a sus reacciones adversas. Por lo que el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que coadyuven al tratamiento de la obesidad cobra importancia; sin embargo será necesario demostrar calidad, eficacia, seguridad, fases preclínicas y clínicas, donde los modelos de cultivo celular resultan una buena prueba de cernimiento primario. Así pues, las células 3T3-L1 poseen una morfología de tipo fibroblasto de ratón con capacidad de diferenciarse a adipocitos en condiciones de exposición a dexametasona, isobutilmetilxantina e insulina. Este cultivo celular es ampliamente utilizado como modelo en investigaciones referentes al tejido adiposo y al metabolismo. Con los modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, se busca la semejanza con eventos clínicos; así pues, en este trabajo se eligió un modelo *in vitro* para evaluar la actividad que poseen una serie de nuevos compuestos metálicos sintetizados bajo la hipótesis racionalizada de que pudieran tener actividad antiadipogénica. Los resultados son prometedores.

El síndrome metabólico es el conjunto de enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan la probabilidad de padecer enfermedad cardiovascular o *diabetes mellitus* 2<sup>1, 2, 3, 4</sup>, tiene la concordante característica de obesidad central y una resistencia a la insulina<sup>5</sup>, tales como: la hipertensión, dislipidemias e hiperglucemia.

El 1er. lugar a nivel mundial en obesidad infantil como adulta que presenta México<sup>6</sup> es preocupante. De forma general, este problema ha promovido la investigación y desarrollo de varios tratamientos farmacológicos para tratar esta enfermedad<sup>7</sup>. Sin embargo, a pesar del descubrimiento de más de una decena de hormonas y péptidos que regulan el apetito, aún no se ha podido frenar a la obesidad<sup>8</sup>. Actualmente no existe un medicamento que controle la obesidad, sin embargo sabemos que existen moléculas que coadyuvan a su tratamiento como el picolinato de cromo<sup>9</sup>. Debido a esto es que se están buscando nuevas combinaciones de fármacos alternativos como los suplementos, fitofármacos para la terapia a largo plazo, la reducción de la ingesta de alimentos y disminución del peso corporal. Uno de los objetivos terapéuticos es la investigación de compuestos que modulen la disponibilidad de serotonina en el cerebro. Este neurotransmisor juega un papel importante en la saciedad y en su proceso después de las comidas. Por ello, en este proyecto se propone utilizar los ligantes nitrogenados 5-hidroxitriptófano (5-HTP) precursor de la serotonina y m-clorofenilpiperazina (m-CPP) agonista de serotonina<sup>10</sup>, utilizando los metales de transición Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> ya que dichos compuestos pueden ofrecer una mayor estabilidad química, aumentar la biodisponibilidad debido a que son iones metálicos y de esta forma se facilita su absorción; así como la modulación de la serotonina endógena. Por ejemplo, se ha demostrado que el Zn<sup>2+</sup> mejora el desarrollo de algunos defectos metabólicos de la obesidad inducida por la sacarosa, por lo que se propone que el Zn<sup>2+</sup> interviene en la

producción endógena de leptina<sup>11</sup>, que es una hormona que regula el balance energético y que induce la reducción de ingesta de alimento. El mecanismo que poseen estos compuestos de coordinación como terapia para reducir el peso corporal se propone que sea evaluado utilizando un modelo de ratas con obesidad inducida por la dieta, así como mejorar la sensibilidad a leptina en el hipotálamo, por ende mejora notablemente su acción anorexigénica<sup>8</sup>, por lo que podría utilizarse como un fármaco antiobesidad. Dados estos antecedentes se propone sintetizar y caracterizar los compuestos de coordinación de los metales de transición con estos dos ligantes, para estudiar su posible actividad antiobesidad. Los objetivos de este trabajo fueron probar si existe la concentración inhibitoria cincuenta en un rango de concentraciones de 10-50  $\mu\text{g/mL}$ , realizar un seguimiento durante las distintas etapas de diferenciación que presentan los fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 hasta diferenciarse a adipocitos y finalmente evaluar la actividad farmacológica de compuestos de coordinación con posible efecto antiadipogénico *in vitro* en cultivo celular. Se evaluaron 25 compuestos con la línea celular 3T3-L1 antes y posterior a la diferenciación, obteniéndose resultados interesantes para los compuestos 5-HTP01Co, 5-HTP03Co, mCPP, mCPP02Co, LORE020,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en el tratamiento de prediferenciación, y para los compuestos 5-HTP02Co, 5-HTP08Cu, mCPP02Co, mCPP09Cu, PicCr,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para el tratamiento postdiferenciación; la estructura química de dichos compuestos no se muestran en el presente trabajo debido a que en un futuro se busca obtener la patente de los mismos para emplearlos con fines terapéuticos.

### 3.1 Justificación

La obesidad representa uno de los principales problemas de salud y económicos en México. Nuestro país es el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil y en obesidad en adultos. Esto es consecuencia de varios factores como son: hábitos alimenticios, sedentarismo, susceptibilidad

genética, así como algunos factores sociales, culturales y económicos. El problema de obesidad representa un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades crónico degenerativas como:

- ❖ Resistencia a la insulina y DMT-2
- ❖ Dislipidemias
- ❖ Hipertensión y enfermedades cardiovasculares
- ❖ Síndrome metabólico

Debido a esto es que se ha destinado una gran cantidad de recursos públicos para el manejo, control y prevención de la obesidad.

### 3.2 Hipótesis

Los compuestos de coordinación 5HTP, 5HTP01Co, 5HTP02Co, 5HTP03Co, 5HTP04Ni, 5HTP05Ni, 5HTP06Ni, 5HTP07Cu, 5HTP08Cu, 5HTP09Cu, 5HTP10Zn, 5HTP11Zn, 5HTP12Zn, mCPP, mCPP01Co, mCPP02Co, mCPP06Ni, mCPP09Cu, mCPP11Zn, , LORE020,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ,  $\text{CuBr}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Picolinato de cromo inhiben la actividad adipogénica en fibroblastos del ratón.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 General

- ❖ Implementar en el laboratorio el modelo de diferenciación adipogénica con fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 *in vitro* para emplearlo como modelo en el cernimiento primario de eficacia antidiogénica de nuevas moléculas.

#### 3.3.2 Específicos

- ❖ Determinar la  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos de coordinación sobre la línea celular 3T3-L1 *in vitro*.
- ❖ Determinar el efecto de los compuestos de coordinación sobre la previa y posterior diferenciación adipogénica de línea celular 3T3-L1 *in vitro*.

## 4 Antecedentes

### 4.1 La obesidad en México

Las principales causas de muerte en México según encuestas obtenidas del gobierno del Distrito Federal se enlistan en la Tabla 1, resaltando en rojo las importantes para este proyecto.

Tabla 1. Principales causas de muerte en hombres y mujeres adultos en México.

Principales causas de muerte*					
Mujeres			Hombres		
Orden	Causa	%	Orden	Causa	%
<b>1</b>	<b>Diabetes mellitus</b>	16.4	<b>1</b>	<b>Diabetes mellitus</b>	11.3
<b>2</b>	<b>Enfermedades isquémicas del corazón</b>	11.1	<b>2</b>	<b>Enfermedades isquémicas del corazón</b>	10.9
<b>3</b>	<b>Enfermedad cerebrovascular</b>	6.7	3	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	8.4
4	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	4.2	<b>4</b>	<b>Enfermedad cerebrovascular</b>	4.7
5	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	3.5	5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	4
<b>6</b>	<b>Enfermedades hipertensivas</b>	3.5	6	Accidentes de vehículo de motor (transito)	3.8
7	Infecciones respiratorias agudas bajas	3.3	7	Agresiones (homicidio)	3.3
8	Nefritis y nefrosis	2.7	8	Infecciones respiratorias agudas bajas	3
9	Asfixia y trauma al nacimiento	2.3	9	Asfixia y trauma al nacimiento	2.6
10	Tumor maligno del cuello del útero	2.1	10	Nefritis y nefrosis	2.5

\*Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud. El peso de la enfermedad de las mujeres en México, 2005.

### Cambios en el gasto en alimentos en el hogar

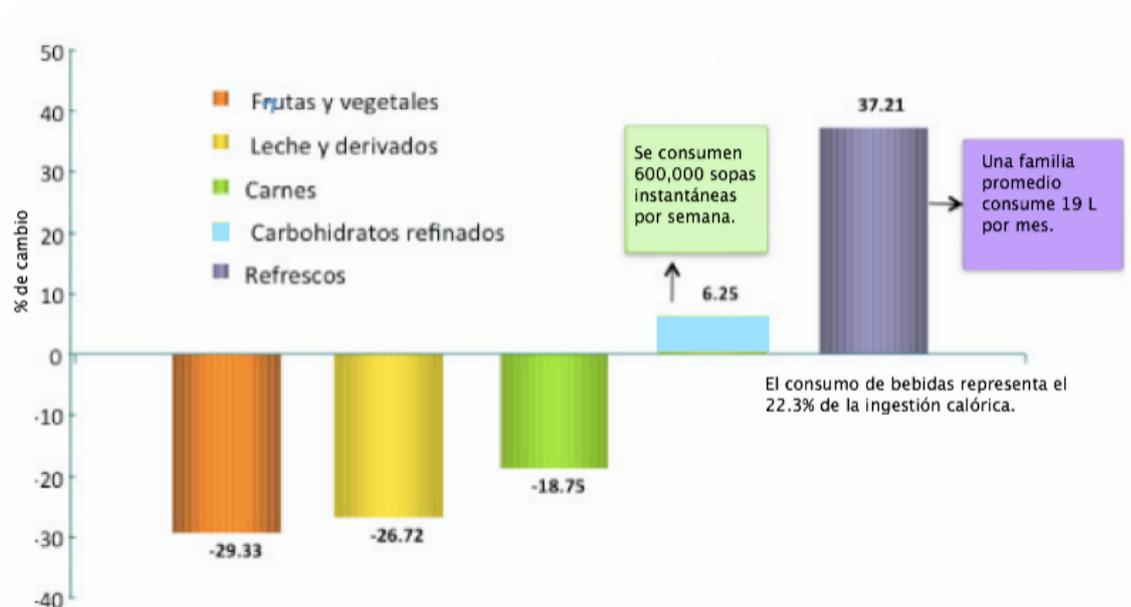


Figura 1. Ingesta alimenticia de acuerdo a los cambios en el gasto en alimentos en el hogar, Public Health Nutrition, 2002.

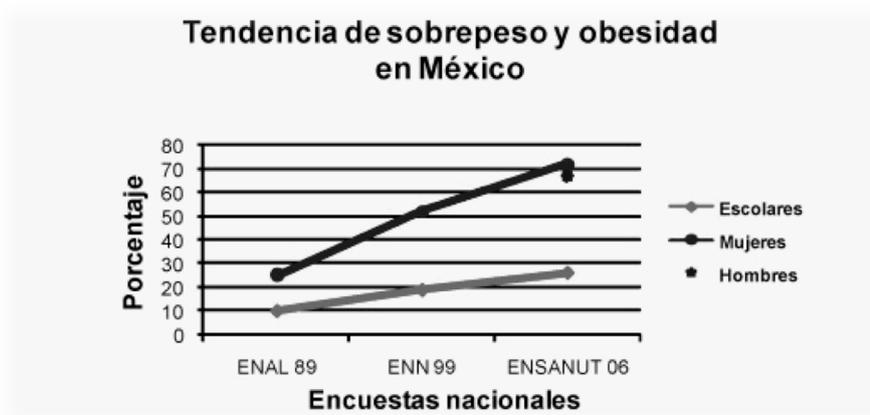


Figura 2. Tendencia de sobrepeso y obesidad en México

En cuanto al aporte de alimentos ingeridos debe ser siempre el suficiente para proporcionar las necesidades metabólicas del cuerpo y no excesivo como para provocar obesidad<sup>12, 13</sup>. Por lo mencionado anteriormente, la

obesidad es producida debido a la acumulación de tejido adiposo, como consecuencia del desequilibrio entre la ingesta energética y el gasto energético <sup>14, 15, 16</sup>.

Como se observa en la figura 3 la tendencia de sobrepeso y obesidad, particularmente en mujeres ha incrementado significativamente desde la encuesta nacional de ENAL 1989 hasta la encuesta más reciente que es la de ENSANUT 2006 <sup>17, 18</sup>.

Primordialmente, hay que distinguir el término sobrepeso del término obesidad; la obesidad se define como el almacenamiento en exceso de tejido adiposo <sup>14</sup>, una medida indirecta de esta, universalmente aceptada es el índice de masa corporal (IMC), el cual establece una relación entre el peso y la altura en metros al cuadrado,  $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m}^2\text{)}$ . Esta se determina en las personas adultas con un  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$  y en menores de 19 años con un IMC desde la percentil 95 en adelante <sup>19, 20</sup>.

El sobrepeso se define como un exceso de peso corporal comparado con la talla <sup>20</sup> y este se determina en personas adultas con un  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$  y  $< 29.9$ , en menores de 19 años con el IMC desde el percentil 85 y por debajo de la 95 <sup>21</sup>.

La obesidad puede ser caracterizada en dos tipos principales:

Hiperplásico, el cual se refiere al aumento en el número de adipocitos e hipertrófico que es el aumento en el volumen de los adipocitos <sup>20</sup>.

## 4.2 Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico se caracteriza por un conjunto de factores como lo son: la obesidad, la hipertensión, dislipidemias e hiperglucemia. El diagnóstico de este, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1988, requiere la presencia de al menos tres de los siguientes componentes <sup>14</sup>:

- 1) La circunferencia de la cintura aumentada\*.

Tabla 2. Valores de la circunferencia de la cintura aumentada reportados para la población mexicana.

Valores de circunferencia de la cintura	
Bajo riesgo	≤79 cm mujeres ≤93 cm hombres
Riesgo incrementado	80-87 cm mujeres 94-101 cm hombres
Alto riesgo	≥88 cm mujeres ≥102 cm hombres

\*Gutierrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martinez M, Hernandez-Avila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.

- 2) Los niveles de triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl.
- 3) Colesterol HDL  $< 40$ mg/dl para los hombres y  $< 50$  mg/dl para las mujeres.
- 4) La presión arterial elevada  $\geq 130/85$  mmHg.
- 5) El nivel de glucosa en ayunas  $\geq 110$ mg <sup>22, 23</sup>.

Las personas que presentan síndrome metabólico tienen el doble de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, también a este se le atribuye un aumento en el riesgo de *diabetes mellitus* tipo 2 <sup>24</sup>.

La ingesta de alimentos ricos en grasa y la ausencia de actividad física favorecen el desarrollo del síndrome metabólico <sup>25</sup>.

### 4.3 Diabetes

Según estadísticas del 2005 del gobierno del Distrito Federal, la *diabetes mellitus* se encuentra en la principal causa de muerte en México, esta estadística incluye tanto a hombres como a las mujeres <sup>19</sup>. En el año 2025 <sup>24</sup>, se espera que cerca de 11.7 millones de mexicanos tengan diabetes.

Es reconocida por la OMS como una amenaza mundial y se calcula que en el mundo existen mas de 180 millones de personas con diabetes, se piensa que esta cifra aumentará a más del doble para 2030 <sup>21</sup>.

Se considera a la *diabetes mellitus* como un desorden metabólico de carbohidratos; esta es una alteración de la cantidad de insulina (disfunción de células  $\beta$  pancreáticas), así como de su función (resistencia a la insulina). Es una enfermedad crónica relacionada con el funcionamiento del páncreas; esta es una glándula que se encuentra debajo del estómago y esta conectada al tubo digestivo; tiene dos funciones: fabricar jugos gástricos que ayudan en la digestión y producir hormonas como la insulina, el glucagón y el polipéptido pancreático <sup>26</sup>.

La OMS (2011) define a la diabetes como una enfermedad crónica que ocurre debido a que el páncreas no produce suficiente insulina, o cuando el cuerpo no puede utilizar de manera optima la insulina que produce.

Para poder detectar si una persona padece diabetes, es necesario revisar los niveles de glucosa en la sangre (glucemia).

Para ello se pueden realizar dicha medición con distintas pruebas, algunas de ellas son:

- ❖ La toma de glucemia capilar
- ❖ Prueba de fructosamina o hemoglobina glicosilada.

La prueba de fructosamina nos da resultados de los niveles de glucosa de dos a tres semanas anteriores al estudio y la prueba de hemoglobina glicosilada nos da un resultado de los niveles de glucosa de los últimos tres meses.

Los niveles para diagnosticarla son los siguientes: glucemia mayor a 270 mg/dL con un ayuno de al menos 8 h <sup>27</sup>.

Tipos de diabetes

A continuación se hablará de tres tipos de diabetes: Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 y Diabetes gestacional.

***Diabetes mellitus tipo 1:*** Se conocía anteriormente como diabetes insulino dependiente, esta deriva de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreinmune, generando deficiencia de insulina <sup>28, 29</sup>.

Cuando se han perdido aproximadamente 80% de las células  $\beta$  es suficiente controlar la glucemia con pequeñas dosis de insulina, o con una adecuada alimentación, actividad física y teniendo control de los niveles de colesterol, así como de la presión arterial. En la etapa en que se han destruido por completo las células  $\beta$ , el tratamiento consiste en la aplicación de insulina principalmente.

Algunas complicaciones crónicas de la *diabetes mellitus* tipo 1, se dividen en

- ❖ Microangiopatias: nefropatías, retinopatías, neuropatías.
- ❖ Macroangiopatias: afectación coronaria, cerebrovascular y vascular periférica <sup>30</sup>.

### ***Diabetes mellitus* tipo 2**

Se conocía anteriormente como diabetes no insulino dependiente, es la más frecuente, es caracterizada por deficiencia de insulina relativa (el páncreas no produce nada o produce insuficiente insulina, o no tiene la capacidad para usar eficazmente la insulina que produce) <sup>31, 29</sup>.

Esta comienza con resistencia a insulina, la cual es definida como sensibilidad disminuida o falta de respuesta a las acciones metabólicas de la insulina, como la disposición de glucosa e inhibición de la producción hepática de glucosa . Se caracteriza por:

- ❖ La disminución de la captura de glucosa
- ❖ La disminución en la síntesis hepática de glucógeno
- ❖ El aumento en la producción hepática de glucosa.

Las personas con estas enfermedades presentan altos niveles de ácidos grasos libres en plasma; así como alteraciones del metabolismo de lípidos y glucosa. Por lo anterior, en la diabetes tipo 2 los adipocitos no aprovechan la insulina de manera adecuada y se caracteriza por los siguientes síntomas <sup>32</sup>.

- ❖ Polidipsia: Aumento en la ingesta de líquidos.
- ❖ Polifagia: Aumento en la ingesta de alimentos.

- ❖ Poliuria: Aumento en la pérdida urinaria.
- ❖ Agotamiento.
- ❖ Disminución de peso.

En este caso no es necesaria la aplicación de insulina; sin embargo hay ciertos medicamentos que ayudan en su control.

### **Diabetes gestacional**

Se desarrolla solamente durante el embarazo; se presenta entre las 24 y 28 semanas de gestación y desaparece con el parto, esta no es causada por falta de insulina; si no debido a los efectos de las otras hormonas.

Los niveles para presentarla son:  $\geq 105$  mg/dl con una repetición de la prueba por duplicado.

Entre las complicaciones para la madre se encuentran hipertensión, infecciones urinarias y vaginales. Las complicaciones para el neonato están la muerte intrauterina, hemorragia intracraneal y alteraciones metabólicas <sup>29</sup>.

### **4.4 Hipertensión**

Este padecimiento por general no presenta síntomas, esto hace difícil su detección <sup>33</sup>. La función de la circulación sanguínea es la de transportar nutrientes a los tejidos, transportar productos de desecho para su eliminación así como transportar hormonas <sup>34</sup>.

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre en las paredes arteriales, esta determinada por: la fuerza de la contracción ventricular, resistencia vascular, volumen y viscosidad de la sangre; así como la elasticidad de las paredes arteriales <sup>34, 35</sup>. En la toma de la presión arterial se considera:

- ❖ La presión arterial sistólica: ésta se registra durante la sístole ventricular, que indica la integridad del corazón y las arterias.
- ❖ La presión arterial diastólica: ésta se registra durante la diástole ventricular, que indica de modo directo la resistencia que están ejerciendo los vasos sanguíneos al flujo proveniente del corazón.

La presión arterial se mide en milímetros de mercurio (mmHg) con ayuda de un esfigmomanómetro y un estetoscopio, comúnmente se realiza la medición en la arteria humeral, con menor frecuencia se realiza en la poplítea o en la radial; sin embargo se puede realizar en ellas<sup>33</sup>. En la regulación intrínseca de la presión arterial intervienen diversos sistemas como: el s. nervioso simpático, hormonal y renal. Sin embargo factores como la obesidad, la composición de la dieta, ingesta excesiva de bebidas alcohólicas y hábitos como el de fumar, tienen un efecto directo sobre la presión arterial<sup>36</sup>.

Tabla 3. Rangos de presión arterial diastólica y sistólica

Categoría	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)
Normal	80	120
Normal alta	85-89	130-139

La hipertensión arterial (HTA) en adultos es la elevación de la presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y la presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg. La OMS distingue tres categorías de HTA ligera, moderada y severa<sup>33</sup>. (Tabla 4)

Tabla 4. Niveles de presión diastólica y sistólica clasificado en tres categorías

Categoría	Diastólica (mmHg)	Sistólica (mmHg)
Ligera	90-99	140-159
Moderada	100-109	160-179
Severa	≥110	≥180

#### 4.5 Dislipidemias

Son trastornos en los lípidos en la sangre, que se caracterizan por un aumento de los niveles de colesterol (hipercolesterolemia) así como aumento en la concentración de triglicéridos.

Estos aumentan el riesgo para aterosclerosis, este término se utiliza para denotar si existen concentraciones anormales de colesterol, C-HDL, C-VLDL y TG<sup>37</sup>. La clasificación de Fredrickson divide a las hiperlipidemias en seis grupos, según los patrones de aumento de lípidos y de lipoproteínas: I, IIa, IIb, III, IV y V<sup>38</sup>.

Tabla 5. Clasificación de hiperlipidemias según Fredrickson.

Tipo	Lipoproteína aumentada	Lípidos aumentados
I	Quilomicrones	Triglicéridos
IIa	LDL	Colesterol
IIb	LDL y VLDL	Colesterol y triglicéridos
III	VLDL y residuos de quilomicrones	Triglicéridos y colesterol
IV	VLDL	Triglicéridos
V	Quilomicrones y VLDL	Triglicéridos y colesterol

Como se mencionó anteriormente, las hiperlipidemias que se caracterizan por la presencia de HDL correlacionan positivamente con el aumento en la incidencia de síndrome metabólico, por lo que es importante determinar el tipo de hiperlipidemias en los pacientes afectados. Por otro lado, las dislipidemias son patologías encontradas en la obesidad, por lo cual hay que realizar pruebas que respalden o eliminen la incertidumbre de ser candidatos positivos.

#### 4.6 Tejido adiposo

La principal función del tejido adiposo es almacenar los triglicéridos hasta que sean necesarios para aportar energía; sin embargo investigaciones recientes muestran que también tiene función reguladora, autocrina, paracrina y endocrina, además de participar en la homeostasis de glucosa, en el metabolismo de lípidos; y en procesos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios<sup>39</sup>. Entre sus componentes celulares tenemos adipocitos,

preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales y células madre multipotentes capaces de diferenciarse en varios tipos celulares<sup>40</sup>.

Las células grasas del tejido adiposo son fibroblastos modificados, capaces de almacenar triglicéridos, los adipocitos además de almacenar grasas, pueden almacenar hormonas a base de lípidos y producir varias moléculas de señalización. Los componentes del tejido adiposo humano son:

- ❖ Tejido adiposo blanco (WAT por sus siglas en inglés). Está diseñado para el almacenamiento rápido y liberación de lípidos, contienen una gota de lípidos (LD), también contienen otro tipo de células como los macrófagos y monocitos.
- ❖ Tejido adiposo marrón (BAT por sus siglas en inglés, representa el 1% de tejido en humanos adultos), contienen múltiples gotas LD<sup>39</sup>.

#### 4.7 Diferenciación adipogénica *in vitro*

La adipogénesis, es el proceso de diferenciación de las células por el cual los preadipocitos se convierten en adipocitos. Es un proceso de múltiples etapas que implica una cascada de factores de transcripción y proteínas del ciclo celular, que regulan la expresión de genes involucrados en la diferenciación. El estudio de la adipogénesis se ha desarrollado ampliamente en los últimos 25 años<sup>40</sup>. Las líneas celulares utilizadas en los modelos *in vitro* de la adipogénesis se pueden dividir en tres categorías:

- ❖ Las células embrionarias totipotentes capaces de generar todos los tipos celulares.
- ❖ Las células multipotentes que pueden diferenciarse a miocitos, adipocitos y condroicitos.
- ❖ Las células ya comprometidas, estas se diferencian a la línea adiposa y son denominadas líneas celulares diferenciadas, las cuales pueden ocuparse en estudios de medicina y evaluación farmacológica<sup>41</sup>.

Las líneas celulares utilizadas más frecuentemente son líneas celulares de preadipocitos 3T3-L1 y 3T3-F442A, estas fueron clonadas a partir de células 3T3 heterogéneas derivados de embriones de ratón. Las células 3T3-L1 dejan de crecer cuando han alcanzado una monocapa confluyente.

El modelo de adipogénesis utilizado en el laboratorio fue exposición de fibroblastos 3T3-L1 con una mezcla de glucocorticoides como la dexametasona (DX), isobutimetilxantina (IBMX) e insulina durante 48h<sup>42</sup>.

Los glucocorticoides (GCS) son potentes inductores de la adipogénesis. La IBMX incrementa la concentración intracelular de AMPc. La dexametasona es un poderoso inductor de la adipogénesis en las primeras etapas de la diferenciación; sin embargo muestra efectos antiadipogénicos al añadirla en etapas posteriores a la diferenciación del fibroblasto<sup>43</sup>. La insulina es un regulador negativo de los niveles de mRNA promoviendo la transición de fase Go a fase G1 del ciclo celular. Estas tres vías concluyen en la activación de genes específicos de adipocitos que codifican factores secretados<sup>44</sup> (Figura 3).

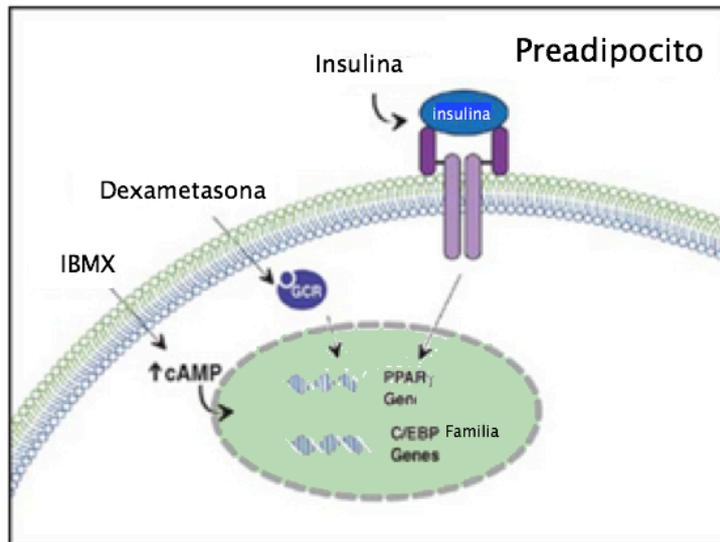


Figura 3. Mecanismos de regulación en la adipogénesis *in vitro*

Tabla 6. Mecanismo de acción de los componentes de la mezcla inductora de adipogénesis.

Compuesto	Efecto	Mecanismo de acción
Insulina	+	Acelera la acumulación de lípidos.
Glucocorticoide	+	Excepto en la línea celular 3T3-F442A.

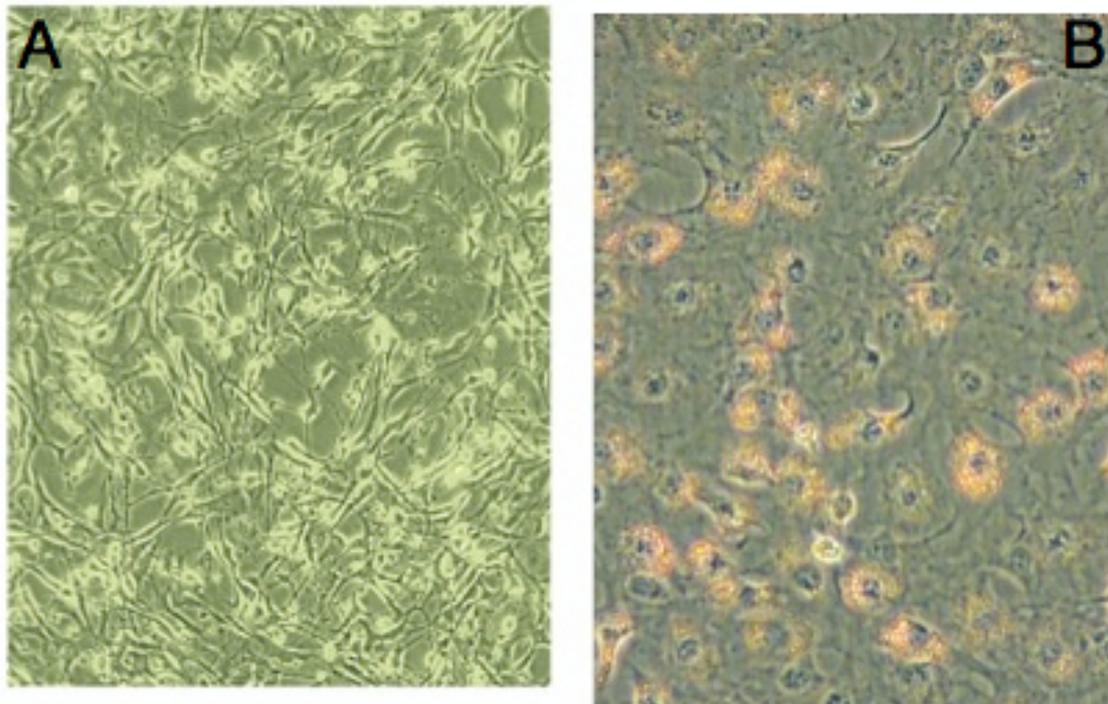


Figura 4. Células 3T3-L1 "A" sin diferenciarse, "B" células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos y teñidas con rojo oleoso.

#### 4.8 Importancia de los compuestos de coordinación.

Los metales de transición poseen dos funciones principales: (i) Como elementos inorgánicos que llevan a cabo ciertas funciones en los sistemas vivos como ser cofactores de la cadena respiratoria entre otras actividades biológicas y (ii) la introducción de ciertos metales en los sistemas biológicos como agentes de diagnóstico y fármacos como en cisplatino ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ )<sup>45</sup>.

En este proyecto se propuso el uso de bioelementos, que son átomos o moléculas que tienen una gran relevancia en procesos biológicos como lo son la fotosíntesis, el metabolismo, la respiración, etc. Los compuestos utilizados para inhibir la adipogénesis son moléculas de coordinación, lo que disminuye la toxicidad del componente metálico y potencia su actividad farmacológica<sup>46</sup>.

Se sabe por investigaciones recientes, que el uso de serotonina como ligante del componente metálico en los compuestos de coordinación juega un papel importante modulando la sensación de saciedad alimenticia; así mismo se usan precursores de ésta (como triptófano y 5-hidroxitriptofano 5-HTP); la administración de 5-HTP resulta en un incremento significativo en los niveles de insulina y algunas hormonas<sup>47</sup>. Por todo lo anterior, en el grupo de trabajo de la Dra. Barba en colaboración con la UNIPREC (Unidad de Investigación Preclínica) tenemos el interés de estudiar la interacción que tienen los iones metálicos de transición con fármacos que se cree tienen propiedades de interés biológico. Por lo cual en este proyecto se evalúo el uso del ligante del componente metálico en los compuestos de coordinación<sup>48</sup> en el cultivo celular 3T3-L1 como modelo la inhibición de la adipogénesis<sup>49</sup>.

#### 4.9 Evaluación de un fármaco

Los estudios preclínicos son llevados a cabo para evaluar la seguridad y eficacia de un fármaco nuevo; así como evaluar la farmacodinamia, la farmacocinética y toxicidad. Por ello es importante que antes de que un medicamento se pueda administrar a los seres humanos, se realicen estas investigaciones en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>50, 51, 52, 53</sup>.

Los estudios de seguridad y eficacia comienzan con diversos experimentos denominados estudios preclínicos realizados exclusivamente en el laboratorio (ya sea en animales o en cultivo celular), tiene como objetivo demostrar la farmacodinamia y la aparición de efectos tóxicos<sup>50, 51, 52, 53</sup>.

La figura 5 nos muestra de manera general las etapas a seguir en el desarrollo de un fármaco, destacando en color rojo las etapas que nos competieron en la UNIPREC para la realización de este proyecto.



Figura 5. Diagrama de flujo de las etapas a seguir en el desarrollo de un fármaco. “adaptado de Guías de desarrollo preclínico, 2012.”

#### 4.10 Investigación y desarrollo

La obtención de una nueva molécula puede ser de diversos orígenes: vegetales (terrestres o marinos), animales (terrestres o marinos), microorganismos y síntesis química. A su vez el procedimiento de búsqueda para nuevas moléculas puede ser de las siguientes formas:

- ❖ Serendipia (casualidad)
- ❖ Cernimiento biodirigido
- ❖ Cernimiento de alta capacidad
- ❖ Síntesis química tradicional o combinatorio
- ❖ Diseño asistido por computadora

Una vez que la molécula ha sido extraída de fuentes naturales o sintetizada, siguen las etapas preclínicas y clínica<sup>51, 53</sup>.

#### 4.11 Etapa preclínica

Se realizan estudios para probar sustancias bioactivas de diversas formas como: eficacia *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, *in silico*, toxicidad del fármaco, potencial teratogénico, carcinogénico, y potencial de daño genético<sup>53, 51, 52</sup>. El

objetivo principal y fundamental en los estudios preclínicos es conocer los indicadores de seguridad de la molécula candidato, ya que la dosis que se utiliza en los primeros estudios en seres humanos se determina tras una cuidadosa valoración de las características: farmacocinéticas, farmacológicas y toxicológicas obtenidas en esta etapa.

Los estudios preclínicos también ayudan a recabar información, lo más completa posible, para que las agencias reguladoras dispongan de los datos requeridos para permitir la realización de los ensayos clínicos en seres humanos, que constituyen la última etapa del desarrollo de un fármaco.

#### 4.12 Etapa clínica

Una vez que ya fueron realizados los estudios preclínicos en líneas celulares y animales, se procede a estudios clínicos en humanos, con la finalidad de demostrar la seguridad y eficacia y orientar cual sería la forma de administración más adecuada<sup>52, 51, 32, 53</sup>. Los estudios clínicos se dividen en cuatro fases:

Fase I: Pretende demostrar la seguridad del compuesto y orientar en la vía de administración más adecuada.

- ❖ Se administra a humanos por primera vez.
- ❖ Adultos sanos.
- ❖ Grupos pequeños.

Fase II: Proporcionar información preliminar acerca de la eficacia, se establece la relación dosis-respuesta, se considera esta etapa como estudios terapéuticos exploratorios.

- ❖ Se administra a pacientes por primera vez.
- ❖ Pacientes entre 18 y 45 años.
- ❖ Grupos de 80-100 pacientes.

Fase III: Evaluar seguridad y eficacia en condiciones de uso habituales.

- ❖ Se administra a pacientes.
- ❖ Subpoblaciones.
- ❖ Grupos de cientos a miles.

Fase IV: Se realiza después de la comercialización del medicamento, para con ello estudiar las condiciones de uso; también se denomina a esta fase como farmacovigilancia.

- ❖ Uso comercial <sup>53, 51, 52</sup>.

## 5 Materiales y métodos

### 5.1 Reactivos:

- Medio DMEM (“Dulbecco´s modified Eagle´s medium”) de GIBCO con:
  - piruvato de sodio 1 mM
  - glutamina 2 mM
  - aminoácidos no esenciales (0.1mM)
  - gentamicina
  - suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% aminoácidos y 1% de antibiótico.
- Placas de cultivo CORNING de 96 pozos.
- Suero fetal bovino (SFB) CALIFICADO (GIBCO).
- Metilhidroxibutilxantina (SIGMA-Aldrich).
- Dexametasona (SIGMA-Aldrich).
- Insulina bovina (SIGMA-Aldrich).
- Isopropanol (MERCK).
- Etanol ABS (MERCK).
- Rojo Oleoso (SIGMA-Aldrich).
- Antibióticos (GIBCO).

- Aminoácidos no esenciales (GIBCO).
- PBS.
- Lector de placas ELISA.
- Medio de crecimiento para fibroblastos 3T3-L1: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) Antibióticos y 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales, L-glutamina y glucosa 4.5g/L.
- Medio de diferenciación 1: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) Antibióticos y 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales, 0.25μM de dexametasona, 0.5mM de IBMX y 5μg/μL de insulina.
- Medio de diferenciación 2: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) Antibióticos y 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales y 5μg/μL de insulina.
- Medio de mantenimiento de adipocitos: Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) Antibióticos y 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales.

## 5.2 Compuestos a evaluar:

5HTP, 5HTP01Co, 5HTP02Co, 5HTP03Co, 5HTP04Ni, 5HTP05Ni, 5HTP06Ni, 5HTP07Cu, 5HTP08Cu, 5HTP09Cu, 5HTP10Zn, 5HTP11Zn, 5HTP12Zn, mCPP, mCPP01Co, mCPP02Co, mCPP06Ni, mCPP09Cu, mCPP11Zn, Picolinato de cromo, LORE020,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuBr}_2$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

### Protocolo del cultivo celular

La línea celular 3T3-L1 poseen una morfología de tipo fibroblasto de ratón, puede ser estimulada de manera sencilla a su diferenciación a adipocitos; por lo que es un buen modelo celular para el estudio de la adipogénesis. La realización de los experimentos en esta tesis se realizaron de acuerdo a la siguiente estrategia:

1. Implementación del modelo de diferenciación adipogénica con fibroblastos de la línea celular 3T3-L1.
2. Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular
3. Primera etapa de diferenciación adipogénica: se evaluaron los compuestos antes de la diferenciación celular de fibroblastos a adipocitos con tiempos de incubación hasta de 8 días.
4. Segunda etapa de diferenciación adipogénica: se evaluaron los compuestos, adicionándolos después de la diferenciación celular de fibroblastos a adipocitos (día 8) y dejándolos en exposición a estos por 72 h.

### **Cultivo de células 3T3-L1**

#### 1) Descongelamiento de la Línea Celular

Una vez que se retira del ultracongelador el criotubo que contiene a la línea celular se realiza el descongelamiento de las células, frotando suavemente el criotubo con las manos hasta obtener una suspensión. En condiciones asépticas, se prepara un tubo Falcon con 10 mL de medio de lavado F12, este debe estar previamente a temperatura ambiente. Se vierte completamente la suspensión celular descongelada y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se aspira cuidadosamente el sobrenadante y se resuspende el botón obtenido en 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado. Se divide este volumen obtenido en dos cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se prosigue a colocar las cajas en incubación durante 1 hora para favorecer la adhesión de las células, al término de este tiempo se cambia el medio aspirándolo cuidadosamente y colocando 5 mL de medio de cultivo DMEM nuevo, finalmente se dejan incubando a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Es importante que al momento de agregar la suspensión celular descongelada al tubo que contiene el medio de lavado se evite por completo el contacto del criotubo con la boca del tubo falcón, a fin de evitar cualquier tipo de contaminación.

## 2) Proliferación celular

Después de haber sembrado las células se revisan para estimar el porcentaje de confluencia, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas, hasta tener un porcentaje de confluencia entre 70 y 90% se procede a la tripsinización.

## 3) Tripsinización

Se aspira el medio de cultivo de la caja, se agregan 1 ó 3 mL de tripsina-EDTA 0.25%; se incuba a 37°C hasta desprender la monocapa ayudando a ello con agitación. Se detiene la reacción de la tripsina adicionando de 3 a 7 mL de medio de lavado F12, se coloca la suspensión celular en un tubo estéril y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 mL de medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino.

## 4) Cuantificación celular

Se colocan en un tubo de microcentrifuga 80 µL de solución azul tripano y 20 µL de la suspensión celular, se mezcla y se transfieren 15 µL a la cámara de Neubauer, se coloca esta en el microscopio y se utiliza el objetivo de 10x, posteriormente se cuentan el número de células no teñidas, las cuales corresponden a células vivas y se utiliza la siguiente fórmula:

$$C = \bar{N} * 5 * 10,000 * 1$$

Dónde:

C=Células por mililitro.

$\bar{N}$ = Promedio de células contadas vivas.

5= Factor de dilución.

10,000= Factor de conversión de la cámara de Neubauer.

a) Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón se cultivaron a 80% confluencia a 37° C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en cajas de cultivo de 75 cm (segundo pase) con medio DMEM, suplementado con aminoácidos no esenciales (0.1mM), gentamicina y 10% de SFB.

#### **Implementación del modelo de diferenciación adipogénica en fibroblastos de la línea celular 3T3-L1.**

Se realizó lo que denominamos una cinética de las diferentes fases que presenta la línea celular 3T3-L1 al estar sometida al proceso de diferenciación adipogénica, para lo cual se hizo lo siguiente: se siguió con la metodología ya mencionada en el apartado de cultivo de células 3T3-L1 y repitiendo los incisos 1 al 4.

Se prosigue con la proliferación de la línea celular, hasta haber logrado al menos dos pases, se colocaron 100,000 células en tres cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Para la caja denominada 1, se agregaron 5 mL del medio de diferenciación 1 por 24 horas, posteriormente, se cambió a medio de diferenciación 2 por 72 horas y finalmente se cambió a medio de mantenimiento por 72 horas. Se utilizó un control de diferenciación (caja 3) en la que se realizaron tinciones consecutivas en cada cambio de medio. Como control negativo (caja 2) se incubó con DMEM suplementado. Todas las incubaciones se realizaron a 37° C, con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. En el día 8 de incubación se tiñeron las cajas 1 y 2; se adicionaron 300 µL de la solución rojo oleoso al 0.5% en isopropanol, incubándose a temperatura ambiente durante 20 minutos para posteriormente lavarse 2 veces con 300 µL de PBS frío y estéril, las preparaciones se observaron en un microscopio invertido con aumento de 40x y 100x.

#### **Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular**

También se determinó la CI<sub>50</sub>, para la cual se siguió la metodología mencionada en el apartado de cultivo de células 3T3-L1 y repitiendo los incisos 1 al 4. En condiciones asépticas se prepara una suspensión celular de 1,000,000 células por

mL y se agrega 20µL a cada pozo con 80µL de medio suplementado, para así obtener 20,000 células por pozo; se deja incubando 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al concluir el tiempo, se aspira el medio y se agregan 90 µL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 10 µL de cada una de las concentraciones preparadas de los compuestos de coordinación y del control positivo (*Picolinato de Cromo*). La administración de las soluciones a evaluar será como se indica en la Figura 6.

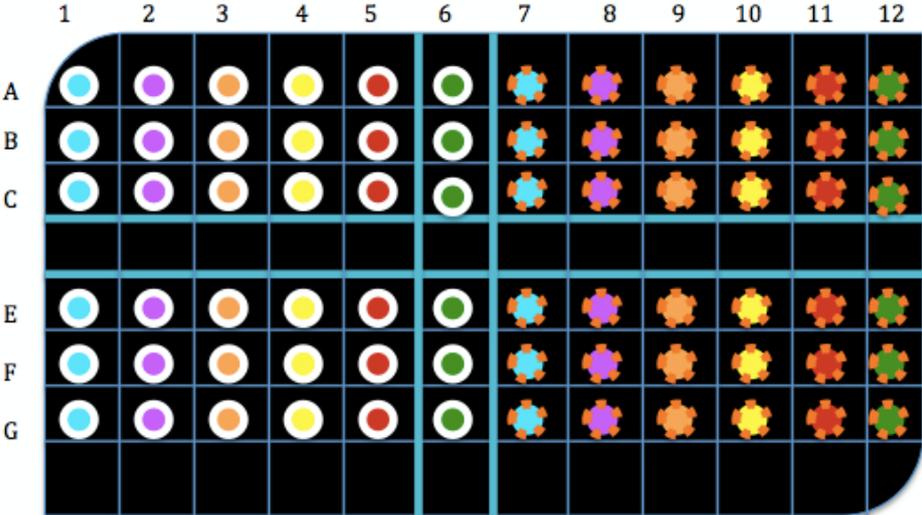


Figura 6. Diagrama de la administración de las soluciones a evaluar para evaluar la inhibición de la proliferación celular, realizado en una placa tipo ELISA de 96 pozos

- 1: Blanco de proliferación compuesto 1
- 2: 10 µg/mL del compuesto 1
- 3: 20 µg/mL del compuesto 1
- 4: 30 µg/mL del compuesto 1
- 5: 40 µg/mL del compuesto 1
- 6: 50 µg/mL del compuesto 1
- 7: Blanco de proliferación compuesto 2
- 8: 10 µg/mL del compuesto 2
- 9: 20 µg/mL del compuesto 2
- 10: 30 µg/mL del compuesto 2
- 11: 40 µg/mL del compuesto 2
- 12: 50 µg/mL del compuesto 2

A los pozos que se emplearon como blancos de proliferación para evaluar la inhibición de la proliferación celular, se agregó solo el medio correspondiente, la línea celular en ausencia de la adición de compuesto de coordinación, realizado en una placa tipo ELISA de 96 pozos. de CO<sub>2</sub>.

Al término de la incubación, se aspira el medio y se fijan las células con 100µL de ácido tricloroacético al 10% durante 1 hora a 4°C, posterior a esto se lavan con agua destilada 5 veces y se deja secar a temperatura ambiente.

#### **Tinción con Sulforrodamina-B y Lectura**

Una vez seca la placa, se adicionan 50µL de solución de Sulforrodamina-B al 0.4% en ácido acético al 1% a cada uno de los pozos, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retira el exceso de colorante lavando con ácido acético al 1% por 5 veces, al término de este se deja secar por completo a temperatura ambiente. Se solubiliza el colorante agregando 100 µL de Tris base 10 mM dejándolo reposar 5 minutos con agitación hasta observar la solubilización y homogenización, se procede a su lectura en un lector de microplacas a una longitud de onda de 564 nm. El porcentaje de viabilidad se determina con la siguiente fórmula, donde AP se refiere a la absorbancia del pozo con el compuesto prueba (*cis*-platino o compuestos de coordinación) y AB, a la absorbancia del pozo correspondiente al blanco de proliferación (sin compuesto) y que se considerará como el 100% de viabilidad.

$$\% \text{ PROLIFERACIÓN CELULAR} = \frac{AP \times 100}{AB}$$

Por último, para conocer el porcentaje de proliferación a cada una de las concentraciones es necesario determinar dicho porcentaje para cada uno de los pozos y obtener el promedio.

### **Tratamiento con los compuestos de coordinación y protocolo de diferenciación de las células 3T3.**

b) Después de la confluencia a 80% (día 0), se realizó el plaqueo, para el cual se hace una suspensión celular para colocar 10,000 células por pozo, agregando el medio de diferenciación 1, y al mismo tiempo agregando los compuestos a evaluar en concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (Etapa 1) Al segundo día se cambió el medio por el medio de diferenciación 2, este se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio de mantenimiento de adipocitos se reemplazó cada dos días, hasta llegar al día 8.

c) Para la segunda etapa del experimento se evaluaron los compuestos, adicionándolos después de la diferenciación celular de fibroblastos a adipocitos (día 8) y dejándolos en exposición a estos por 72 h.

### **Tinción de adipocitos**

Para ambas etapas se realizó la tinción con rojo oleoso, para la cual, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 100 $\mu\text{L}$  de PBS frío y estéril. Se adicionó 200 $\mu\text{L}$  de solución rojo oleoso al 0.5% a cada pozo, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron con PBS y se observaron al microscopio. Para la lectura del rojo oleoso, se eluyó con 100 $\mu\text{L}$  de isopropanol cada pozo y se cuantificó mediante el lector de placas a 540 nm.

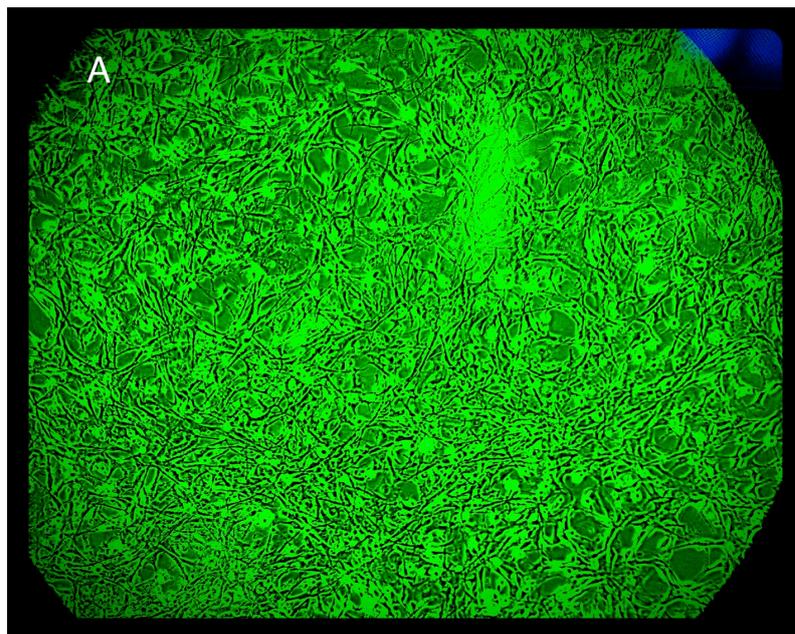
## 6 Resultados

### **Implementación del modelo de diferenciación de los fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 a adipocitos.**

Se lograron diferenciar de fibroblastos de la línea 3T3-L1 a adipocitos a través de medios de diferenciación, conteniendo insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina.

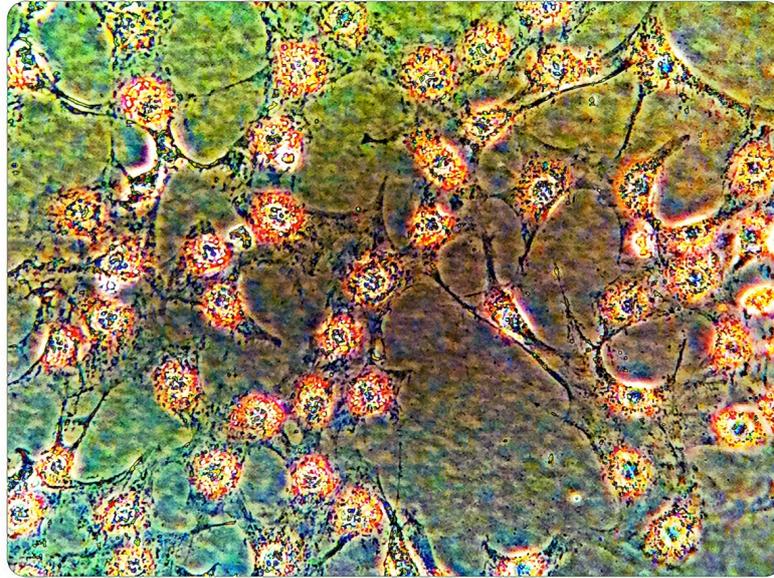
Se observó que la morfología de los adipocitos es circular, poseen vesículas de acumulación de grasa.

En la Figura 7 se muestra la línea celular antes y después de llevarse a cabo la diferenciación adipogénica.



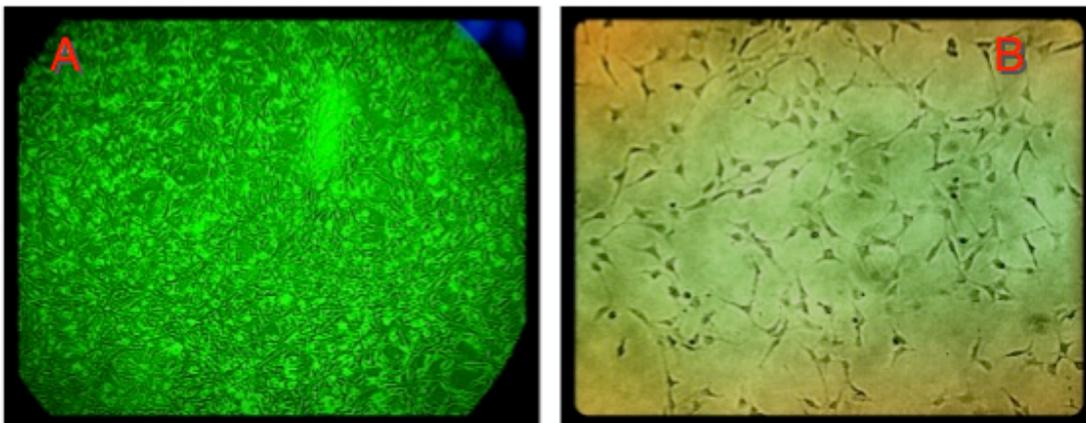
*Figura 7 . Diferenciación de las células 3T3-L1. La línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón cultivados en DMEM suplementado con 10% de SFB se diferenció durante 8 días como se indica en la sección de metodología, se muestra en la imagen "A" las células en estado de fibroblasto con un aumento de 10x y en la imagen de la derecha.*

**B**



*Figura 7 . Diferenciación de las células 3T3-L1. La línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón cultivados en DMEM suplementado con 10% de SFB se diferenció durante 8 días como se indica en la sección de metodología, se muestra en la imagen "B" se observa las células en estado de adipocito con un aumento de 40x y teñidas con el colorante rojo oleoso, en estas se ve la acumulación de grasa en forma de gotas pequeñas.*

Posteriormente se hizo un seguimiento durante las diversas etapas involucradas en la diferenciación celular (Figura 8)



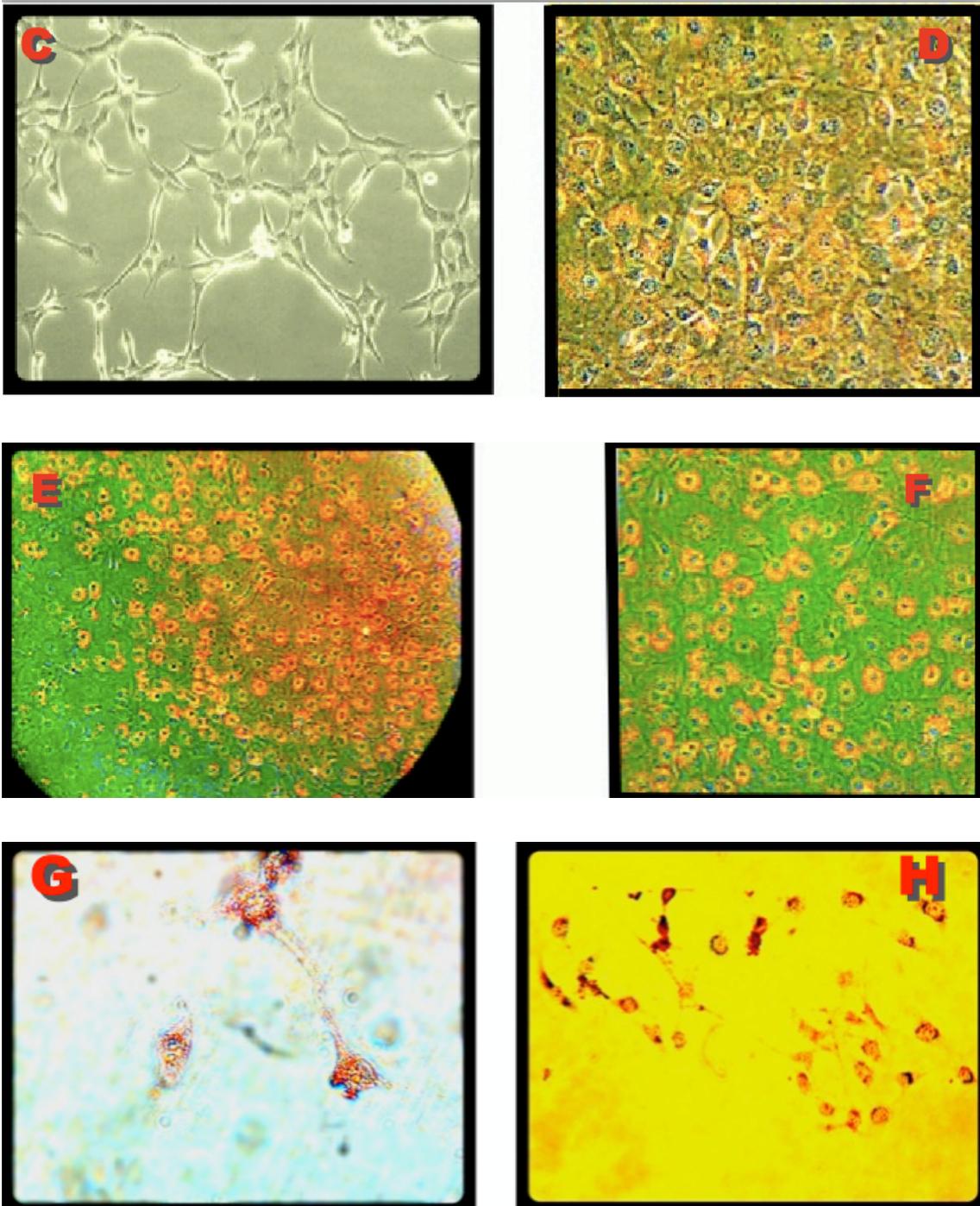


Figura 8 . Etapas de la diferenciación de las células 3T3-L1. Se muestra "A" las células en estado de fibroblasto, "B" se observa las células después de la adición del medio 1, "C" las células se encuentran en estado de preadipocito después de la adición del medio 2, "D" se observa las células en estado de adipocito en estas se ve la acumulación de grasa en forma de *gotas pequeñas*. Todas estas imágenes fueron tomadas con un aumento de 10x. "E" y "F" corresponden a células en estado de adipocito al día 11, ya que en el día 8 se le incorporó el colorante rojo oleoso como se indica en la sección de metodología. "F" se tomó con un aumento de 40x.

“G” células no diferenciadas observadas a 40x, “H” células no diferenciadas tomada con aumento 10x.

### Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular

Se determinó la  $CI_{50}$  de solo 11 compuestos de coordinación sobre la línea celular 3T3-L1 *in vitro* en un rango de concentraciones del 10  $\mu\text{g/mL}$  hasta 50  $\mu\text{g/mL}$ , se hizo la selección de solo 11 de los 25 compuestos de coordinación ya que se cree que algunos tienen cierto interés atribuido a las estructuras químicas que presentan, las cuales no se muestran debido a la patente. En este ensayo se cuantificó la cantidad de Sulforrodamina B que se une a las células 3T3-L1, se realizó por sextuplicado y se obtuvo su lectura en un lector de microplacas a una longitud de 564 nm.

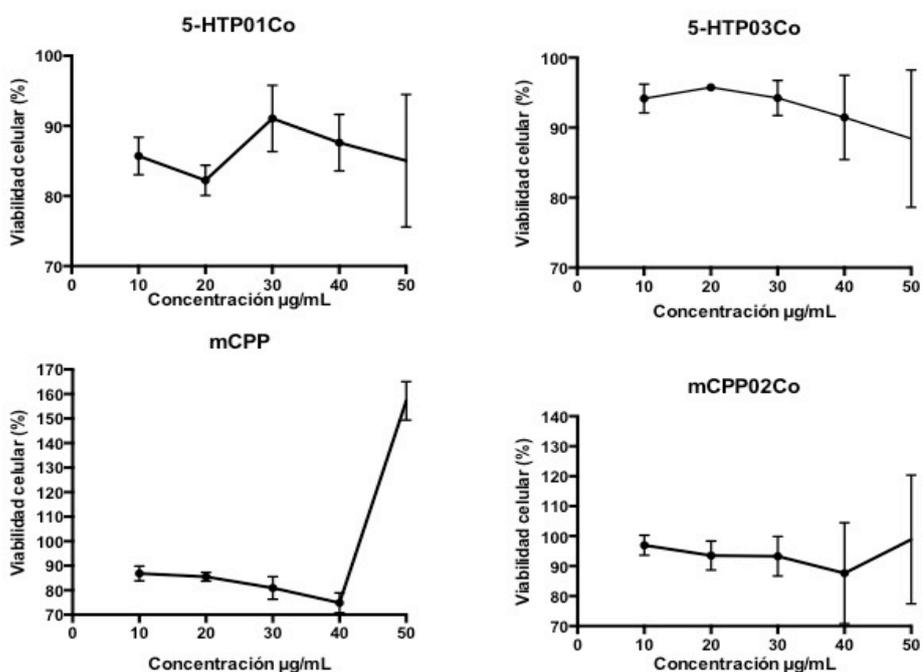


Figura 9.  $CI_{50}$  de los compuestos 5-HTP01Co, 5-HTP03Co, mCPP y mCPP02Co.

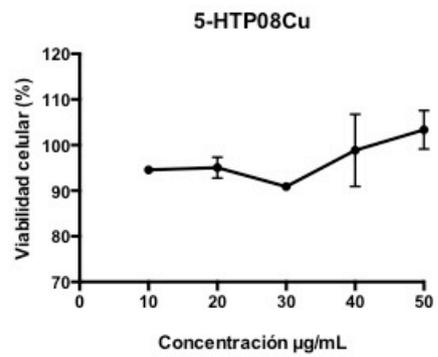
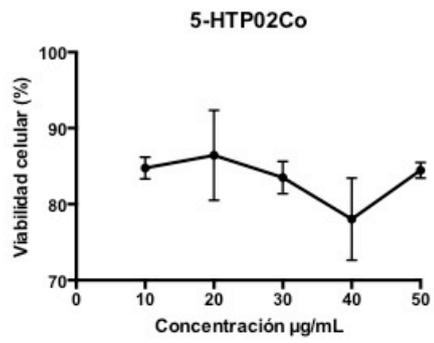
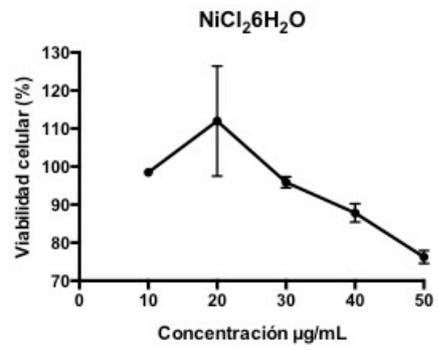
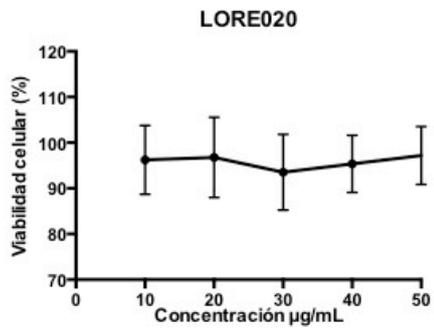


Figura 10.  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos LORE020,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5-HTP02Co, 5-HTP08Cu.

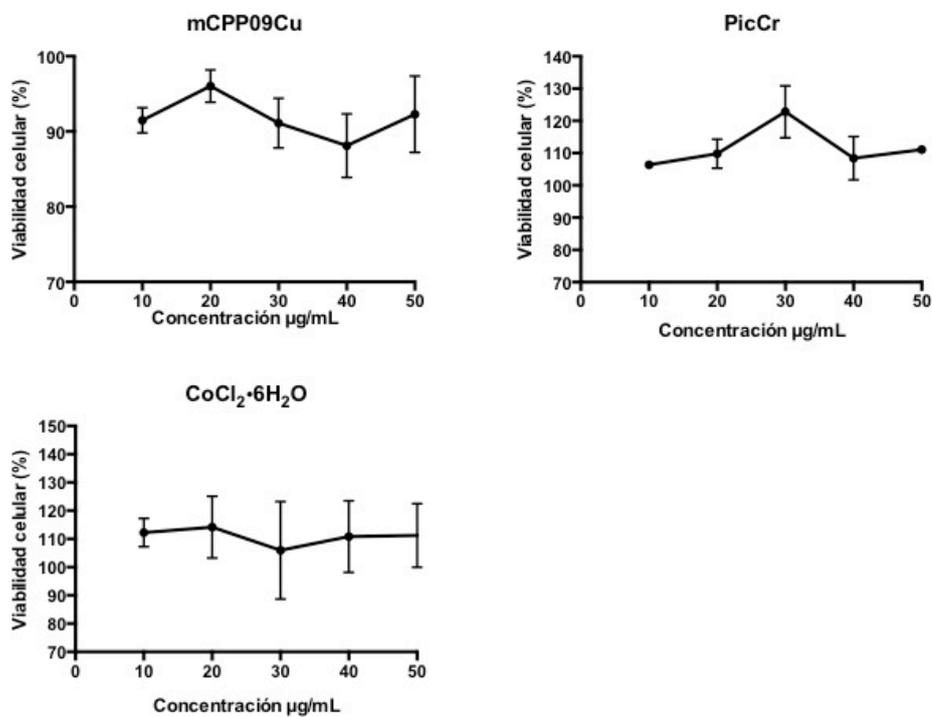


Figura 11. CI<sub>50</sub> de los compuestos mCPP09Cu, PicCr, CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O.

### Primera y Segunda etapa de diferenciación adipogénica.

Se evaluó el efecto de la adición de los 24 compuestos previo y posterior a su diferenciación celular *in vitro*, cuantificando la cantidad de rojo oleoso en un lector de microplacas a una longitud de 540 nm, señalando en rojo a los compuestos más activos.

Tabla 6. Compuestos evaluados durante la etapa de prediferenciación adipogénica.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
5-HTP	91.53	85.89	89.19	85.86
5-HTP01Co	67.73	70.59	29.36	47.77
5-HTP02Co	142.63	137.15	146.69	106.54
5-HTP03Co	37.69	32.64	66.61	56.96
5-HTP04Ni	138.28	130.83	126.57	129.07
5-HTP05Ni	144.46	165.56	173.14	135.39
5-HTP06Ni	118.34	92.09	78.46	116.87
5-HTP07Cu	99.93	64.25	77.87	83.22
5-HTP08Cu	102.30	99.62	79.23	78.31
5-HTP09Cu	98.79	98.71	69.63	80.60
5-HTP10Zn	110.77	137.78	121.23	96.42
5-HTP11Zn	97.92	134.62	128.20	148.89
5-HTP12Zn	86.22	85.13	71.28	94.47

Tabla 7. Compuestos evaluados durante la etapa de prediferenciación celular\*.

Compuesto	Concentración (µg/mL )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
mCPP	87.97	90.64	89.53	87.97
mCPP01Co	110.92	110.58	124.87	102.54
mCPP02Co	98.51	91.46	96.40	94.43
mCPP06Ni	108.86	107.36	118.16	114.34
mCPP09Cu	113.67	114.95	101.77	118.35
mCPP11Zn	141.12	136.50	161.73	162.76
PicCr	107.25	112.61	102.03	114.96
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	130.70	122.73	131.93	127.85

\*Se hidrolizan en agua

Tabla 8. Compuestos evaluados durante la etapa de prediferenciación adipogénica.

Compuesto	Concentración (µg/mL )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
LORE020	78.35	68.05	66.16	50.93
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	161.37	108.96	93.46	148.73
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	55.21	42.49	44.61	35.77
CuBr <sub>2</sub>	161.5	126.98	110.67	205.51

Tabla 9. Compuestos evaluados durante la etapa de postdiferenciación celular.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
5-HTP	129.64	169.99	106.20	92.05
5-HTP01Co	221.67	347.76	342.12	187.13
5-HTP02Co	84.16	73.32	57.34	70.06
5-HTP03Co	93.18	183.52	154.20	109.47
5-HTP04Ni	94.32	106.63	115.64	137.35
5-HTP05Ni	149.11	154.46	131.64	154.56
5-HTP06Ni	84.40	96.43	91.21	127.47
5-HTP07Cu	150.43	156.03	127.90	125.14
5-HTP08Cu	81.71	70.29	64.10	100.49
5-HTP09Cu	119.52	106.81	116.84	128.28
5-HTP10Zn	80.24	77.51	72.51	80.51
5-HTP11Zn	98.28	104.25	109.15	109.36
5-HTP12Zn	120.27	110.93	96.34	111.63

Tabla 10. Compuestos evaluados durante la etapa de postdiferenciación adipogénica\*.

Compuesto	Concentración (µg/mL )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
mCPP	99.44	91.84	98.37	91.19
mCPP01Co	155.86	142.81	129.64	130.36
mCPP02Co	79.55	84.22	87.35	75.81
mCPP06Ni	131.34	136.29	128.61	137.63
mCPP09Cu	83.96	78.20	72.99	77.78
mCPP11Zn	139.50	131.27	138.69	125.21
PicCr	79.54	75.17	81.57	70.95
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	108.10	104.25	111.61	111.56

\*se hidrolizan en agua

Tabla 11. Compuestos evaluados durante la etapa de postdiferenciación celular.

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	0.01	0.1	1	10
	Porcentaje de rojo oleoso			
LORE020	97.84	101.58	72.06	93.58
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	55.80	65.95	66.79	71.45
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	70.79	68.51	63.24	86.30
$\text{CuBr}_2$	60.53	77.82	83.39	98.07

En las tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se muestra la actividad biológica obtenida al adicionar los distintos compuestos de coordinación, es de importancia observar los datos obtenidos por los compuestos 5HTP1-Co, 5HTP3-Co, mCPP, mCPP02-Co, LORE020,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para el tratamiento de prediferenciación, y para los compuestos 5HTP2-Co, 5HTP8-Cu, mCPP02-Co, mCPP09-Cu, PicCr y  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para el tratamiento postdiferenciación.

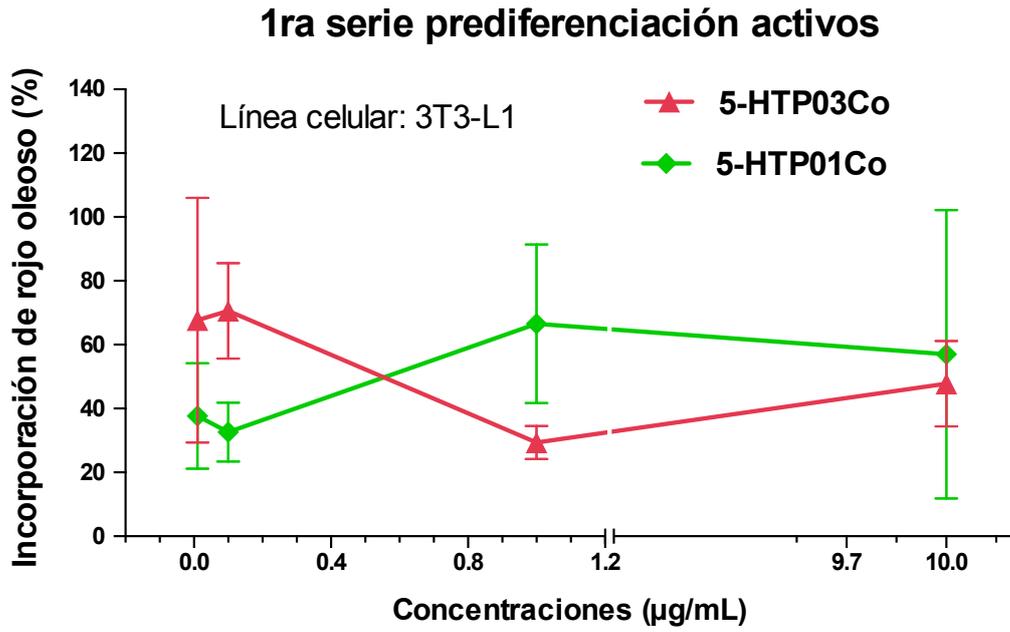


Figura 12. Compuestos activos en la etapa de prediferenciación.

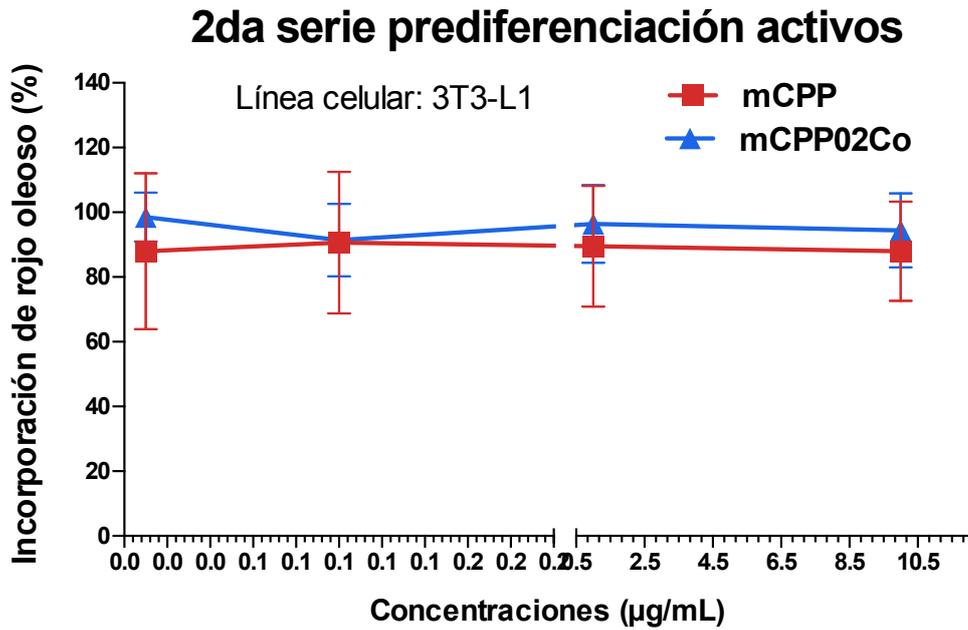


Figura 13. Compuestos activos en la etapa de prediferenciación.

### 3ra serie prediferenciación activos

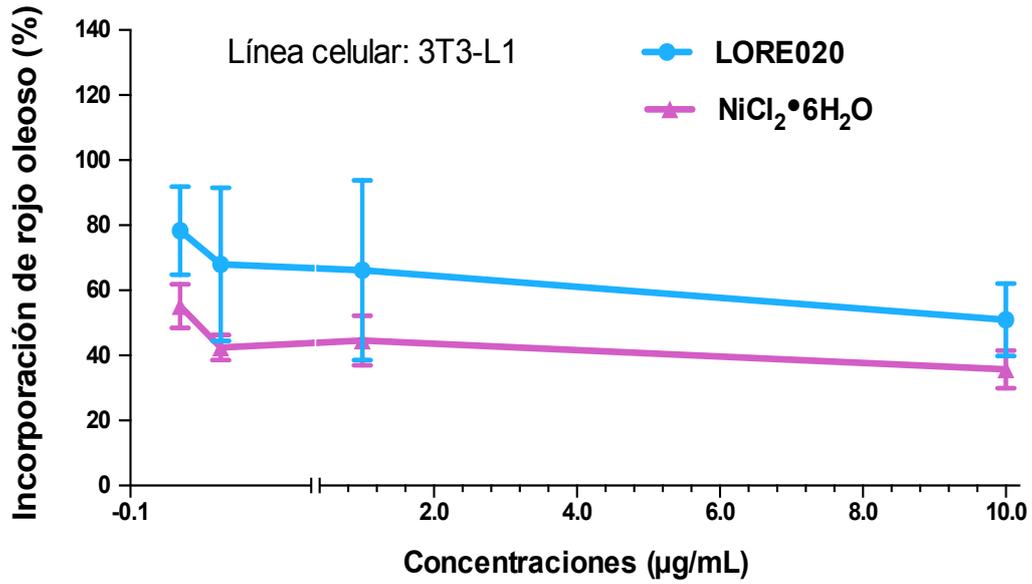


Figura 14. Compuestos activos en la etapa de prediferenciación.

### 1ra serie postdiferenciación activos

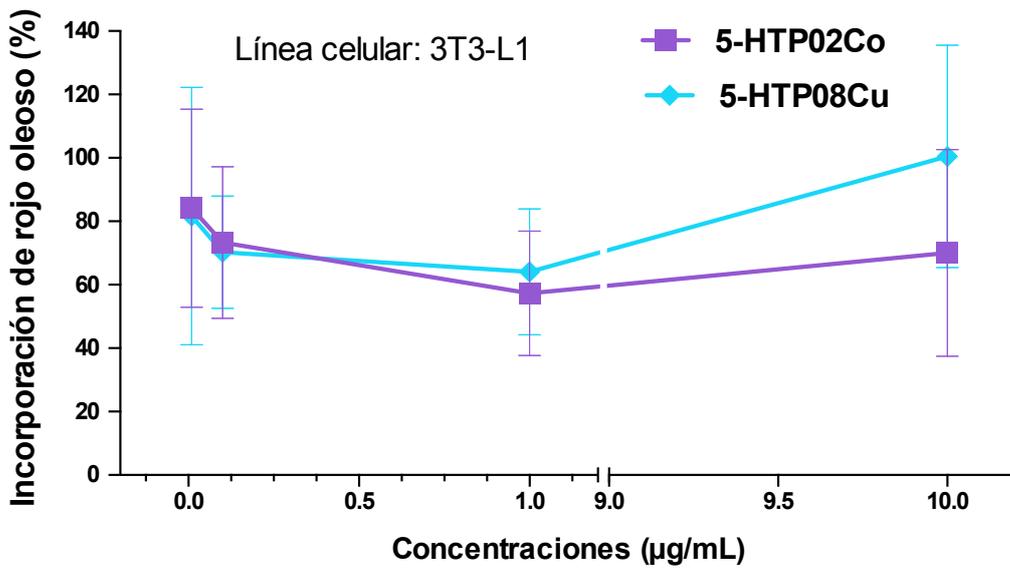


Figura 15. Compuestos activos en la etapa de postdiferenciación.

## 2da serie postdiferenciación activos

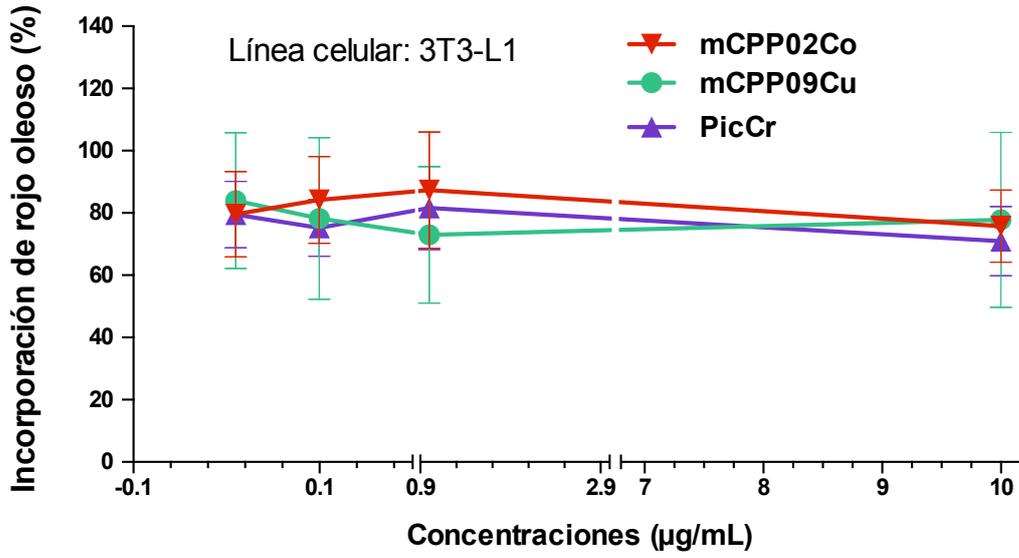


Figura 16. Compuestos activos en la etapa de postdiferenciación.

## 3ra serie postdiferenciación activo

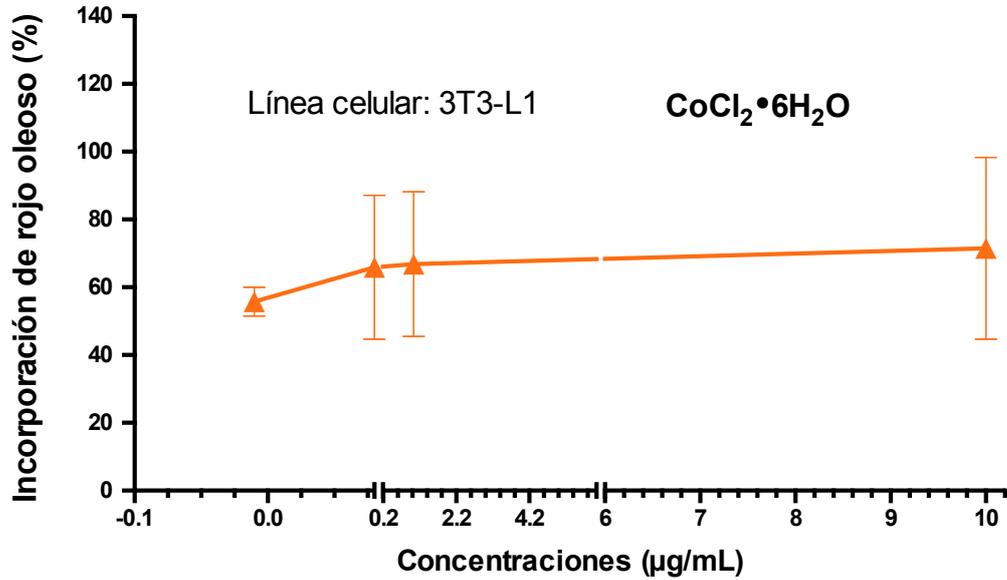


Figura 17. Compuestos activos en la etapa de postdiferenciación.

## 7 Discusión

### **Implementación del modelo de diferenciación adipogénica en fibroblastos de la línea celular 3T3-L1.**

Se observó que la morfología de los adipocitos coincide con la reportada en la literatura <sup>54</sup> logrando la diferenciación de fibroblastos a adipocitos mediante estímulos químicos. Se observó que las células 3T3-L1 presentaron la inhibición de crecimiento por contacto que se reporta en la "ATCC".

Se logró el seguimiento de las etapas involucradas en la diferenciación bajo la adición de los distintos medios, observando que las células eran más anchas en comparación con su morfología inicial fibroblastoide, así como observando la cantidad de rojo oleoso incorporado a las células el cual fue directamente proporcional a la cantidad de lípidos citoplasmáticos en forma de vacuolas, lo que corresponde a un efecto hipertrófico en contraste a lo observado en el control negativo de diferenciación en la figura 8 "G" y "H", donde a pesar de haber sido teñidas se observa que el colorante rojo oleoso es homogéneo en toda la célula. Estos hallazgos nos indican el adecuado establecimiento del modelo *in vitro* de adipogénesis celular.

### **Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular**

No se observó un efecto citotóxico con ninguno de los 11 compuestos evaluados en un rango de concentraciones de 0.01 hasta 50 µg/mL.

### **Primera y Segunda etapa de diferenciación adipogénica.**

Se observó que la actividad de los compuestos difiere en función de si son añadidos en un estadio inicial de fibroblasto o si se adicionan en las células después del día 8 de diferenciación a adipocitos. Estos resultados podrían deberse a diferentes mecanismos de acción o a diferentes propiedades, por ejemplo su estereoquímica, la liposolubilidad, la afinidad por ciertos receptores, por mencionar algunos.

Se dividieron los 24 compuestos en la primera, segunda y tercera serie para facilitar su administración y evaluación. Es importante considerar que los compuestos pertenecientes a la segunda serie se hidrolizan en presencia de agua.

Tu-Fa Lien y colaboradores sugieren que el PicCr es un buen candidato contra la obesidad<sup>9</sup> sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro modelo indican que los compuestos pertenecientes a la primera serie: 5-HTP01Co (47.78% IRO), 5-HTP03Co (56.97% IRO) en la etapa de prediferenciación presentan mejor actividad en comparación con el PicCr (70.95%IRO) contradiciendo a los hallazgos reportados en la literatura.

De los 11 compuestos que poseen mejor actividad antiadipogénica fueron 5-HTP01Co, con una actividad de 48%IRO a una concentración de 10 µg/mL y el compuesto 5-HTP03Co con 57%IRO a una concentración de 10 µg/mL, en la etapa de prediferenciación.

LORE020 51%IRO de absorción con tinción rojo oleoso a una concentración de 10 µg/mL.

NiCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O con una actividad de 36% de absorción con tinción rojo oleoso a una concentración de 10 µg/mL.

5-HTP02Co con una actividad de 57% de absorción con tinción rojo oleoso a una concentración de 1µg/mL.

5-HTP08Cu con una actividad de 64% de absorción con tinción rojo oleoso a una concentración de 1µg/mL, como se observa en las tablas 6, 7, 8 y 9.

En las gráficas correspondientes a la diferenciación adipogénica se observa en la mayoría que se obtiene una mejor actividad antiadipogénica de los compuestos a una menor dosis en comparación con una dosis alta, lo cual nos sugiere un efecto hormético, un proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo. Por lo mencionado anteriormente sabemos que a lo largo de la evolución, los organismos vivos han tenido que adaptarse a condiciones y agentes adversos para lograr sobrevivir, por lo que han desarrollado diversos y complejos mecanismos para lidiar con ellos. La respuesta hormética es transitoria, dinámica y puede ser mediada por la activación o inactivación de enzimas, por la modificación de una gran cantidad de genes o bien por ambos procesos. Sin embargo actualmente no se conocen con exactitud todos los mecanismos y vías de transducción de señales por los cuales la respuesta hormética se lleva a cabo; así, la evidencia experimental sugiere que no existe un mecanismo único sino varias vías que son capaces de desencadenar la hormesis. Finalmente podemos decir que existe un efecto de hormesis, sin embargo, se requieren mas estudios para elucidar los mecanismos moleculares involucrados.

## 8 Conclusiones

- Se implementó de manera adecuada y eficaz el modelo de diferenciación adipogénica con fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 *in vitro*, se empleó con éxito este modelo para evaluar la actividad antiadipogénica de los nuevos compuestos de coordinación.
- Nuestro modelo demostró que es posible inhibir la diferenciación de fibroblastos a adipocitos utilizando los nuevos compuestos de coordinación. Son necesarios estudios tanto en modelos de animales como celulares para la elucidación del mecanismo de acción de estos compuestos y su efecto en tejido adiposo. El estudio del proceso biológico de la adipogénesis es de gran importancia ya que eventualmente nos permitirá intervenir con terapias efectivas contra la obesidad, uno de los más graves problemas de salud pública para la población mexicana.
- Se observó que la actividad farmacológica que poseen los nuevos compuestos de coordinación es distinta si esta se evalúa en las células en el estadio de fibroblasto o adipocito.
- Se pudo evaluar a los compuestos observando que sólo 11 de ellos poseen posible actividad antiadipogénica.
- No se logró determinar la concentración inhibitoria 50 en un rango de concentración de 0.01 µg/mL hasta 50 µg/mL, lo que indica que los compuestos no son citotóxicos.
- Los resultados son prometedores debido a la alta actividad y baja toxicidad encontradas. Sin embargo, tendrán que corroborarse en estudios de eficacia y seguridad en animales.

## 9 Referencias

1. Onyewuenyi, I. C.; Muldoon, M. F.; Christie, I. C.; Erickson, K. I.; Gianaros, P. J., Basal ganglia morphology links the metabolic syndrome and depressive symptoms. *Physiology & behavior* **2014**, *123*, 214-22.
2. Alberti, K. G.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. A.; Fruchart, J. C.; James, W. P.; Loria, C. M.; Smith, S. C., Jr.; International Diabetes Federation Task Force on, E.; Prevention; Hational Heart, L.; Blood, I.; American Heart, A.; World Heart, F.; International Atherosclerosis, S.; International Association for the Study of, O., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120* (16), 1640-5.
3. Butnorienė, J.; Bunevicius, A.; Norkus, A.; Bunevicius, R., Depression but not anxiety is associated with metabolic syndrome in primary care based community sample. *Psychoneuroendocrinology* **2014**, *40* (0), 269-276.
4. Fall, T.; Ingelsson, E., Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* **2014**, *382* (1), 740-57.
5. Antonio Herrera, L. Asociación de ácidos grasos con la resistencia a insulina. Vías de inflamación y metabolismo. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2012.
6. paho.org  
[http://www.paho.org/mex/index.php?option=com\\_content&view=category&id=824](http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&id=824) (accessed 24 septiembre).
7. Barbará, R. G., Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Revista de medicina de la Universidad de Navarra* **2004**, *48* (2), 63-65.
8. Vásquez-Machado, M. s.; Ulate-Montero, G., Regulación del peso corporal y del apetito. *Acta Médica Costarricense* **2010**, *52* (2), 79-89.
9. Lien, T.-F.; Wu, C.-P.; Horng, Y.-M., Chromium picolinate depressed proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Nutrition Research* **2007**, *27* (3), 176-180.
10. Contreras Carreto, N. A. n.; Mancillas Adame, L. G., El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. Bases e implicaciones clínicas. *Médica Sur* **2005**, *12* (1), 3-10.
11. Hall Ramírez, V.; Quesada Morúa, M. S.; Rocha Palma, M., *Obesidad fisiopatología y abordaje terapéutico*. Costa Rica, 2002.

12. Thivel, D.; Aucouturier, J.; Doucet, É.; Saunders, T. J.; Chaput, J.-P., Daily energy balance in children and adolescents. Does energy expenditure predict subsequent energy intake? *Appetite* **2013**, *60* (0), 58-64.
13. Vickers, S. P.; Clifton, P. G., Animal models to explore the effects of CNS drugs on food intake and energy expenditure. *Neuropharmacology* **2012**, *63* (1), 124-131.
14. Guyton, C. G.; Hall, J. E., *Tratado de Fisiología Médica*. USA, 1997; Vol. 9.
15. Gallagher, D.; Heymsfield, S. B.; Heo, M.; Jebb, S. A.; Murgatroyd, P. R.; Sakamoto, Y., Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72* (3), 694-701.
16. Larder, R.; Lim, C. T.; Coll, A. P., Chapter 6 - Genetic aspects of human obesity. In *Handbook of Clinical Neurology*, Eric Fliers, M. K.; Johannes, A. R., Eds. Elsevier: 2014; Vol. 124, pp 93-106.
17. Rivera, J. A.; Barquera, S.; Campirano, F.; Campos, I.; Safdie, M.; Tovar, V., Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public health nutrition* **2002**, *5* (1A), 113-22.
18. ensanut.insp.mx Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 Resultados Nacionales.  
<http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>  
(accessed 23 septiembre).
19. Zhao, X.; Xi, B.; Shen, Y.; Wu, L.; Hou, D.; Cheng, H.; Mi, J., An obesity genetic risk score is associated with metabolic syndrome in Chinese children. *Gene* **2014**, *535* (2), 299-302.
20. dof.gob.mx, "Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad". 4 de Agosto de 2010.
21. who.int Obesidad y sobrepeso.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (accessed 22 de septiembre).
22. Mansour, M., The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. *Progress in molecular biology and translational science* **2014**, *121*, 217-66.
23. Aydin, S.; Aksoy, A.; Aydin, S.; Kalayci, M.; Yilmaz, M.; Kuloglu, T.; Cital, C.; Catak, Z., Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* **2014**, *30* (1), 1-9.
24. dof.gob.mx Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

25. dof.gob.mx Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias
26. King, H.; Aubert, R. E.; Herman, W. H., Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care* **1998**, *21* (9), 1414-31.
27. Kramer, A. H.; Joos-Vandewalle, J.; Edkins, A. L.; Frost, C. L.; Prinsloo, E., Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2014**, *443* (4), 1245-1250.
28. Hayes Dorado, J. P., Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría* **2008**, *47* (2), 90-96.
29. Aguilar Villafuerte, M. Intervención para mejorar apego al tratamiento y calidad de vida en Diabetes Mellitus tipo II. Tesis para obtener el título de Licenciada En Psicología. Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2012.
30. Chiasson, J. L.; Aris-Jilwan, N.; Belanger, R.; Bertrand, S.; Beaugard, H.; Ekoe, J. M., Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *Canadian Medical Association Journal* **2003**, *168* (10), 1241-1241.
31. Rull, J. A.; Aguilar-Salinas, C. A.; Rojas, R.; Rios-Torres, J. M.; Gomez-Perez, F. J.; Olaiz, G., Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Archives of medical research* **2005**, *36* (3), 188-96.
32. salud.gob.mx Ley general de salud.  
[http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY\\_GENERAL\\_DE\\_SALUD.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf) (accessed 22 septiembre).
33. who.int Informacion general sobre la hipertension en el mundo.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2013.2\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf) (accessed 24 de septiembre).
34. Alejandro Mar, C. n. Manejo nutricional de la hipertensión arterial. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2013.
35. Kwon, B.-J.; Roh, J.-W.; Lee, S.-H.; Lim, S.-M.; Park, C.-S.; Kim, D.-B.; Jang, S.-W.; Chang, K.-Y.; Kim, H.-Y.; Ihm, S.-H., A high normal thyroid-stimulating hormone is associated with arterial stiffness, central systolic blood pressure, and 24-hour systolic blood pressure in males with treatment-naïve hypertension and euthyroid. *International Journal of Cardiology* (0).
36. Pelliccia, F.; Patti, G.; Rosano, G.; Greco, C.; Gaudio, C., Efficacy and safety of eplerenone in the management of mild to moderate arterial hypertension: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cardiology* **2014**, *177* (1), 219-228.

37. Miguel Soca, P. E., Dislipidemias. *ACIMED* **2009**, *20* (6), 265-273.
38. Senosiain Lalastra, C.; Tavío Hernández, E.; Moreira Vicente, V.; Maroto Castellanos, M.; García Sánchez, M. C.; Aicart Ramos, M.; Téllez Vivajos, L.; Cuño Roldán, J. L., Pancreatitis aguda por hipertrigliceridemia. *Gastroenterología y Hepatología* **2013**, *36* (4), 274-279.
39. McGown, C.; Biredinc, A.; Younossi, Z. M., Adipose tissue as an endocrine organ. *Clinics in liver disease* **2014**, *18* (1), 41-58.
40. Moreno-Navarrete, J. M.; Fernández-Real, J. M., Adipocyte Differentiation. **2012**, 17-38.
41. Mara Musri, M. Expresión de adiponectina y sus receptores en tejido adiposo. Regulación epigenética de la adipogénesis. Tesis para obtener el título de Doctorado en Biología Celular en Medicina. Universidad de Barcelona, Barcelona. España, 2004.
42. Green, H.; Kehinde, O., An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **1975**, *5* (1), 19-27.
43. Green, H.; Kehinde, O., Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **1976**, *7* (1), 105-13.
44. Feve, B., Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **2005**, *19* (4), 483-99.
45. Monti, E.; Gariboldi, M.; Maiocchi, A.; Marengo, E.; Cassino, C.; Gabano, E.; Osella, D., Cytotoxicity of cis-platinum(II) conjugate models. The effect of chelating arms and leaving groups on cytotoxicity: a quantitative structure-activity relationship approach. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48* (3), 857-66.
46. Guo, Z.; Sadler, P. J., Medicinal Inorganic Chemistry. In *Advances in Inorganic Chemistry*, Sykes, A. G., Ed. Academic Press: 1999; Vol. Volume 49, pp 183-306.
47. Berry, R. B.; Koch, G. L.; Hayward, L. F., Low-dose mirtazapine increases genioglossus activity in the anesthetized rat. *Sleep* **2005**, *28* (1), 78-84.
48. Kostova, I.; Balkansky, S., Metal complexes of biologically active ligands as potential antioxidants. *Current medicinal chemistry* **2013**, *20* (36), 4508-39.
49. Lopez-Sandoval, H.; Londono-Lemos, M. E.; Garza-Velasco, R.; Poblano-Melendez, I.; Granada-Macias, P.; Gracia-Mora, I.; Barba-Behrens, N., Synthesis, structure and biological activities of cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds with 2-benzimidazole derivatives. *Journal of inorganic biochemistry* **2008**, *102* (5-6), 1267-76.
50. salud.gob.mx Reglamento de insumos para la salud. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html> (accessed 22 septiembre).

51. Naranjo, C. A.; du Souich, P.; Busto, U. E., *Metodos en Farmacología Clínica*. Organizacion Panamericana de la Salud: 1992.
52. Navarrete, C. A., González, Trujano María Eva, Mézquita, Alcocer Mirza Verónica, *Farmacología I*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Departamento de Farmacia: 2007; p 11-39.
53. Page C. P., C. M. L., Sutter M. C., Walker M. J. A., Hoffman B. B., *Integrated Pharmacology*. 2<sup>o</sup> ed.; Mosby, España, 2004.
54. Green, H.; Kehinde, O., Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1974**, *1* (3), 113-116.

## 10 Apéndice

### 10.1 Definiciones

Las siguientes definiciones que se consideran importantes para la elaboración de este trabajo fueron consultadas de las normas oficiales mexicanas NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la *diabetes mellitus*; NOM-030-SSA2-2009 para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica; NOM-174-SSA1-1998 para el manejo integral de la obesidad; NOM-059-SSA1-2013 buenas prácticas de fabricación de medicamentos; NOM-008-SSA3-2010 para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad; NOM-037-SSA2-2012 para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.

**Arteriosclerosis:** El endurecimiento de las arterias.

**Aterosclerosis:** Es la variedad de arteriosclerosis, en la cual hay infiltración de la capa íntima de la arteria con macrófagos cargados de grasa, proliferación de células musculares con fibrosis y reducción de la luz del vaso sanguíneo. Algunas placas pueden llegar a calcificarse.

**Bioterio:** Conjunto de instalaciones, muebles e inmuebles destinados al alojamiento y manutención de animales de laboratorio durante una o varias de las fases de su ciclo vital; esto es, nacimiento, desarrollo, reproducción y muerte.

**Buenas prácticas de laboratorio:** Conjunto de reglas, procedimientos operacionales y prácticas establecidas para asegurar la calidad e integridad de las actividades realizadas en el laboratorio y de los datos analíticos obtenidos de ensayos o pruebas.

**Colesterol:** Molécula esteroidea, formada por cuatro anillos hidrocarbonados más una cadena alifática de ocho átomos de carbono en el C-17 y un OH en el C-3 del anillo A.

**Colesterol HDL:** (por sus siglas en inglés, C-HDL, High Density Lipoprotein), son un tipo de lipoproteína de alta densidad. Las HDL participan en el transporte reverso del colesterol, de los tejidos hacia el hígado para su excreción o reciclaje.

**Colesterol LDL:** (por sus siglas en inglés, C-LDL, Low Density Lipoprotein), son un tipo de lipoproteína de baja densidad, transportan el colesterol a los tejidos, su elevación problemas cardiovasculares.

**Colesterol no HDL:** Es todo el colesterol que no es transportado por el colesterol HDL.

**Cetosis:** La acumulación de cuerpos cetónicos en los tejidos y líquidos corporales.

**Cetoacidosis:** La complicación aguda, por deficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina, conduce al catabolismo de las grasas como fuente de energía, produciendo la formación de cuerpos cetónicos.

**Diabetes mellitus:** Es una enfermedad sistémica crónico-degenerativa con predisposición hereditaria y participación de diversos factores ambientales que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina.

**Diabetes tipo 1:** Existe destrucción de células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina.

**Diabetes tipo 2:** Se presenta resistencia a la insulina.

**Diabetes gestacional:** se detecta por primera vez durante el embarazo.

**Dislipidemias:** Alteración de la concentración normal de los lípidos en la sangre.

**Grasas Trans:** A las grasas líquidas como los aceites que se hidrogenan químicamente. Aumentan el colesterol LDL y reducen el colesterol HDL.

**Hipertensión Arterial Sistémica:** Padecimiento multifactorial caracterizado por aumento sostenido de la Presión arterial sistólica, diastólica o ambas.

**Hipoglucemia:** Estado en el que se presentan manifestaciones secundarias a descargas adrenérgicas o neuroglucopénicas debido a valores subnormales de glucosa.

**Insulina:** Es una hormona poli peptídica de  $\approx 5.8$  KDa en humanos.

**Índice de masa corporal (IMC):** Es el peso corporal dividido entre la estatura en metros elevada al cuadrado ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ).

Peso corporal, de acuerdo con el Índice de Masa Corporal: índice de masa corporal  $>18.5$  y  $\leq 24.9$  peso normal, índice de masa corporal  $\geq 25$  y  $\leq 29.9$  sobrepeso, índice de masa corporal  $\geq 30$  obesidad.

**Línea celular:** Al tipo de población celular con características definidas que se originaron por subcultivos seriados de una población celular primaria.

**Nefropatía diabética:** La complicación renal tardía de la diabetes. Se refiere al daño predominantemente de tipo glomerular.

**Resistencia a la insulina:** Disminución de la acción de esta hormona en los tejidos muscular, hepático y adiposo.

**Síndrome metabólico:** Conjunto de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y antropométricas, ocurren simultáneamente, pueden producir o estar ligadas a la resistencia a la insulina y/o sobrepeso u obesidad, que incrementan el riesgo de desarrollar *Diabetes mellitus*, enfermedad cardiovascular o ambas.

**Triglicéridos:** Moléculas de glicerol, esterificadas con tres ácidos grasos. Principal forma de almacenamiento de energía en el organismo.