



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera de Química Farmacéutico Biológica



**Estudio *in silico* y evaluación toxicológica *in vitro* de
compuestos polifenólicos con posible efecto antidiabético**

Protocolo de tesis
Brenda Moreno de Jesús

Director

M. en C. Juan Andres Alvarado Salazar

Asesora

Dra. Jessica Elena Mendieta Wejbe

Asesora

Dra. Raquel Retana Ugalde

Ciudad de México, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a los muchos excelentes profesores con los que tuve la maravillosa oportunidad de compartir mi camino durante mi formación como Química Farmacéutica Biológica, que fueron importantes peldaños para construir mis conocimientos y además muchos de ellos también me inspiraron.

A mi director de tesis, el M. en C. Juan Andrés Alvarado Salazar, que me tomó en cuenta para este proyecto de investigación dándome la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, quien con mucha paciencia y esmero me motivó, guio e inspiró a tomar la decisión de seguir avanzando por el camino del conocimiento y continúa apoyándome para futuros proyectos.

A mis asesoras, quienes me permitieron formar parte de su equipo de trabajo, guiándome y proporcionándome conocimientos, así como de su valioso tiempo para poder culminar este proyecto a pesar de las adversidades y contratiempos.

A los compañeros de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional; Ana María Correa Basurto, Reyna del Carmen Navarrete y Melvin Rozales, quienes pacientemente y con muy buena actitud contribuyeron compartiendo conocimientos conmigo para poder realizar este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia entera, que siempre me han brindado apoyo en los mejores y peores momentos, muchas de sus pequeñas y grandes acciones y/o palabras me han permitido llegar hasta donde tengo la fortuna de estar ahora.

Debo mencionar especialmente a mi mamá porque sin su apoyo incondicional, dedicación, sacrificios, esfuerzos, paciencia y amor, muy probablemente mi presente sería muy distinto. También con mi más fuerte amor e inspiración para la persona más importante de mi vida; Santiago, mi hijo hermoso.

SITIO DE REALIZACIÓN

Esta tesis se realizó en el área Farmacéutica de la carrera de QFB de la FES Zaragoza y en el Laboratorio de Investigación de Biofísica y Biocatálisis de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la cual fue dirigida por el M en C Juan Andrés Alvarado Salazar en colaboración con la Dra. Jessica Elena Mendieta Wejebe.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
<i>Diabetes Mellitus</i>	2
Generalidades	2
Clasificación	2
Síntomas y diagnóstico.....	3
Epidemiología.....	4
Fisiopatología de la diabetes	5
<i>Tratamientos convencionales</i>	11
Antidiabéticos orales.....	11
Antidiabéticos inyectables	13
Blancos moleculares.....	13
<i>Tratamientos terapéuticos alternativos</i>	15
Química medicinal	15
<i>Generalidades de los ácidos polifenólicos</i>	22
Actividad biológica.....	22
Composición química de los compuestos propuestos	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. HIPÓTESIS	28

4. OBJETIVOS	29
Objetivos generales	29
Objetivos particulares	29
5. METODOLOGÍA	30
Estudio in silico	30
Material.....	30
Hardware	30
Software	30
Métodos.....	31
Evaluación in vitro	34
Reactivos y equipos.....	34
Métodos.....	35
6. RESULTADOS	45
Estudio in silico	45
Resultados.....	47
Evaluación in vitro	52
Cultivo y propagación de las células 3T3-L1	53
Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros	54
Ensayo de citotoxicidad	56
Efecto del ácido cafeico en fibroblastos 3T3-L1.....	60

Efecto del ácido clorogénico en fibroblastos 3T3-L1	65
Efecto del ácido ferúlico en fibroblastos 3T3-L1.....	70
Efecto de los ácidos polifenólicos en adipocitos 3T3-L1	75
8. DISCUSIÓN.....	77
9. CONCLUSIONES	83
10. PROPUESTAS	84
11. REFERENCIAS	85
12. ANEXOS.....	92
Participación en congresos	102

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Complicaciones de la diabetes	2
Figura 2.	Estadísticas de exceso de mortalidad por diabetes	5
Figura 3.	Desequilibrio en concentración de adipocinas	5
Figura 4.	Mecanismos patológicos principales de la DT2	6
Figura 5.	Biología del adipocito	10
Figura 6.	Diferenciación de los adipocitos	10
Figura 7.	Principales mecanismos de acción de los anti hiperglucemiantes orales	12
Figura 8.	Reglas de Lipinski	18
Figura 9.	Mediadores de la adipogénesis alterada en RI y DT2.	19
Figura 10.	Diferenciación de fibroblastos a adipocitos estudio	20
Figura 11.	Reducción de MTT (A) a formazan (B).	22
Figura 12.	Estructura del ácido clorogénico	24
Figura 13.	Estructura del ácido quínico	24
Figura 14.	Estructura del ácido cafeico	25
Figura 15.	Estructura del ácido p-cumárico	25
Figura 16.	Estructura del ácido ferúlico	26
Figura 17.	Métodos empleados para la evaluación in vitro	37
Figura 18.	Concentraciones (μM) de las soluciones de los ácidos polifenólicos a evaluar en fibroblastos y adipocitos	42
Figura 19.	Estructuras químicas de fármacos hipoglucemiantes	46
Figura 20.	Morfología de fibroblastos obtenidos	54
Figura 21.	Proceso de diferenciación de los fibroblastos a adipocitos maduros a los días 3,5,7 y 9 sin tratamiento.	56
Figura 22.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico	58
Figura 23.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico	59
Figura 24.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico	60
Figura 25.	Porcentaje de viabilidad de fibroblastos 3T3-L1 con ácido cafeico a las 24, 48 y 72 horas posteriores al tratamiento.	61
Figura 26.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico	63
Figura 27.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico	64
Figura 28.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico	65
Figura 29.	Porcentaje de viabilidad de fibroblastos 3T3-L1 con ácido clorogénico a las 24, 48 y 72 horas posteriores al tratamiento.	66
Figura 30.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico	68
Figura 31.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico	69
Figura 32.	Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico	70

Figura 33.	Porcentaje de viabilidad de fibroblastos 3T3-L1 con ácido ferúlico a las 24, 48 y 72 horas posteriores al tratamiento.	71
Figura 34.	Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico.	73
Figura 35.	Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico	74
Figura 36.	Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico	75
Figura 37.	Porcentaje de viabilidad de adipocitos 3T3-L1 con los ácidos cafeico, clorogénico y ferúlico a las 48 horas posteriores al tratamiento.	76
Figura 38.	Interacciones de anagliptina-, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	94
Figura 39.	Interacciones de metformina-PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	94
Figura 40.	Interacciones de metformina-AMPK, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	95
Figura 41.	Interacciones de miglitol-, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	95
Figura 42.	Interacciones de pioglitazona-, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	96
Figura 43.	Interacciones de ácido cafeico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	96
Figura 44.	Interacciones de ácido clorogénico SSSSE - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	97
Figura 45.	Interacciones de ácido ferúlico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	97
Figura 46.	Interacciones de ácido p -cumárico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	98
Figura 47.	Interacciones de ácido quínico SRRS - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	98
Figura 48.	Interacciones de ácido cafeico E – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	99
Figura 49.	Interacciones de ácido clorogénico RRSSE - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	99
Figura 50.	Interacciones de ácido ferúlico E – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	100
Figura 51.	Interacciones de ácido p -cumárico Z – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	100
Figura 52.	Interacciones de ácido cafeico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	101
Figura 53.	Interacciones de ácido cafeico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	101
Figura 54.	Interacciones de ácido clorogénico RSRRZ – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	102
Figura 55.	Interacciones de ácido ferúlico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	102

Figura 56.	Interacciones de ácido p-cúmarico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	103
Figura 57.	Interacciones de ácido quínico RSRS – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D).	103
Tabla 1.	Criterios para el diagnóstico de diabetes	4
Tabla 2.	Propiedades moleculares y parámetros de toxicidad de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos calculados con las herramientas bioinformáticas molinspiration y DataWarrior	48
Tabla 3.	Parámetros de solubilidad acuosa, farmacocinética y química medicinal de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos obtenidos con el servidor en línea SwissADME	49
Tabla 4.	Docking molecular de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos con el programa autodock tools 4.0.1	51

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASP	Proteína estimuladora de acilación
ATP	Adenosín Trifosfato
CC50	Concentración citotóxica media
DE	Desviación Estándar
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DT1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP4	Dipeptidil peptidasa-4
ERO	Especies reactivas del oxígeno
g	Gramos
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GPx	Glutación peroxidasa
IL-6	Interleucina 6
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
L	Litro
mg	miligramo
mL	mililitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PPAR- γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales γ
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistencia a la insulina
SGLT2	Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2
SOD	Superóxido dismutasa
SSAO/VAP-1	Amina oxidasa sensible a semicarbazida / Proteína de adhesión vascular-1
T	Temperatura
TNF α	Factor de necrosis tumoral

1. RESUMEN

La diabetes es un grave problema de salud pública mundial que confiere un alto riesgo de mortalidad por diversas complicaciones crónicas. Hay gran repertorio de tratamientos farmacológicos que en su mayoría han reportado diversos efectos secundarios, por ello, surge la necesidad de buscar alternativas de tratamientos preventivos y terapéuticos con bajos o inexistentes efectos adversos que sean de alta accesibilidad para la población. Por esta razón, el empleo de compuestos de origen natural incrementa, dentro de los compuestos de origen natural con importantes actividades biológicas destacan los polifenoles, han sido reconocidos por sus propiedades antioxidantes, además se ha demostrado que pueden impactar favorablemente la ingesta y regulación de la glucosa, adipogénesis, lipólisis, metabolismo de los lípidos y el control del apetito. Gracias a todas estas características documentadas nos resultó de gran interés investigar si los ésteres de polifenol; los ácidos clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y quínico podrían presentar efecto antidiabético al actuar sobre algunos blancos terapéuticos implicados en la diabetes, tales como el PPAR γ , la DDP4 y/o la α -glucosidasa. Para el presente trabajo de tesis se recurrió a herramientas *in silico*, para conocer las interacciones que se pudieran presentar entre los compuestos y los blancos propuestos. Con base en los resultados obtenidos en la evaluación *in silico* seleccionamos a los polifenoles más promisorios para evaluar la toxicidad *in vitro* utilizando la línea celular 3T3-L1, para que a partir de los valores obtenidos de las IC50 nos fuera posible proponer un compuesto líder como potencial tratamiento alternativo que en un futuro pudiera ser evaluado su efecto farmacológico en modelos *in vivo* y/o *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus

Generalidades

La diabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por hiperglucemia crónica cuya causa subyacente varía según el tipo, generalmente es debida a defectos en la secreción y/o acción de insulina que es la hormona reguladora de la glucosa en la sangre y que es producida por las células β pancreáticas . Esta patología se asocia con el desarrollo de diversas complicaciones que se clasifican en micro y macro vasculares (Figura 1), por lo tanto, conlleva una atención médica continua por las afectaciones que genera y requiere medidas enfocadas en reducción de riesgos multifactoriales y no únicamente se centran en la reducción de la hiperglucemia [ADA, 2020; Canadian Diabetes Association, 2013].

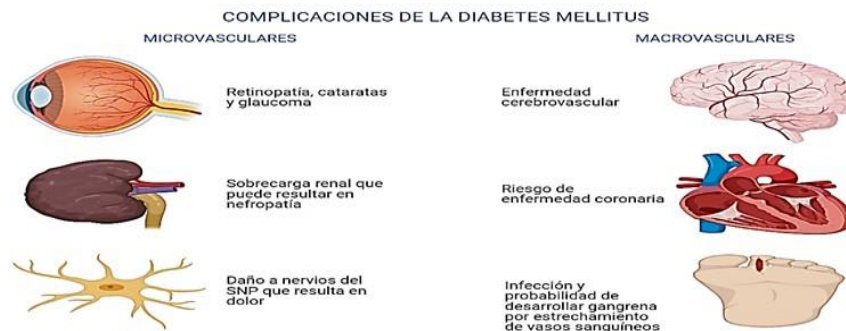


Figura 1. Complicaciones de la diabetes (Imagen del autor).

Clasificación

La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales [ADA, 2021; Mateos N y cols., 2002]:

- Diabetes tipo 1, también llamada diabetes juvenil o insulino dependiente, se

debe a la destrucción de las células β autoinmunes, que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

A. Mediada inmunológicamente

B. Idiopática

- Diabetes tipo 2, se genera por causa de una pérdida progresiva de la secreción adecuada de insulina de las células β ó por la resistencia a la insulina.
- Diabetes gestacional, es la alteración en el metabolismo de los carbohidratos detectado durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, ésta no era una diabetes manifiesta antes de la gestación.
- Otros tipos específicos.

A. Defectos genéticos en la función de las células beta

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina

C. Enfermedades del páncreas exocrino

D. Endocrinopatías

E. Inducida por medicamentos o químicos

F. Infecciones

G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente

H. Otros síndromes genéticos, algunas veces asociados con diabetes

La diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 son enfermedades en las que la progresión de la enfermedad puede variar considerablemente. La clasificación es importante para determinar la terapia [ADA, 2021].

Síntomas y diagnóstico

Entre los síntomas típicos se pueden mencionar poliuria, polidipsia, pérdida de

peso, polifagia y visión borrosa [American Diabetes Association, 2014; Canadian Diabetes Association, 2013].

La diabetes se puede diagnosticar aplicando los criterios (Tabla 1) en los niveles de glucosa plasmática, ya sea el valor de glucosa plasmática en ayunas (FPG) o el valor de glucosa plasmática de 2h (PG de 2 h) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 75 g (OGTT), o los criterios de A1C [ADA, 2021].

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes

<p>FPG ≥ 126 mg / dL (7.0 mmol / L). El ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 h. *</p> <p>PG 2 h ≥ 200 mg / dL (11,1 mmol / L) durante OGTT. La prueba debe realizarse como describe la OMS, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. *</p> <p>A1C $\geq 6,5\%$ (48 mmol / mol). La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que esté certificado por NGSP y estandarizado para el ensayo DCCT. *</p> <p>Glucosa plasmática aleatoria ≥ 200 mg / dL (11,1 mmol / L). En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica. Por sus siglas en inglés: DCCT, Ensayo de control y complicaciones de la diabetes; NGSP, Programa Nacional de Estandarización de la Glicohemoglobina.</p> <p>* En ausencia de hiperglucemia inequívoca, el diagnóstico requiere dos resultados de prueba anormales de la misma muestra o en dos muestras de prueba separadas.</p>
--

Epidemiología

La diabetes es una de las primeras causas de muerte en el mundo. En México es la tercera causa de muerte (Figura 2), después de la mortalidad por enfermedades del corazón y COVID-19. En 2011 se realizó la estimación del costo de atención a esta patología teniendo como resultado 7.7 mil millones de dólares. En 2016 la diabetes fue declarada emergencia epidemiológica en el país. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) en 2016 se analizaron 3,700 adultos participantes, teniendo como resultado que la prevalencia total de diabetes fue de 13.7% (9.5%

diagnosticada, 4.1% no diagnosticada); 68.2% de los diagnosticados presentó descontrol glucémico [Basto A. y cols., 2020].

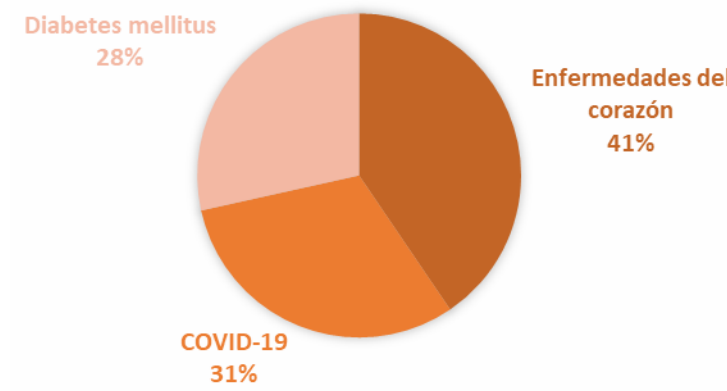


Figura 2. Principales causas de muerte en México en el periodo de enero-agosto 2020 [Modificada de INEGI, 2021].

Fisiopatología de la diabetes

Las anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas tienen origen en la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana [American Diabetes Association, 2011]. Dentro de los procesos patológicos implicados en el desarrollo de la diabetes podemos mencionar la hiperglicemia, glucotoxicidad, lipotoxicidad, autoinmunidad, inflamación, disminución del efecto incretina, resistencia a la insulina, el desequilibrio en concentración de adipocinas (Figura 3) y estrés oxidativo; algunos de éstos favorecen la destrucción autoinmune de las células β del páncreas [ADA, 2011; Cernea S. y cols., 2013].

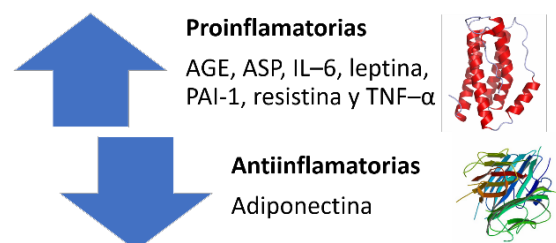


Figura 3. Desequilibrio en concentración de adipocinas (Imagen del autor).

- ❖ La DT1 representa del 5-10% de la diabetes, es ocasionada por la destrucción autoinmune celular mediada de las células β pancreáticas; tiene múltiples predisposiciones genéticas y también se relaciona con factores ambientales. Los marcadores autoinmunes incluyen autoanticuerpos de células de los islotes y autoanticuerpos contra GAD (GAD65), insulina, las tirosinas fosfatasas IA-2 e IA-2 β y el transportador de zinc 8 (ZnT8). [ADA, 2021].
- ❖ La DT2 representa del 90-95% del total de los diagnósticos de diabetes y engloba a las personas que tienen una deficiencia de insulina relativa [ADA, 2021]. Se caracteriza por niveles glicémicos elevados de manera crónica y alteración en el metabolismo de lípidos [Nolan C.y cols., 2011]; la mayoría de los pacientes con DT2 tienen sobrepeso u obesidad, el exceso de peso puede conllevar a la resistencia a la insulina sobre tejidos periféricos y al deterioro de la supresión de secreción de glucagón en respuesta a la ingesta de glucosa [Carrera A. y cols., 2013; Smushkin G. y cols., 2010].

La DT2 implica al menos dos mecanismos patológicos principales (Figura 4):

Disminución progresiva de la función celular de los islotes pancreáticos

- Genera la reducción de la secreción de insulina

Resistencia periférica a la insulina

- Ocasiona disminución de respuestas metabólicas a la insulina

Figura 4. Mecanismos patológicos principales de la DT2 (Imagen del autor).

Tanto en la diabetes tipo 1 como en el tipo 2, varios factores genéticos y ambientales pueden ocasionar la pérdida progresiva de la masa y/o función de las células β que clínicamente se manifiesta como hiperglucemia; una vez generada, los pacientes corren el riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque podrían diferir en las tasas de progresión [ADA, 2021].

La hiperglucemia que caracteriza a esta patología promueve la generación de radicales libres, que en su mayoría están conformados por especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$); su formación se debe a la autooxidación de la glucosa y glicosilación de proteínas [Al-Faris y cols., 2010]. La formación de estas ROS implica la activación de vías proinflamatorias en las que intervienen factores de transcripción redox sensibles, como, por ejemplo, el factor nuclear kappa B (NF κ B), activador de la proteína-1 (AP-1), factor de crecimiento de respuesta temprana (EGR-1) y la proteína de unión de la tiorredoxina, una vez activados inducen a su vez la presencia de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL-6) [González y cols., 2011]. Al disminuir la actividad antioxidante, los biomarcadores de estrés oxidante sistémico se incrementan [Mahmoud y cols., 2012]. Otro factor que favorece el estado proinflamatorio es la secreción de adiponectinas mediante el tejido adiposo; la leptina modula la activación y proliferación de linfocitos T, tiene efectos antiapoptóticos en el linfocito T, activa a los polimorfonucleares y potencia la producción de citocinas como interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (INF γ), estimula la respuesta de linfocitos T helper 1 (Th1) al inhibir a interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4) y además, estimula la proliferación de monocitos que producen las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF α [González y cols., 2011].

Células β

La diabetes engloba varios padecimientos crónico–degenerativos y constituyen un serio problema de salud pública, tanto la DT1 como la DT2 comparten como característica la hiperglucemia, debida a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización [Olvera G. y cols., 2008]. La masa de células β funcionales es resultado del número, tamaño y capacidad de células β para secretar insulina de manera adecuada en un organismo y es determinante en la homeostasis de la glucosa y la susceptibilidad a la diabetes [Johnson J. y cols., 2010]. La apoptosis es probablemente la principal forma de muerte de las células β en la DT1 y DT2 [Johnson J. y cols., 2010; Cnop M. y cols., 2005], esta puede presentarse en respuesta a diversas alteraciones que actúan mediante al menos tres vías:

- 1) Muerte celular inducida por citosinas mediada por receptores de muerte celular presentes en la superficie [Lupi R. y cols., 2008].
- 2) Alteración mitocondrial secundaria a radicales libres de oxígeno [Lupi R. y cols., 2008].
- 3) Estrés del RE [Lupi R. y cols., 2008].

Las células β pancreáticas proporcionan la energía necesaria para la biosíntesis de insulina y la exocitosis utilizando el catabolismo de la glucosa, además generan dentro de este metabolismo la señal para la secreción de insulina inducida por la glucosa; necesitan de glucosa y un medio intracelular rico en oxígeno para emitirla señal para la secreción de dicha hormona y el suministro adecuado en los tejidos diana periféricos para la regulación del metabolismo intermediario. Estas células están limitadas en la capacidad de inactivación de las ERO's por superóxido SOD, catalasa

y GPx [Lenzen S., 2008].

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes [Giacco F. y cols., 2010], de igual manera, una actividad exacerbada en la oxidación está relacionada con diversas etiologías de la resistencia a la insulina y con el desarrollo de la diabetes [Henriksen E. J. y cols., 2011]. El estrés oxidativo se produce por múltiples factores provenientes de diversas fuentes, podemos mencionar vías enzimáticas, no enzimáticas y mitocondriales; como factor dominante se tiene a la autooxidación de la glucosa, la cual genera radicales libres, otros son el desequilibrio celular de oxidación-reducción y la disminución de antioxidantes [Zatalia S. y cols., 2013; Chaturvedi N., 2007].

Función endocrina del tejido adiposo

El tejido adiposo se consideraba como un simple depósito de lípidos, actualmente es reconocido como un importante órgano endocrino regulador del balance Metabólico, comunica al cerebro el estado de las reservas energéticas mediante mensajeros hormonales como la leptina [Trujillo ME. y cols., 2006; Torrades S., 2005], el tejido adiposo blanco está asociado a la obesidad y a diversos cuadros patológicos [Alessi MC. y cols., 2003], se compone de diferentes tipos de células, tales como macrófagos, monocitos, eritrocitos, pericitos y adipocitos (Figura 5); estos últimos son las células más abundantes y tienen una gran importancia en la regulación del metabolismo general [Sánchez JC. y cols. 2015].

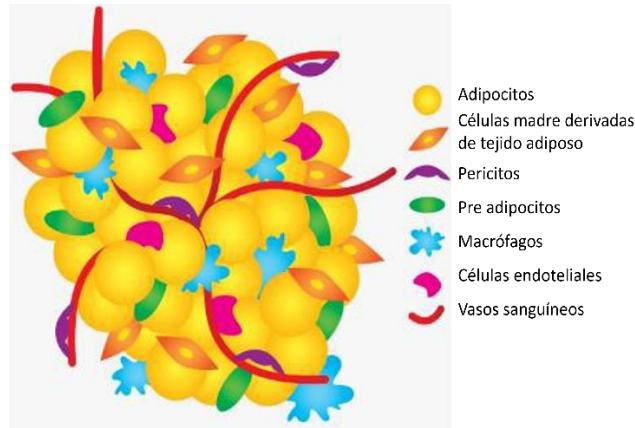


Figura 5. Biología del adipocito [Clipartkey, 2021].

El conocimiento de la biología del adipocito es imprescindible para la comprensión de las bases moleculares de la obesidad y las patologías que se le asocian [Haque WA. y cols., 2004], es la unidad básica del tejido adiposo. Estas células funcionan como una sola unidad respondiendo a las señales aferentes de los sistemas endocrino y nervioso para la movilización de sus lípidos, también secretan un sinnúmero de mediadores metabólicos, como citocinas y hormonas con funciones metabólicas primordiales en la regulación del peso corporal, en la función vascular y en la sensibilidad insulínica [Alcalá H.C. y cols., 2015].

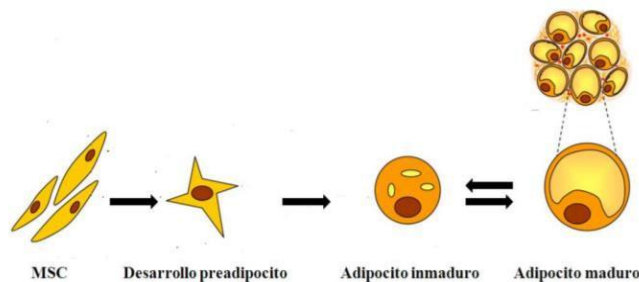


Figura 6. Diferenciación de los adipocitos (Flechas en ambos sentidos por la capacidad de retroceder a fase anterior en situaciones de escasez de energía)

[Palomares C.B., 2016].

Tratamientos convencionales

El tratamiento de la diabetes está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y a la prevención de complicaciones agudas y crónicas. Las estrategias de tratamiento se dividen en no farmacológicas, como la dieta y el ejercicio, y las farmacológicas que se clasifican en medicamentos orales y en medicamentos inyectables, siendo la insulina la más común [Mateos N., 2002]

Antidiabéticos orales

Los anti hiperglucemiantes orales representan variados grupos farmacológicos que se emplean para el control temporal de los niveles de glucosa en pacientes con DT2, pero no disminuyen las concentraciones en la DT1. Existe gran variedad de tratamientos, los cuales se clasifican de la siguiente manera (Figura 7) [Merck Sharp & Dohme Corp., 2020; Ruiz G., 2019]:

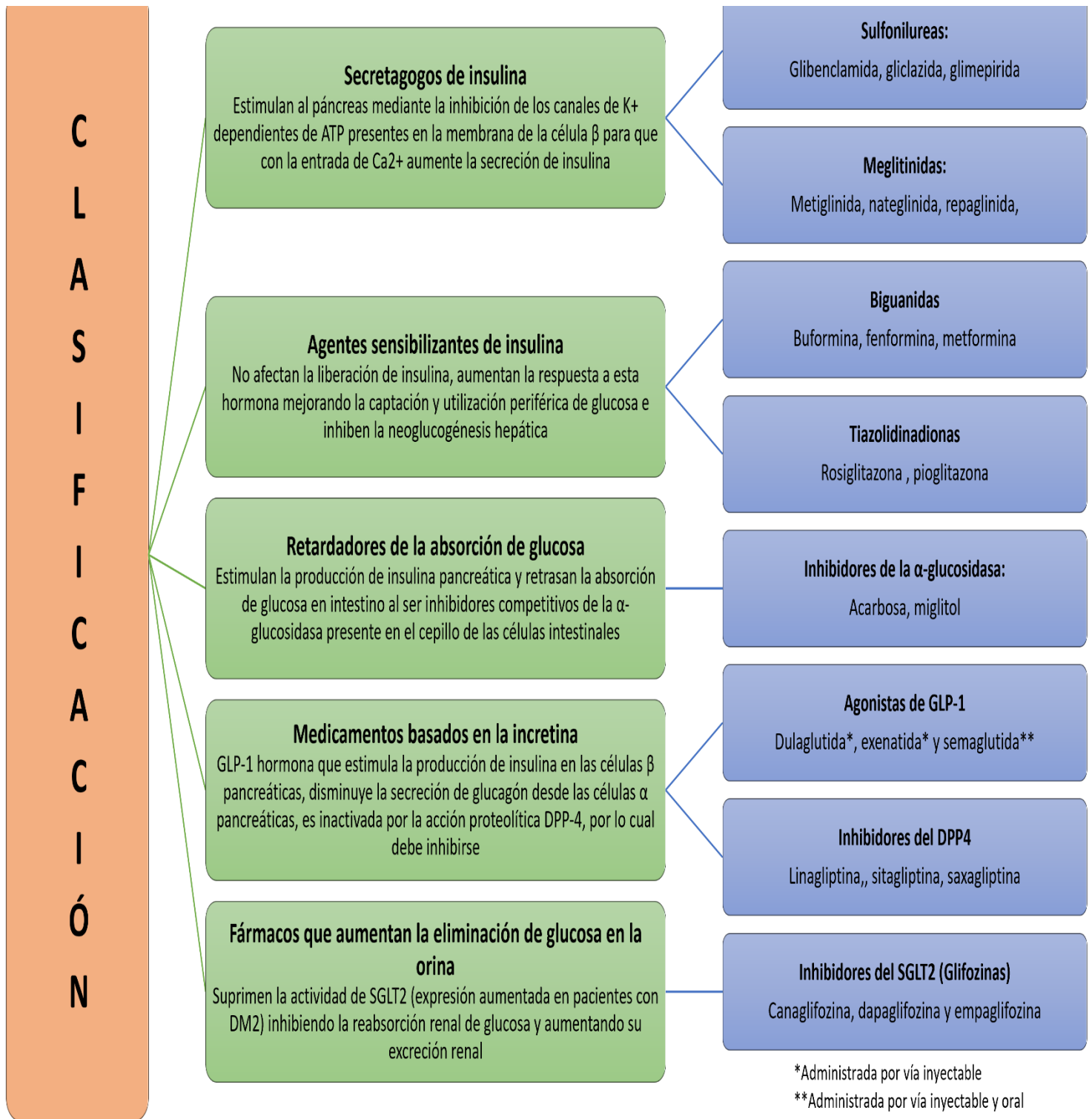


Figura 7. Clasificación de los anti hiperglucemiantes orales con su descripción del mecanismo de acción y ramificación de las familias con sus fármacos representativos (Imagen del autor).

Antidiabéticos inyectables

La insulina es el fármaco anti hiperglucemiante inyectable más utilizado, pero existen otros dos tipos que tienen en común retardar el paso de los alimentos por el estómago generando saciedad durante más tiempo [Merck Sharp & Dohme Corp., 2020]:

- Medicamentos tipo Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1): su acción es incrementar la secreción de insulina pancreática, como efectos secundarios se han reportado náuseas y vómitos, además aumentan el riesgo de pancreatitis.
- Fármacos análogos de la amilina (hormona pancreática que regula los niveles de glucosa postprandial en sangre). En la actualidad la pramlintida es el único fármaco disponible de este tipo, suprime la secreción de glucagón, ayuda a reducir la concentración de glucosa en sangre.

Blancos moleculares

El tratamiento actual de la DT2 es de vital importancia, un cambio en el estilo de vida, como la realización de ejercicio y dieta, asimismo, el uso de medicamentos que incrementan la secreción de insulina o que mejoran la acción de ésta en los órganos diana. Dentro de ésta diversidad de tratamientos se encuentran los inhibidores la α -glucosidasa y de DPP4, de igual manera, otro blanco importante es el PPAR γ ; que al unirse a ciertos ligandos es capaz de reducir la producción de proteína C reactiva, TNF α , IL-6 y moléculas de adhesión vascular.

Respecto a los fármacos inhibidores de la α -glucosidasa (enzimas ubicadas en las vellosidades del tubo digestivo) actúan inhibiendo a las enzimas del borde en cepillo del enterocito; maltasas, sacarasas, dextrinasas y glucoamilasas que hidrolizan los

oligosacáridos a disacáridos y monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa) que posteriormente son absorbidos. Ésta enzima es esencial para el catabolismo de glucógeno a glucosa en los lisosomas, ya que éste proceso de degradación evita la sobreacumulación de glucógeno en diferentes células del cuerpo [De Juan RD., 2020].

El efecto de la inhibición de DPP-4 en DT2 es que incrementa el nivel de GLP-1 y GIP prolongando su actividad, lo cual se traduce en un aumento de la secreción de insulina lo cual conlleva a la disminución de los niveles de glucosa sanguínea [Yap CK y cols., 2017].

El PPAR γ es un receptor nuclear que tiene la capacidad de acoplarse con una gran variedad de moléculas e induce modificaciones estructurales según la naturaleza del ligando, además es fundamental para la diferenciación y proliferación de los adipocitos, en consecuencia, produce una captura de ácidos grasos y consecuentemente su almacenamiento. Asimismo aumenta la utilización de glucosa y favorece la acción metabólica de la insulina; colateralmente incrementa la producción de adiponectina y decrece la 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. A nivel de músculo esquelético también incrementa la utilización de glucosa y el catabolismo de ácidos grasos; simultáneamente, a nivel hepático ejerce un efecto positivo sobre el metabolismo de glucosa y ácidos grasos. En resumen, tiene una acción positiva sobre el metabolismo de lipoproteínas y la oxidación de ácidos grasos; por otra parte muestra un efecto inhibitor benéfico sobre procesos inflamatorios de la pared vascular [Zárate A y cols., 2005].

Tratamientos terapéuticos alternativos

A través de los años las plantas medicinales han sido consideradas como punto de partida para el desarrollo de medicamentos, han contribuido al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitoterápicos, además son la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países. Según la OMS, alrededor del 80 % de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio medicinal, el uso de la medicina complementaria y alternativa (MCA) ha incrementado durante los últimos años, teniendo como objetivo tanto la prevención como el tratamiento de enfermedades, ya sea agudas o crónicas, como la diabetes [Cuenca L y cols., 2020]. La búsqueda de tratamientos alternativos nos conduce a recurrir a ramas de la ciencia, como lo es la química medicinal.

Química medicinal

La finalidad de la química medicinal es la búsqueda de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales o síntesis orgánica mediante técnicas computacionales, teniendo alta posibilidad de encontrar moléculas de estructuras novedosas con posibilidad de interaccionar específicamente y con gran afinidad con diversos blancos moleculares involucrados en procesos fisiopatológicos. Estos compuestos pueden representar prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos fármacos [Facultad de química -UAQ, 2021].

Con el fin de desarrollar moléculas con posibilidades elevadas de presentar la actividad biológica deseada se recurrió al empleo de herramientas computacionales, originando así la química computacional, dicha rama de la química fue impulsada por

las compañías farmacéuticas importantes del mundo y además coincidió con la innovación tecnológica en el área de cómputo. El diseño de fármacos está basado en métodos computacionales, los cuales han logrado que el valor predictivo de las técnicas de modelado molecular tenga buenos avances a través del tiempo, se destacan tres etapas importantes: Al inicio se limitaban a investigaciones en las que las estructuras químicas eran consideradas como cuerpos rígidos y se buscaba establecer las posibles interacciones entre las moléculas, a finales de los años setenta ya existían herramientas más avanzadas enfocadas en la dinámica molecular, lo que permitía hacer cálculos sobre aproximaciones más avanzadas y la última etapa relevante se dio a mediados de los ochenta, caracterizándose por la aplicación detallada de los cálculos de energías libres [Boker J. y cols., 1994; Giacobini E., 1997]. Actualmente, se recurre a este tipo de herramientas bioinformáticas que mediante modelos y simulaciones computacionales de sistemas moleculares nos predicen posibles actividades farmacológicas y toxicológicas, entre otras, lo cual facilita el diseño racional de fármacos y por lo tanto agiliza la creación de nuevas alternativas terapéuticas, disminuyendo además la inversión tanto de tiempo como de dinero [García y cols., 2019].

Estudios *in silico*

Se conoce como modelos *in silico* al uso de herramientas de cómputo con el propósito de recreación de estructuras complejas, haciendo referencia a la estructura interna de las computadoras; sílice [Scior T. y cols., 2007].

Se estima que el proceso estándar para producir un nuevo fármaco puede durar hasta 15 años y requiere una enorme cantidad de dinero, por ello, las herramientas

computacionales se han hecho imprescindibles para el desarrollo de fármacos; las investigaciones se han acelerado al codificar con precisión modelos teóricos gracias a su capacidad de procesar grandes cantidades de información [Saldívar F., 2017]. El diseño de fármacos tiene como principio entender la relación farmacológica estructura-actividad de los compuestos químicos. Uno de los métodos computacionales que se emplean con frecuencia en la identificación de compuestos líder y su optimización es el acoplamiento molecular (docking), el cual consiste en buscar la conformación y posición óptima de un ligando dentro de una diana molecular, con la finalidad de encontrar el sitio más idóneo y la unión que requiere menos energía. Este conjunto de métodos conforma el cribado virtual, el cual permite aplicar una serie de filtros a los datos obtenidos; son analizados y se considerarán diversos criterios, como las reglas 5 de Lipinski y de Veber, con el propósito de seleccionar a los mejores candidatos que se pueden llevar a evaluación experimental *in vitro* o *in vivo* para verificar los resultados previos. Para ser considerados potencialmente fármacos orales, los compuestos químicos deben de cumplir ciertas reglas que describen las propiedades moleculares de importancia farmacocinética, Christopher Lipinski estableció unas reglas conocidas como reglas 5 de Lipinski (Figura 8). Si dos o más de estos parámetros se encuentran fuera de rango es muy probable que el compuesto presente escasa solubilidad o bien una pobre absorción y permeabilidad [Duchowicz, P. R., 2006]. De esta manera, reduce significativamente el número de ensayos biológicos que se harían si no hubiera una selección de compuestos [Saldívar F., 2017; Scior T. y cols., 2007].

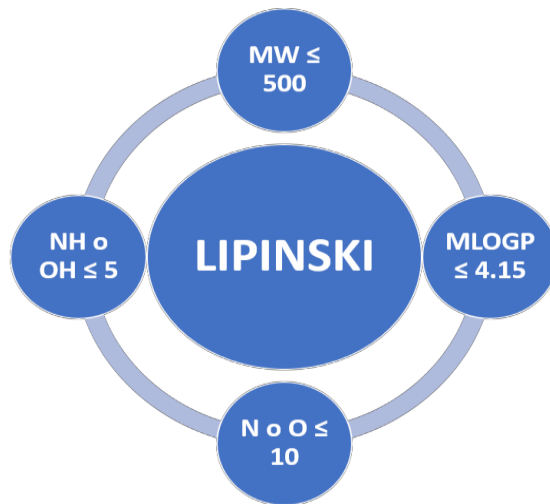


Figura 8. Reglas de Lipinski (Imagen del autor).

Estudios *in vitro*

Existen varios métodos *in vivo* e *in vitro* disponibles para la detección de nuevos fármacos antidiabéticos. Existe gran variedad de modelos experimentales *in vivo*, tanto genéticos como no genéticos, siendo los no genéticos los más empleados, utilizan principalmente compuestos que degradan las células β pancreáticas, como aloxano, ciproheptadina, clorozotocina, estreptozotocina, entre otros [Hemlata D. y cols., 2017; Smirnov A. y cols., 2012]. Las técnicas *in vitro* muestran directamente el efecto sobre las células implicadas en la diabetes, proporcionando datos más precisos y los posibles mecanismos implicados en la enfermedad [Hemlata D. y cols., 2017], para ello se recurre al uso de herramientas de diagnóstico para evaluar el efecto biológico de determinados compuestos; los cultivos celulares.

Líneas celulares

Los cultivos celulares son el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos pluricelulares, son agentes biológicos y se dividen en cultivos celulares

primarios y en cepas celulares bien definidas [Beltrán V. Nohra, 2016]. Las diversas líneas celulares comerciales derivadas de humanos y animales tienen protocolos de mantenimiento y diferenciación estándar, en el caso de preadipocitos se basan principalmente en medios de cultivo suplementados con insulina y corticoides que intervienen favorablemente en la maduración del adipocito al promover su metabolismo y la formación de vacuolas que almacenan grasas, incrementando la actividad adipogénica y por ende el número de células maduras en el cultivo [Sánchez JC. y cols. 2015]. El proceso de diferenciación mediante el cual las células mesenquimales precursoras multipotenciales dan origen a adipocitos maduros se conoce como adipogénesis (Figura 9), sucede por la activación de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción, el cual conduce a cambios en la actividad y/o en la cantidad de proteínas clave en la fisiología del adipocito [Gregoire FM, 2001].

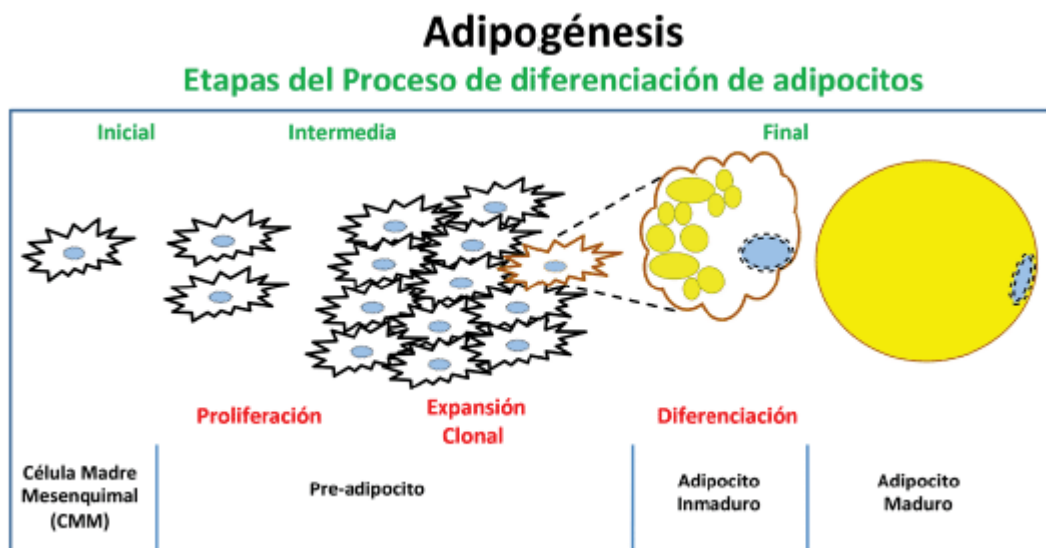


Figura 9. Adipogénesis, esquema simplificado de las etapas de diferenciación de adipocitos. [Tomada de Rojas-Gómez y cols., 2016]

Cultivo celular 3T3-L1

Las células 3T3-L1 cuando no están diferenciadas presentan morfología de fibroblastos, por lo que también se les conoce como fibroblastos 3T3-L1, este cultivo celular es desarrollado a través del aislamiento de un clon de 3T3, es una línea celular derivada de células embrionarias de ratón, es de crecimiento continuo de preadipocitos que puede diferenciarse a adipocitos mediante una rápida división hasta la confluencia, alcanzando un estado de inhibición por contacto [Clavijo MA. y cols., 2007; Clavijo M.A. y cols.,2007].

El proceso de diferenciación de adipocitos (Figura 10) ha sido principalmente estudiado usando modelos *in vitro* de adipogénesis, siendo las líneas celulares de ratón 3T3-L1 y 3T3 F442A las más ampliamente utilizadas, estas células son aisladas de embriones de ratones de la línea Swiss 3T3 [Alcalá H.C. y cols., 2015].

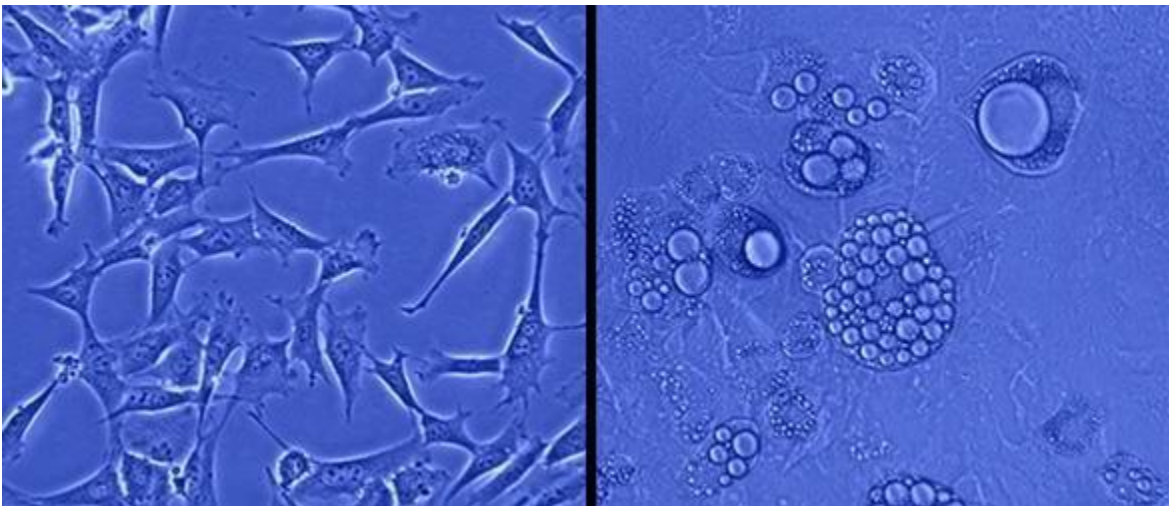


Figura 10. Diferenciación de fibroblastos a adipocitos estudio [Tomada de NEXciencia, 2021].

La línea celular 3T3-L1 tiene como principal ventaja que todas las células están en el mismo estado de diferenciación, lo que les permite responder de forma similar a

diferentes tratamientos. Además, las células pueden ser sub cultivadas numerosas veces, por lo cual provee una fuente continua de preadipocitos para la investigación [Alcalá H.C. y cols., 2015].

Ensayo de MTT

Este ensayo se utiliza para la evaluación de las propiedades citotóxicas, determina la funcionabilidad mitocondrial de las células, ha sido bastante utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

Su fundamento se basa en la reducción metabólica (Figura 11) del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), cuando ésta sal de tetrazolio se añade al cultivo disuelta en PBS, las células viables la incorporan en su interior. Una vez en el citoplasma atraviesa la doble membrana mitocondrial, donde la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa reduce el MTT soluble generando formazan insoluble; es un compuesto color azul cuya concentración es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Las células muertas y las que presentan daños en su membrana plasmática o una disfunción mitocondrial en consecuencia a la acción citotóxica de un xenobiótico no pueden reducir el MTT y, por lo tanto, no producen formazán. Una vez retirada la solución de MTT, éste es disuelto al agregar 100 µL/pocillo de dimetil sulfóxido (DMSO), se agita durante 10 segundos previo a la lectura de absorbancia (densidad óptica). Este método fue desarrollado por Mosmann (1983) y posteriormente modificado por Francois Denizot y Rita Lang en 1986 [ReserchGate, 2019; Peropadre LA, 2014].

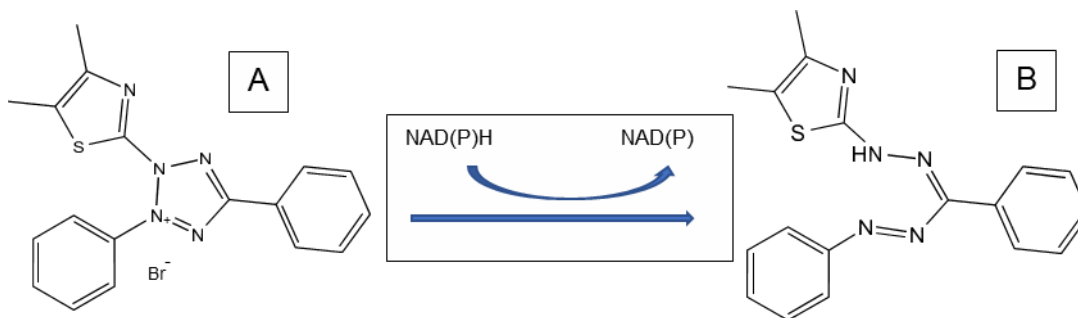


Figura 11. Reducción de MTT (A) a formazan (B). (Imagen del autor).

Generalidades de los ácidos polifenólicos

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos que se denominan polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario, participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y diversos estímulos biológicos. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), los estilbenos, los lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides [Quiñones M. y cols., 2012].

Actividad biológica

Los polifenoles naturales tienen una alta capacidad antioxidante y se consideran como agentes potenciales para prevenir y tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Poseen otras propiedades que los hacen benéficos para la DT2, pueden participar en la inhibición de la α -amilasa o α -glucosidasa (disminuyendo la digestión

del almidón y la glicación avanzada), en la protección de células β pancreáticas contra la toxicidad de la glucosa y otros efectos antiinflamatorios (mejorando la sensibilidad a la insulina). El inconveniente es que varios de los beneficios fueron observados con dosis bastante elevadas, tanto en modelos animales como en modelos celulares [Carpéné et al., 2015; Xiao et al., 2015]. Uno de los mayores intereses se centra particularmente en los efectos de los polifenoles en el tejido adiposo, ya que está involucrado principalmente de manera cualitativa en el control del metabolismo de la glucosa, además es almacén del exceso de energía y la producción de adipocinas que realiza el TAB en individuos obesos está fuertemente influenciada por la presencia de macrófagos infiltrados; los cuales representan una fuente adicional de mediadores solubles que puede contribuir y perpetuar tanto la inflamación sistémica como la local [Gómez R y cols., 2008]. Además, el tejido adiposo es de acceso relativamente fácil en individuos obesos y tiene mucha actividad amino oxidasa: monoamino oxidasa y SSAO/VAP-1 (una proteína de membrana que participa en la adhesión de los linfocitos a los vasos en los sitios de inflamación). La forma soluble circulante de SSAO/VAP-1 aumenta en la diabetes. Es de suma importancia mencionar que en preadipocitos y adipocitos hay mucha sinergia cuando se asocian dos o varios polifenoles, parece que el uso combinado de este tipo de compuestos puede ser una buena vía terapéutica para reducir las complicaciones asociadas a la diabetes u obesidad, otro severo problema de salud pública a nivel mundial, especialmente particular en la población mexicana [Carpéné et al., 2015; Xiao et al., 2015].

Composición química de los compuestos propuestos

- Ácido clorogénico de nombre IUPAC ácido (1 S, 3 R, 4 R, 5 R)-3-[(E)-3-(3,4

dihidroxifenil) prop-2-enoil] oxi-1, 4, 5-trihidroxiciclohexano-1-carboxílico es el principal compuesto polifenólico en el café, reconocido como antioxidante que además tiene la característica de ralentizar la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo posterior a una comida. Es un éster de cinamato obtenido por condensación formal del grupo carboxilo del ácido trans-cafeico con el grupo 3-hidroxi del ácido quínico. Es un metabolito intermedio en la biosíntesis de lignina. Tiene un papel como metabolito vegetal y componente alimentario [Biblioteca nacional de medicina, 2020].

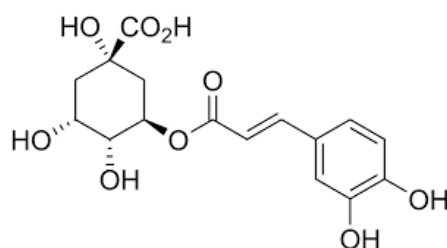


Figura 12. Estructura del ácido clorogénico (Imagen del autor)

- Ácido quínico de nombre IUPAC ácido (3R, 5R)-1, 3, 4, 5-tetrahidroxiciclohexano-1-carboxílico se encuentra en la corteza de cinchona y en otras partes de las plantas, es un ácido conjugado de un (-)-quinato [Biblioteca nacional de medicina, 2020].

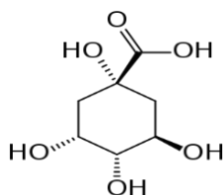


Figura 13. Estructura del ácido quínico (Imagen del autor)

- Ácido cafeico de nombre IUPAC ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoico, es un derivado del ácido hidroxicinámico y polifenol, biodisponible por vía oral, con posibles actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antineoplásicas. Tras la administración, el ácido cafeico actúa como antioxidante y previene el estrés oxidativo, evitando así el daño del ADN inducido por los radicales libres [Biblioteca nacional de medicina, 2020].

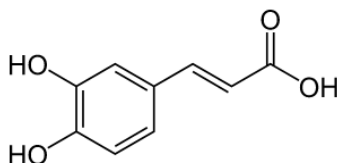


Figura 14. Estructura del ácido cafeico (Imagen del autor)

- Ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) de nombre IUPAC ácido (E)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-enoico tiene un papel como metabolito vegetal, es un ácido conjugado de un 4-cumarato [Biblioteca nacional de medicina, 2020].

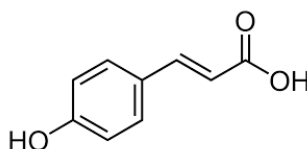


Figura 15. Estructura del ácido p-cumárico (Realización propia)

- Ácido ferúlico de nombre de IUPAC ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enoico también conocido como ácido trans-ferúlico es un fitoquímico fenólico muy abundante que está presente en las paredes celulares de las plantas, puede ser absorbido por el intestino delgado y excretado a través de la orina.

Es uno de los ácidos fenólicos más abundantes en las plantas [Biblioteca nacional de medicina, 2020].

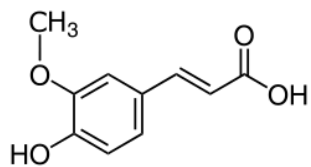


Figura 16. Estructura del ácido ferúlico (Realización propia)

2. JUSTIFICACIÓN

Existe una gran variedad de tratamientos farmacológicos para una de las enfermedades con mayor impacto a nivel mundial, la diabetes diabetes, sin embargo, se han reportado diversos e importantes efectos adversos. Los polifenoles son compuestos presentes en los alimentos de origen vegetal y pueden impactar favorablemente la ingesta y regulación de la glucosa, adipogénesis, lipólisis, metabolismo de los lípidos y el control del apetito, debido a todas estas características documentadas nos resultó de gran interés investigar si los ésteres de polifenol; los ácidos clorogénico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y quínico podrían presentar efecto antidiabético al actuar sobre algunos blancos terapéuticos implicados en la diabetes, tales como el PPAR γ , la DDP4 y/o la α -glucosidasa.

3. HIPÓTESIS

Los ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico, quínico y p-cumárico, compuestos polifenólicos que forman parte del grupo de los ácidos cinámicos, presentarán *in silico* interacciones moleculares de gran afinidad con las proteínas PPAR γ , DPP4 y α -Glucosidasa, las cuales están involucradas en la fisiopatología de la diabetes. De ahí que los resultados *in silico* permitirán seleccionar a los compuestos con mayor potencial de efecto hipoglucemiante para posteriormente evaluar su citotoxicidad *in vitro* empleando la línea celular 3T3-L1, utilizando el método de MTT.

4. OBJETIVOS

Objetivos generales

Estudiar *in silico* y evaluar la toxicidad *in vitro* de compuestos polifenólicos con posible efecto hipoglucemiante.

Objetivos particulares

- Obtener los parámetros fisicoquímicos, toxicológicos y de metabolismo de una familia de compuestos polifenólicos a través de un tamizaje virtual obtenido a partir de diversas plataformas utilizadas en el diseño de fármacos asistido por computadora.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular (docking) y determinar las interacciones intermoleculares de todos los compuestos de origen polifenólico propuestos con proteínas asociadas a la fisiopatología de la diabetes; PPAR γ , DDP4 y α -glucosidasa.
- Evaluar la toxicidad *in vitro* de los compuestos más prometedores con base en los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular, empleando la línea celular 3T3-L1

5. METODOLOGÍA

Este trabajo de investigación de compuestos polifenólicos con posible efecto antidiabético se realizó en dos etapas que consistieron en el estudio *in silico* y la evaluación toxicológica *in vitro*.

Estudio *in silico*

En la época actual existe gran diversidad de bases de datos y softwares que son herramientas imprescindibles para el diseño racional de fármacos, cuyo beneficio consiste en las predicciones que nos puede proporcionar acerca de información clave de los compuestos de interés, como son, las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, toxicológicas y de bioactividad. Por ello, se recurrió al uso de algunas de éstas herramientas para predecir las propiedades de los compuestos polifenólicos propuestos.

Material

Hardware

- Una computadora con sistema operativo Windows 10, procesador Intel® Core™i5 y memoria RAM 12GB, en la cual se permite el trabajo en plataformas en línea y en Softwares para visualizar estructuras moleculares y realizar cálculos de propiedades químicas, fisicoquímicas, toxicológicas y metabólicas.
- Una Workstation con sistema operativo Linux, procesador AMD A9 e Intel® Core™i7 y memoria RAM 12 GB, para realizar los estudios de acoplamiento molecular (docking).

Software

- Plataformas en línea para realizar cálculos de las propiedades farmacocinéticas,

de metabolismo y de toxicidad (Molinspiration Cheminformatics, SwissADME, OSIRIS Property Explorer y way2drug).

- Base de datos en línea Protein Data Bank para obtener la estructura 3D de las proteínas PPAR γ , DDP4 y α -glucosidasa.
- Programas computacionales para dibujar estructuras químicas, calcular propiedades fisicoquímicas, realizar estudios de acoplamiento molecular y programas con interfaz para visualización de estructuras químicas (Molinspiration Cheminformatics, ChemDraw Ultra 12.0, DataWarrior, Gauss View 5.1, Gaussian 09, AutoDock tools, AutoDock 4.0 y Discovery Studio).

Métodos

Se dibujaron las estructuras químicas de los compuestos polifenólicos y los fármacos de referencia con los softwares Gauss View y Chems sketch, y se obtuvieron los códigos de especificación de introducción lineal molecular simplificada (SMILE) para posteriormente poder obtener la predicción de las demás propiedades. Se llevó a cabo el screening virtual de los compuestos polifenólicos y los fármacos de referencia en las plataformas en línea Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), DataWarrior, OSIRIS Property Explorer y SwissADME.

Para la predicción de las propiedades moleculares de los compuestos se ocupó la base de datos Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) y el software DataWarrior, se calcularon las siguientes propiedades para determinar las violaciones a los parámetros de las reglas de Lipinskiy [Veber y cols., 2002]: la masa molecular, el predictor de solubilidad cLog P, el número de grupos funcionales aceptores de puentes de hidrógeno, número de grupos funcionales donadores de

puentes de hidrógeno, el número de ángulos rotables, el área de superficie polar molecular [Cheng y cols., 2012]. Para la predicción de parámetros de toxicidad se recurrió a las herramientas bioinformáticas DataWarrior (DW) y OSIRIS Property Explorer (OPE), donde se determinó la presencia o ausencia de mutagenicidad, carcinogenicidad, efectos sobre la reproductividad e irritabilidad, además se determinó una puntuación de fármaco (Drug Score) para cada molécula que oscila en el rango de 0 a 1.0.

Respecto a la predicción de parámetros de solubilidad acuosa, farmacocinética y química medicinal de los fármacos hipoglucemiantes de referencia y los compuestos polifenólicos propuestos fueron obtenidos con el servidor en línea SwissADME. Se determinó: LogS, solubilidad, clase, GI, BHE, P-gp, citocromo P450, biodisponibilidad, similitud de fármacos (Lipinski, Ghose, Veber, Egan y Muegge) y química medicinal (PAINS, Brenk y accesibilidad de síntesis).

Se optimizaron las estructuras 3D de los compuestos polifenólicos y los fármacos hipoglucemiantes de referencia utilizando el software Gaussian 09. Se descargaron las estructuras 3D de las proteínas de interés farmacológico de la plataforma Protein Data Bank y se les dio tratamiento bioinformático con el software AutoDock Tools.

Se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento molecular (docking) entre las estructuras optimizadas de los compuestos polifenólicos y los fármacos hipoglucemiantes de referencia con los targets farmacológicos con el software AutoDock 4.0.1 Obteniéndose los siguientes datos: ΔG (kcal/mol), K_i , aminoácidos interacción y target farmacológico.

Para el análisis del modo de interacción de los compuestos con su receptor se procedió de la siguiente manera: Las coordenadas atómicas de la estructura 3D del

receptor-ligando fueron obtenidas de la base de datos del banco de proteínas RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>); la estructura cristalina fue 2XKW (resolución de 2.02 Å) para PPAR- γ , 3WQH (resolución de 2.85 Å) para DPP-4 y 5NN3 (resolución de 1.90 Å) para α -glucosidasa [Cronet y cols., 2001]. Respecto a las estructuras 2D de los ligandos (Pioglitazona, Anagliptina, Miglitol, Ácido clorogénico, Ácido cafeico, Ácido ferúlico, Ácido quínico y Ácido p-cumárico.) se dibujaron con el software ChemDraw Profesional 15-1. Se seleccionó el ligando completo y se limpió la estructura. Una vez seleccionado el ligando, se optimizó y se agregaron los hidrógenos; cada ligando se guardó en formato.mol. Para realizar una optimización geométrica (minimizar la energía) del ligando se ocupó el software HyperChem y se guardó en formato pdb. Al tener los formatos pdb, se utilizó el programa Autodock Tools 1.5.6. para preparar la estructura de la proteína; se eliminaron las moléculas de agua; se preparó el ligando en formato pdbqt. Se realizó un docking ciego con dimensiones de 126 Å³, posteriormente se colocaron los parámetros utilizando el algoritmo genético Lamarckiano con 100 corridas, 100 poblaciones y 10 000 000 de evaluaciones [Figueroa y cols., 2013; Da Costa y cols. 2007]. Después se corrió el Grid en una terminal Linux, para ejecutar los docking se utilizó el software AutoDock 4 [Figueroa y cols., 2013]. Finalmente, utilizando el visualizador del software AutoDockTools 1.5.6 se seleccionaron las estructuras con la conformación energéticamente más favorable (menor ΔG), y se guardaron en formato pdb. Se utilizó el software Discovery Studio 2017, para obtener el diagrama 2D de las interacciones del ligando con los aminoácidos [Elmazar y cols., 2013].

Se analizaron los resultados obtenidos para seleccionar a los compuestos más promisorios que posteriormente fueron evaluados *in vitro*.

Evaluación *in vitro*

Los cultivos celulares se almacenaron en incubadora refrigerada Heratherm (Thermo Scientific™ 51031567) bajo las siguientes condiciones: Atmosfera de 5% CO₂, temperatura de 37°C y cambio de medio (DMEM) cada tercer día.

Antes de ingresar cualquier material, reactivo y/o instrumento a la campana de flujo laminar se roció con solución de etanol al 70% y se quitó el exceso con una gasa previamente esterilizada.

Reactivos y equipos

- Solución de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 0.5 M en dimetilsulfóxido (DMSO).
- Solución de insulina humana recombinante 10 mg/mL.
- Solución de dexametasona 10 mM en etanol.
- Solución de lavado tripsina 1X.
- Suero fetal bovino (SFB).
- Hybri-Max™.
- Dimetil sulfóxido de grado reactivo (DMSO).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT).
- Línea celular de preadipocitos 3T3-L1 (ATCC® CL-173™, línea derivada de células embriónicas de ratón y desarrollada a través del aislamiento de un clon de 3T3; se mantuvo de acuerdo con las especificaciones de American Type Culture Collection (ATCC).
- Medio para la propagación de células 3T3-L1 (DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco, es un medio de cultivo artificial basal, se le adicionan nutrientes y no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento, se prepara con

suero fetal bovino al 10% y antibióticos; penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml).

- Solución de azul tripano al 0.4% (en PBS).
- Medios basales de adipogénesis (DMEM con suero fetal bovino al 10% y antibióticos).
- Medio de diferenciación (medio de crecimiento suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 0.5 mM, dexametasona 1 µM e insulina 1.7 µM).
- Ácidos polifenólicos SIGMA-ALDRICH; ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido ferúlico.
- Espectrofotómetro o lector de multi modal de microplacas de 96 pocillos (Thermoscientific-Multiskan Sky with Cuvette & Touch Screen).
- Contador de células automático Corning
- Autoclave, balanza analítica, baño María, campana de flujo laminar (NUAIRE A2 NU-543-400), centrifuga refrigerada de alta velocidad con rotores de ángulo fijo para tubos de distintas capacidades, incubadora de CO₂ refrigerada Heratherm (Thermo Scientific™ 51031567), microscopio óptico binocular invertido (MOTIC AE-20), micropipetas de volúmenes variables, entre otros.

Métodos

A continuación, en la figura 17 se muestran de manera general los métodos empleados para la evaluación *in vitro*.

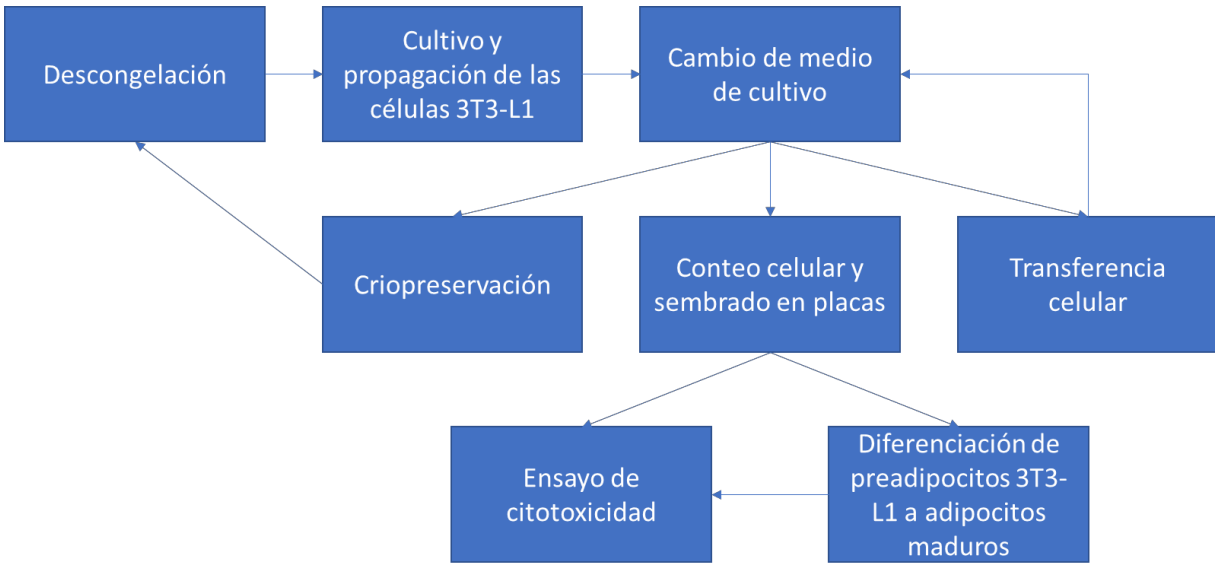


Figura 17. Métodos empleados para la evaluación *in vitro* (Imagen del autor)

Descongelación de células 3T3-L1

Se retiraron los crioviales que contienen las células del REVCO (conservadas a -80°C en SFB) para proceder a la descongelación rápida; se introdujeron los crioviales a un vaso de precipitados de 5 mL que contenía agua pura caliente, posteriormente se introdujeron los crioviales dentro de la campana de flujo laminar y se re suspendió el contenido de cada uno en 4 mL de DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ (Con SFB al 10% y antibióticos; penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un tubo Falcon de 10mL. Se adicionaron 4 mL más de DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ para homogenizar la solución con ayuda de una micropipeta con punta.

Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

Se sembraron las células en cajas Petri de 60 mm o 100 mm y/o botellas de 25 mm o

100 mm, se adicionó DMEM, la cantidad depende del tamaño del recipiente contenedor del cultivo celular. Horas después, se observaron las células sembradas bajo el microscopio invertido para verificar que ya se adhirieron a la caja y/o botella, almacenar en la incubadora. Al tercer día, se observó bajo el microscopio invertido la morfología y la proliferación celular en los recipientes con cultivos celulares, se realizó cambio de medio cada tercer día hasta alcanzar una confluencia de 80-90%.

Cambio de medio de cultivo

Tras observar bajo el microscopio invertido la morfología y confluencia de las células se introdujeron los recipientes con el cultivo celular dentro de la campana de flujo laminar, se decantó la mitad de medio. Con ayuda de una micropipeta se vertió por la pared de la caja Petri y/o botella la cantidad de DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ necesario según la capacidad de la caja Petri y/o botella en la que se cultivó (60mm \approx 4mL, 100mm \approx 6mL; 25mm \approx 4mL, 100mm \approx 15mL), se tapó inmediatamente el recipiente.

Se observaron los recipientes bajo el microscopio invertido para corroborar el buen estado del cultivo celular y posteriormente se almacenaron en la incubadora.

Criopreservación

Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia $\approx 80\%$, se introdujeron los recipientes con el cultivo celular dentro de la campana de flujo laminar, se decantó el medio de cultivo, se lavaron las cajas Petri y/o botellas un par de veces con una solución de PBS $\approx 37^{\circ}\text{C}$ y se les adicionó una solución de Tripsina 1X $\approx 37^{\circ}\text{C}$ para desprender las

células del fondo del recipiente; se almacenaron los recipientes en la incubadora durante 5-7 minutos y transcurrido el tiempo se verificó bajo el microscopio invertido que las células ya no estuvieran adheridas. Se introdujeron los recipientes que contenían la solución celular dentro de la campana de flujo laminar, se les adicionó DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ en la misma cantidad adicionada de Tripsina 1X, se traspasaron las células a tubos Falcon y se llevaron a centrifugación durante 10 minutos a 4°C y 3000 RPM. Inmediatamente se decantó el medio cuidando que no se decantara también el botón o parte de éste, se adicionó 1 mL de SFB $\approx 37^{\circ}\text{C}$ y 10 μL de Hybri-MaxTM a T ambiente al tubo Falcon que contenía el botón celular, se homogeneizó la solución con ayuda de una micropipeta evitando la formación de burbujas y se vertió el contenido en un criovial previamente etiquetado. Se selló por fuera la tapa del criovial con Parafilm, se almacenó el criovial en el refrigerador a -8°C hasta que el contenido se congeló y posteriormente se guardó en el REVCO.

Transferencia celular

Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia $\approx 80\%$, se introdujeron los recipientes con el cultivo celular dentro de la campana de flujo laminar, se decantó el medio de cultivo, se lavaron las cajas Petri y/o botellas un par de veces con una solución de PBS $\approx 37^{\circ}\text{C}$ y se les adicionó una solución de Tripsina 1X $\approx 37^{\circ}\text{C}$ para desprender las células del fondo del recipiente; se almacenaron los recipientes en la incubadora durante 5-7 minutos y transcurrido el tiempo se verificó bajo el microscopio invertido que las células ya no estuvieran adheridas. Se introdujeron los recipientes que contenían la solución celular dentro de la campana de flujo laminar, se les adicionó DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ en la misma cantidad adicionada de Tripsina 1X, se traspasaron las

células a tubos Falcon y se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 3000 RPM. Inmediatamente se decantó el medio cuidando que no se vertiera también el botón o parte de éste, se adicionó la cantidad necesaria de DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ al tubo Falcon que contiene el botón celular; la cantidad depende del recipiente en el cual se realizará la transferencia celular y en cuántos recipientes se repartirá el contenido celular. Se homogeneizó la solución con ayuda de una micropipeta evitando la formación de burbujas, se realizó el cultivo celular en los recipientes debidamente etiquetados y se almacenaron los cultivos celulares en la incubadora.

Conteo celular y sembrado en placas

Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia del $\approx 80\%$, se introdujeron los recipientes con el cultivo celular dentro de la campana de flujo laminar, se decantó el medio de cultivo, se lavaron las cajas Petri y/o botellas un par de veces con una solución de PBS $\approx 37^{\circ}\text{C}$ y se les adicionó una solución de Tripsina 1X $\approx 37^{\circ}\text{C}$ para desprender las células del fondo del recipiente; se almacenaron los recipientes en la incubadora durante 5-7 minutos y transcurrido el tiempo se verificó bajo el microscopio invertido que las células ya no estuvieran adheridas. Se introdujeron los recipientes que contenían la solución celular dentro de la campana de flujo laminar, se les adicionó DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ en la misma cantidad adicionada de Tripsina 1X, se traspasaron las células a tubos Falcon y se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 3000 RPM. Inmediatamente se decantó el medio cuidando que no se vertiera también el botón o parte de éste, se le adicionó 1 mL de DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ al tubo Falcon que contiene el botón celular y se homogeneizó la solución. Con ayuda de una micropipeta se tomaron 10 μL de la suspensión celular para verterlos en un tubo eppendorf, se mezclaron con

10 μ L de solución de azul tripano al 0,4% (en PBS) en proporción 1:1 y se homogeneizaron evitando la formación de burbujas; inmediatamente se colocaron en la cámara de conteo celular para calcular las células contenidas. Se realizaron los cálculos para dejar confluentes las placas de 96 pocillos, la cantidad depende de la parte experimental en la que se encuentre: 6,000 células/pocillo para evaluación en fibroblastos y 3,000 células/pocillo para evaluación en adipocitos, considerando placas por triplicado por ensayo. Se tomó el equivalente, se trasvasó en un tubo Falcon, se llevó a 10 mL/placa con DMEM \approx 37°C y se homogeneizó lentamente. Se vertió el contenido en una canaleta y con ayuda de una micropipeta multicanal se llenaron los pocillos de las placas con 100 μ L cada uno, se homogenizó en la canaleta constantemente para que el contenido celular fuera uniforme en cada pocillo de las placas. Se almacenaron las placas en la incubadora.

Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros

Al tercer día de haber sembrado 3,000 células/pocillo en placas de 96 pocillos se procedió a la diferenciación: se trataron las células con 100 μ L de medio de diferenciación \approx 37°C (medio de crecimiento suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 0.5 mM, dexametasona 1 μ M e insulina 1.7 μ M). Se mantuvo el medio de diferenciación durante 48 horas, se cambió cada tercer día la mitad del medio (50 μ L) hasta el final del experimento; se llevó un monitoreo del proceso de adipogénesis, una vez alcanzada la diferenciación se procedió a los ensayos de citotoxicidad.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad se determina mediante el ensayo colorimétrico del compuesto

bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), determina la cantidad de células viables en estudios de proliferación y citotoxicidad. Las coenzimas NADH y NADPH convertirán al MTT en su formazán; compuesto de color azul, cuya cantidad producida es directamente proporcional al número de células vivas presentes tras la exposición a MTT, la cantidad será determinada indirectamente al emplear un lector de placas (Thermoscientific-Multiskan Sky with Cuvette & Touch Screen) a 550 nm [técnica desarrollada por Mosmann en 1983 y modificada por Francois Denizot y Rita Lang en 1986]

Para el ensayo de citotoxicidad se emplearon los ácidos cafeico, clorogénico y ferúlico; se prepararon las soluciones a las siguientes concentraciones:

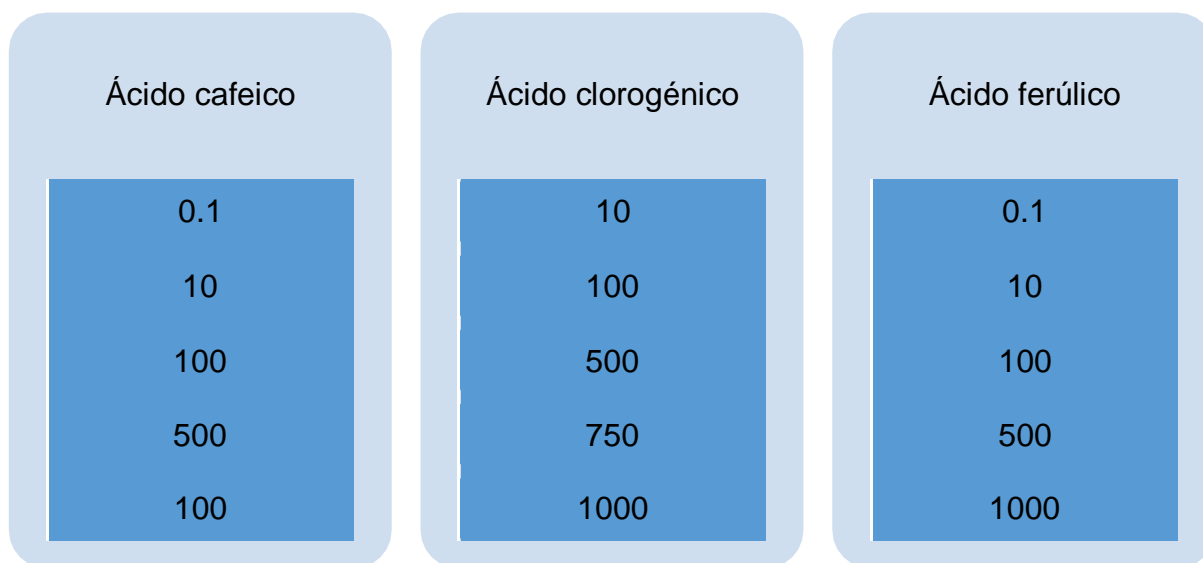


Figura 18. Concentraciones (μM) de las soluciones de los ácidos polifenólicos a evaluar en fibroblastos y adipocitos (Imagen del autor).

➤ En fibroblastos 3T3-L1

Se prepararon las soluciones de los compuestos disolviendo cada ácido polifenólico en DMEM $\approx 37^\circ\text{C}$ y se vertió cada solución en sus carriles correspondientes en cada canaleta; dos canales para cada concentración en orden creciente de

concentración, el medio DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ se colocó en los dos primeros carriles como control. Con ayuda de una micropipeta multicanal y una canaleta se retiró el medio contenido en las placas y se llenaron con $100\ \mu\text{L}$ /pocillo de las soluciones del compuesto correspondiente; se homogeneizaron en la canaleta constantemente antes de tomar las soluciones para verterlas. Se guardaron las placas en la incubadora.

Se retiró de la incubadora la placa correspondiente trascurridas 24, 48 y 72 horas, se observaron los pocillos bajo el microscopio invertido y se tomaron fotografías para capturar la morfología de las células de cada carril de manera aleatoria para que representara a cada una de las concentraciones contenidas.

Se introdujeron las placas dentro de la campana de flujo laminar para retirar las soluciones de los pocillos con ayuda de una micropipeta multicanal.

Se pesaron 5 mg de MTT en un tubo Falcon, se introdujeron dentro de la campana de flujo laminar y se disolvieron en 10 mL de PBS $\approx 37^{\circ}\text{C}$, cuidando que no quedara expuesto a la luz. Inmediatamente se vertió la solución en una canaleta y con ayuda de una micropipeta multicanal se colocaron $100\ \mu\text{L}$ en cada uno de los pocillos de la placa. Se tapó la placa y se envolvió con papel aluminio; se guardó en la incubadora. Pasadas 4 horas, se retiró lenta y cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos con ayuda de una micropipeta multicanal; cuidando de no pipetear los cristales de formazan. Se agregó $100\ \mu\text{L}$ /pocillo de DMSO y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro: se leyó el punto final de la placa completa a una longitud de onda de 550 nm, con agitación previa durante 10 segundos.

Se guardaron los valores obtenidos en una memoria para posteriormente realizar los cálculos y el análisis estadístico; se calculó el promedio y la desviación estándar y se

identificó el nivel de citotoxicidad con base en la ISO 10993 donde se clasifica la citotoxicidad respecto al porcentaje de viabilidad celular. Se calculó el valor de la concentración inhibitoria media (CI50) con los valores de absorbancia.

➤ En adipocitos 3T3-L1

Tras llevar un monitoreo del proceso de adipogénesis, una vez alcanzada la diferenciación se procedió a los ensayos de citotoxicidad.

Se prepararon las soluciones de los compuestos disolviendo cada ácido polifenólico en DMEM $\approx 37^{\circ}\text{C}$ y se vertió cada solución en sus carriles correspondientes en cada canaleta; dos canales para cada concentración en orden creciente de concentración, colocar en los primeros 2 carriles el medio como control. Con ayuda de una micropipeta multicanal y una canaleta, se procedió a llenar las placas que contenían las células con 100 μL /pocillo de las soluciones del compuesto, se homogeneizó en la canaleta constantemente antes de tomar las soluciones para verterlas. Se almacenaron las placas en la incubadora.

Se sacó de la incubadora las placas correspondientes trascurridas 48 horas, se observaron los pocillos bajo el microscopio invertido y se tomaron fotografías representativas para capturar la morfología de las células de cada carril para cada una de las concentraciones contenidas.

Se introdujeron las placas (rociadas con solución de etanol) dentro de la campana de flujo laminar para retirar las soluciones de los pocillos con ayuda de una micropipeta multicanal.

Se pesaron 5 mg de MTT en un tubo Falcon, se introdujeron (rociado con solución de etanol) dentro de la campana de flujo laminar y se disolvieron en 10 mL de PBS $\approx 37^{\circ}\text{C}$,

cuidando que no quedara expuesto a la luz. Inmediatamente se vertió la solución en una canaleta y con ayuda de una micropipeta multicanal se colocaron 100 μ L en cada uno de los pocillos de la placa. Se tapó la placa y se envolvió con papel aluminio; se guardó en la incubadora. Pasadas 4 horas, se retiró lenta y cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos con ayuda de una micropipeta multicanal evitando pipetear los cristales de formazan. Se agregaron 100 μ L/pocillo de DMSO y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro: se leyó el punto final de la placa completa a 550 nm, con agitación previa durante 10 segundos.

Se guardaron los valores obtenidos en una memoria para posteriormente realizar los cálculos y el análisis estadístico; se calculó el promedio y la desviación estándar y se identificó el nivel de citotoxicidad con base en la ISO 10993 donde se clasifica la citotoxicidad respecto al porcentaje de viabilidad celular. Se calculó el valor de la concentración inhibitoria media (CI50) con los valores de absorbancia.

Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado, los datos se analizaron como las medias \pm la desviación estándar (D.E.).

Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 8.0. Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las medias de los diferentes grupos de tratamiento fueron comparadas con la prueba de Tukey. Se estableció si hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, todos los datos se expresaron como: $P < 0.05$.

Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.0.

6. RESULTADOS

Estudio *in silico*

En la Figura 19 se muestran las estructuras químicas de los fármacos de referencia y de los compuestos polifenólicos bajo estudio. Dichas estructuras fueron dibujadas con el software ChemDraw Ultra 12.0.

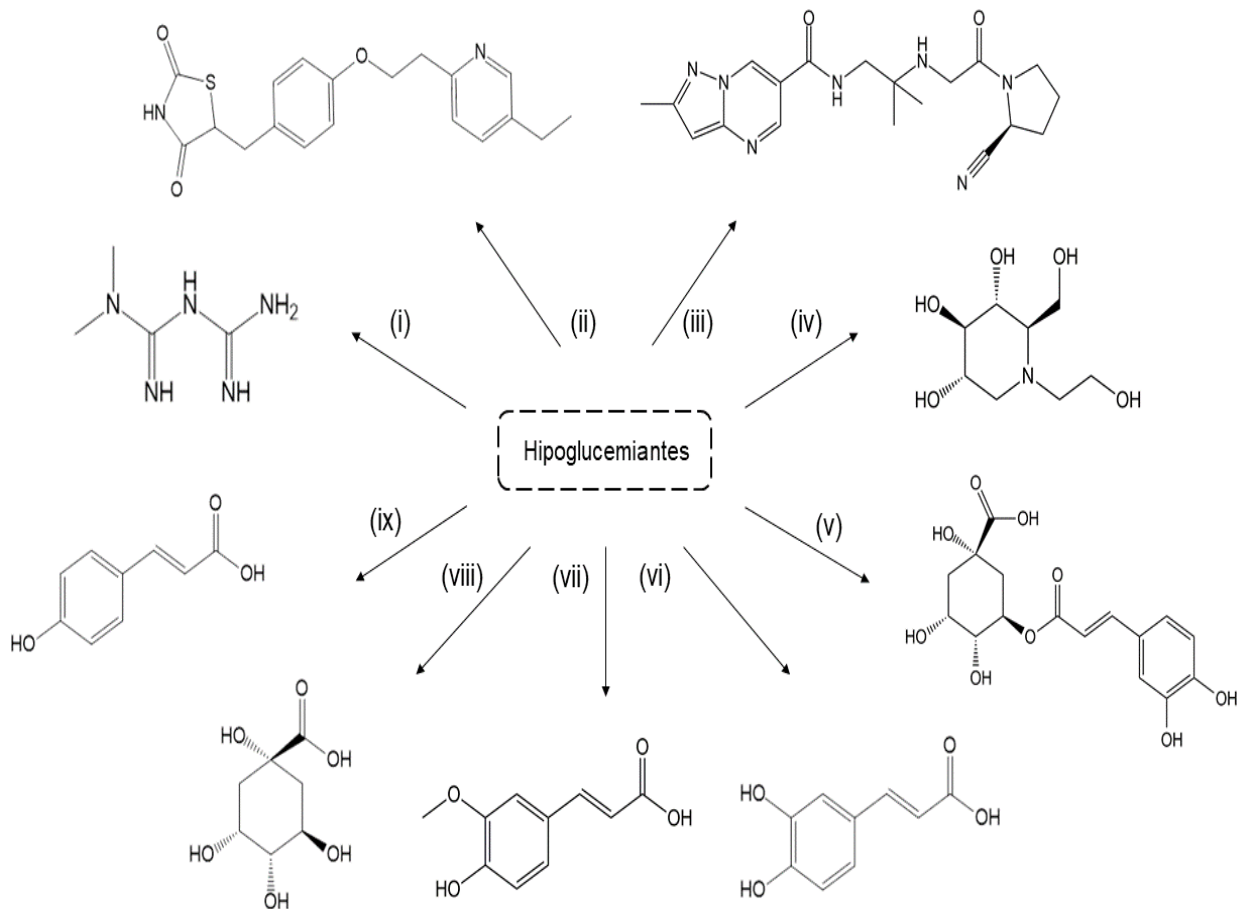


Figura 19. Estructuras químicas de fármacos hipoglucemiantes: i) Metformina (control de la producción de glucosa hepática, así mismo, aumenta la transducción de señales de la insulina) , ii) Pioglitazona (activador de receptores PPAR γ), iii) Anagliptina (inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4), iv) Miglitol (inhibidor de la α -

glucosidasa intestinal), y compuestos polifenólicos con potencial antidiabético, v) Ácido clorogénico, vi) Ácido cafeico, vii) Ácido ferúlico, viii) Ácido quínico, ix) Ácido p- cumárico.

A continuación, se muestran en la Tabla 2 los parámetros de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de los compuestos polifenólicos y fármacos antidiabéticos, los cuales fueron obtenidos con el software DataWarrior y la plataforma en línea molinspiration. Asimismo, en la Tabla 3 se muestran los parámetros de solubilidad, absorción, metabolismo, biodisponibilidad, así como, diversos criterios utilizados en el área de química para el diseño de nuevos fármacos, dichos resultados se obtuvieron en el servidor en línea SwissADME.

En la Tabla 4. se presentan los datos del docking molecular de fármacos hipoglucemiantes de referencia y de los compuestos polifenólicos propuestos que se obtuvieron con el programa autodock tools 4. 0. 1.

Resultados

Tabla 2. Propiedades moleculares y parámetros de toxicidad de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos calculados con las herramientas bioinformáticas molinspiration y DataWarrior

Compuesto	Smile	PM	LogP	AH	DH	AR	TPSA	M	C	E	I	DS
Metformina	<chem>CN(C)C(=N)NC(=N)N</chem>	129.17	-1.13	5	5	3	88.99	√	X	√	X	0.35
Pioglitazona	<chem>CCc3ccc(CCOc2ccc(Cc1sc(=O)nc1=O)cc2)nc3</chem>	356.45	3.07	5	1	7	68.30	X	X	X	X	0.76
Miglitol	<chem>OCCN1CC(O)[C@@H](O)C(O)[C@H]1CO</chem>	207.23	-2.79	6	5	3	104.38	X	X	X	X	0.98
Anagliptina	<chem>Cc3cc2ncc(C(=O)NCC(C)NCC(=O)N1CCC[C@H]1C#N)cn2n3</chem>	383.46	0.09	9	2	6	115.42	X	X	X	X	0.86
Ácido quínico	<chem>O=C(O)[C@@]1(O)C[C@@H](O)C(O)C(O)C1</chem>	192.17	-2.33	6	5	1	118.21	X	X	X	X	0.80
Ácido ferúlico	<chem>COc1cc(C=CC(=O)O)ccc1O</chem>	194.19	1.25	4	2	3	66.76	X	X	X	X	0.84
Ácido cafeico	<chem>O=C(O)C=Cc1ccc(O)c(O)c1</chem>	180.16	0.94	4	3	2	77.75	X	X	X	X	0.89
Ácido p-cumárico	<chem>O=C(O)C=Cc1ccc(O)cc1</chem>	164.16	1.43	3	2	2	57.53	X	X	X	X	0.79
Ácido clorogénico	<chem>O=C(C=Cc1ccc(O)c(O)c1)O[C@@H]2C[C@](O)(C(=O)O)CC(O)C2O</chem>	354.31	-0.45	9	6	5	164.74	X	X	X	X	0.70

PM: peso molecular, cLogP: coeficiente de partición agua-octanol, AH: heteroátomos aceptores de protones, DH: heteroátomos donadores de protones, AR: ángulos rotables, TPSA: área de superficie polar topológica, M: mutagenicidad, C: carcinogenicidad, E: efectos sobre la reproductividad, I: irritabilidad, DS: drug score, X: no presenta el efecto toxicológico, √: presenta el efecto toxicológico.

Tabla 3. Parámetros de solubilidad acuosa, farmacocinética y química medicinal de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos obtenidos con el servidor en línea SwissADME

Compuesto	Solubilidad acuosa			Farmacocinética								
	LogS	Solubilidad	Clase	GI	BHE	P-gp	Citocromo P450					Biodisponibilidad
							1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	
Metformina	0.22	2.17 mg/mL	V	Δ	X	X	X	X	X	X	X	0.55
Pioglitazona	-4.31	1.76 mg/mL	II	Δ	X	X	√	√	√	√	√	0.55
Miglitol	0.69	1.02 mg/mL	V	Δ	X	√	X	X	X	X	X	0.55
Anagliptina	-1.95	4.34 mg/mL	IV	Δ	X	√	X	X	X	X	X	0.55
Ácido quínico	0.53	6.48 mg/mL	V	Δ	X	X	X	X	X	X	X	0.56
Ácido ferúlico	-2.11	1.49 mg/mL	III	Δ	√	X	X	X	X	X	X	0.56
Ácido cafeico	-1.89	2.32 mg/mL	IV	Δ	X	X	X	X	X	X	X	0.56
Ácido p-cumárico	-2.02	1.58 mg/mL	III	Δ	√	X	X	X	X	X	X	0.56
Ácido clorogénico	-1.62	8.50 mg/mL	IV	Δ	X	X	X	X	X	X	X	0.11

LogS: logaritmo de la solubilidad acuosa, Clase: V (altamente soluble), IV (muy soluble) III (soluble), II (moderadamente soluble) I (poco soluble), GI: absorción gastrointestinal (Δ: alta, Δ: baja), BHE: permeabilidad de barrera hematoencefálica, P-gp: sustrato de glucoproteína P, CYP450: inhibidor de citocromo (√: presenta actividad, X: no presenta actividad).

Continuación tabla 3.

Compuesto	Similitud de fármacos					Química medicinal		
	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	PAINS	Brenk	Accesibilidad de síntesis
Metformina	✓	PM≤160, LogP≤-0.4	✓	✓	PM≤200, #C≤5	-	iminas	3.11
Pioglitazona	✓	✓	✓	✓	✓	-	tioéster	3.46
Miglitol	✓	LogP≤-0.4	✓	✓	LogP≤-2	-	-	3.17
Anagliptina	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	3.46
Ácido quínico	✓	LogP≤-0.4	✓	✓	PM≤200, LogP≤-2	-	-	3.34
Ácido ferúlico	✓	✓	✓	✓	PM≤200	-	acceptor de Michael	1.93
Ácido cafeico	✓	✓	✓	✓	PM≤200	catecol	catecol, acceptor de Michael	1.81
Ácido p-cumárico	✓	✓	✓	✓	PM≤200	-	acceptor de Michael	1.61
Ácido clorogénico	DH≥5	LogP≤-0.4	TPSA≥140	TPSA≥136.1	TPSA≥150, DH≥5	catecol	catecol, acceptor de Michael	4.16

Reglas de Lipinski o 5's (Pfizer), Filtro Ghose, Filtro Veber, Filtro Egan (Pharmacia), Filtro Muegge (Bayer): ✓ (se cumplen los parámetros), X: en rojo se describen los parámetros que se violan, PAINS: estructuras de interferencia en ensayos de panel (estructuras que pueden presentar un falso positivo en la actividad), Brenk: alerta estructural, accesibilidad de síntesis: 1 fácil-10 difícil.

Tabla 4. Docking molecular de fármacos hipoglucemiantes y compuestos polifenólicos con el programa autodock tools 4. 0. 1

Compuestos	ΔG (kcal/mol)	K_i	Aminoácidos	Interacción	Target farmacológico
Metformina	- 4.3	709.01	GLU295, ILE 326	Electrostática	PPAR γ
	- 4.94	238.15	PRO104, THR106, VAL113	Electrostática	AMPK
Pioglitazona	- 9.22	175.66	CYS285, SER289, PA:1B1478, HOH2025	Electrostática, agua	PPAR γ
Ácido clorogénico	- 8.4	693.33	ALA292, GLU295, ARG288, CYS285, LEU340, PA1B1478, HOH2025, HOH2014, HOH2094, HOH2052	Electrostática, agua	
Ácido cafeico	- 5.95	43.51	ARG288, GLU295	Electrostática	
Ácido quínico	- 5.41	108.85	ARG288, GLU295	Electrostática	
Ácido ferúlico	- 6.32	23.11	LYS367, TYR473	Electrostática	
Ácido p-cúmarico	- 5.82	53.86	ARG288, GLU295	Electrostática	
Anagliptina	- 10.5	20.08	TYR238, GLN123, ASP192, TYR195, ASN170, TRP124	Electrostática	DPP4
Ácido clorogénico	- 6.96	7.86	GLU206, ARG669, SER209, ARG358, ASN710, TYR662	Electrostática	
Ácido cafeico	- 4.71	350.12	ARG125, ASP709	Electrostática	
Ácido quínico	- 4.38	619.31	SER630, TYR631, TYR666, TYR547, TYR662, ASN710	Electrostática	
Ácido ferúlico	- 4.68	370.63	ARG382, ARG358	Electrostática	
Ácido p-cúmarico	- 4.61	415.60	ARG125, ASP709	Electrostática	
Miglitol	- 6.88	9.10	ASP404, ASP518, HIS674, MET519, TRP481, ASP616, ARG600	Electrostática	α -Glucosidasa
Ácido clorogénico	- 7.84	1.79	MET363, LEU868, HIS584, ARG594, GLU866, SER864, GLU869, VAL867, LEU865	Electrostática	

Ácido cafeico	- 6.50	17.32	LYS418, PHE416, GLN509, GLU505	Electrostática
Ácido quínico	- 5.19	157.86	ARG411, LEU405, TRP376, MET408, ASN417, ASP406	Electrostática
Ácido ferúlico	- 6.39	20.59	LYS418, GLN509, PHE416, GLU505	Electrostática
Ácido p-cúmarico	- 6.31	23.57	GLN509, PHE416, GLU505	Electrostática

ΔG = energía libre de Gibbs, K_i = constante de inhibición, PPAR γ = receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma, AMPK= proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMP), DDP4= dipeptidil peptidasa 4, GLU= ácido glutámico , ILE= isoleucina, PRO= prolina, THR= treonina, VAL= valina, CYS= cisteína, SER= serina, ALA=, ARG= arginina, LEU= leucina, LYS= lisina, TYR= tirosina, GLN= glutamina, ASP= ácido aspártico, ASN= asparagina, TRP= triptófano, HIS=histidina, MET= metionina, PHE=fenilalanina

Evaluación *in vitro*

La evaluación *in vitro* consistió en determinar el efecto tóxico de los compuestos ácido cafeico, clorogénico y ferúlico en la línea celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™); tanto en fibroblastos como en adipocitos maduros, mediante ensayos de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT (sal de tetrazolio, soluble en agua) que analiza principalmente el metabolismo oxidativo; consiste en determinar la cantidad de células vivas, siendo proporcional a la cantidad de formazán producido. El formazan, compuesto de la familia formazanos, es insoluble en agua por lo que debe disolverse en DMSO; disolvente orgánico. [Biomodel, 2021].

Según los resultados estadísticos obtenidos:

En fibroblastos (Figuras 25, 29 y 33) se observa que ante la exposición a los ácidos cafeico y clorogénico el número de células vivas presentes en el cultivo sufrieron una caída moderada concentración-dependiente, alcanzando en la concentración de 500 μ M valores \approx 60% respecto al control, en la tendencia que se obtuvo al evaluar al ácido ferúlico se visualizó un efecto contrario, incrementó el porcentaje de viabilidad celular. Este efecto se determinó en lapsos de 24, 48 y 72 h posteriores al tratamiento, y se observó que el número de células vivas presentes en el cultivo sufrieron una disminución moderada tiempo-dependiente en el caso de exposición a los ácidos cafeico y clorogénico, mientras que para el ácido ferúlico incrementó el número de células vivas presentes en el cultivo de manera tiempo-dependiente.

Respecto a la evaluación en adipocitos (Figura 37), se observó que los tres ácidos incrementaron el porcentaje de viabilidad celular en diferente proporción, este efecto se determinó a las 48 horas posteriores al tratamiento.

Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

En la Figura 20 podemos observar una fotografía representativa de los fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) obtenidos tras la descongelación rápida, cultivo y propagación. Éstas células presentan una morfología fusiforme o estrellada con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser relativamente cortas y anchas, o bien largas, delgadas y muy ramificadas, en este último caso, los fibroblastos pueden estar en contacto unos con otros por uniones tipo nexos o por contactos físicos simples.

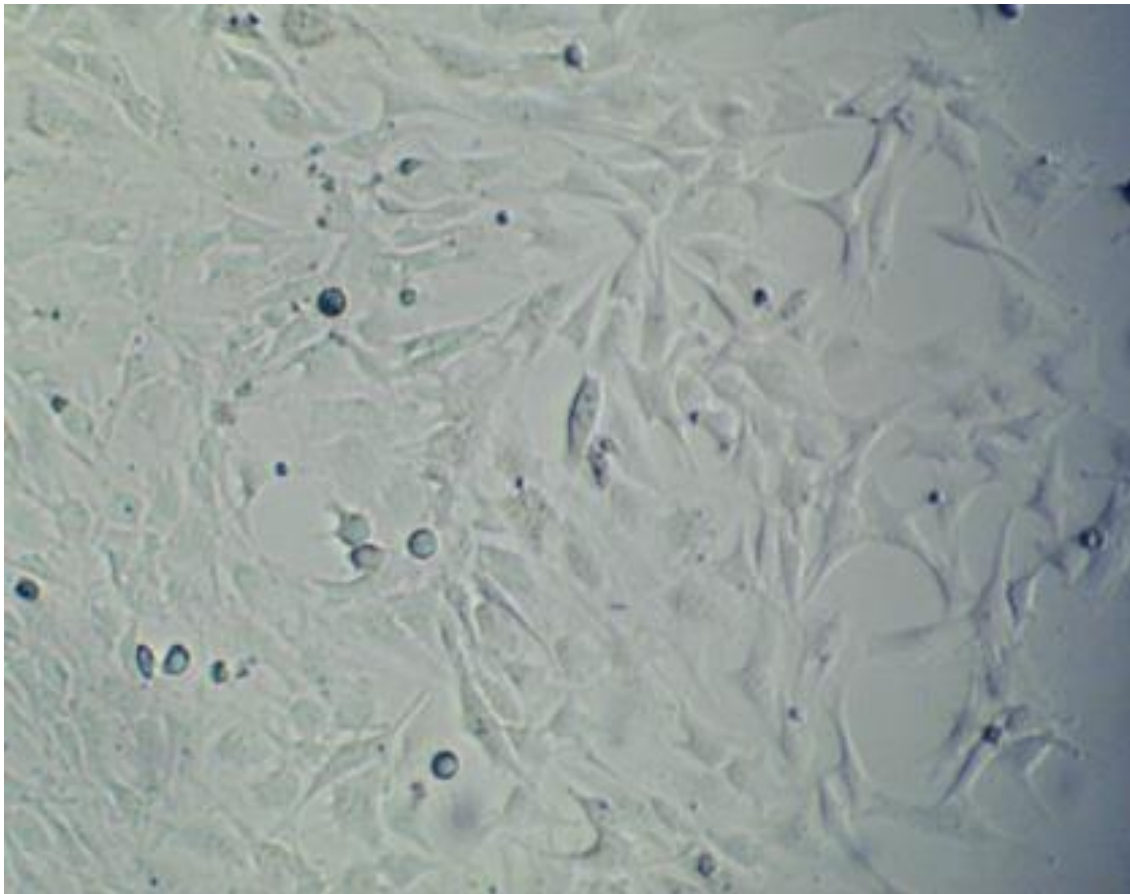


Figura 20. Morfología de fibroblastos obtenidos (Imagen tomada en un microscopio invertido, ampliación 10X)

La observación microscópica de células vivas se llevó a cabo durante un breve periodo, aunque mediante observación directa al recipiente de cultivo bajo un microscopio óptico binocular invertido (MOTIC AE-20).

Medición de viabilidad celular

Para la evaluación *in vitro* de este proyecto se empleó la línea celular 3T3-L1, se evaluó el efecto de los compuestos polifenólicos sobre la viabilidad celular empleando el método de MTT, que consiste en determinar el número de células vivas tras haber administrado los compuestos en diferentes concentraciones, puesto que solo éstas pueden reducir el MTT a sales de formazán mediante enzimas deshidrogenasas.

Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros

En la Figura 21 se pueden observar las fotografías representativas del proceso de diferenciación de fibroblastos a adipocitos maduros. Una vez que las células han alcanzado la confluencia, el tratamiento con los inductores adecuados de la diferenciación conduce a un cambio drástico en la forma de las células, en los preadipocitos 3T3-L1, la diferenciación se ve acelerada tras el tratamiento durante 48 horas con dexametasona, un corticoide; isobutilmetilxantina (IBMX), un estimulante del AMP-cíclico; y altas concentraciones de insulina, en presencia de suero fetal bovino. Los preadipocitos se convierten en células de forma esférica que empiezan a acumular lípidos, y que van adquiriendo progresivamente las características morfológicas y bioquímicas propias de los adipocitos maduros. Se dejaron transcurrir 3,5,7 y 9 días.

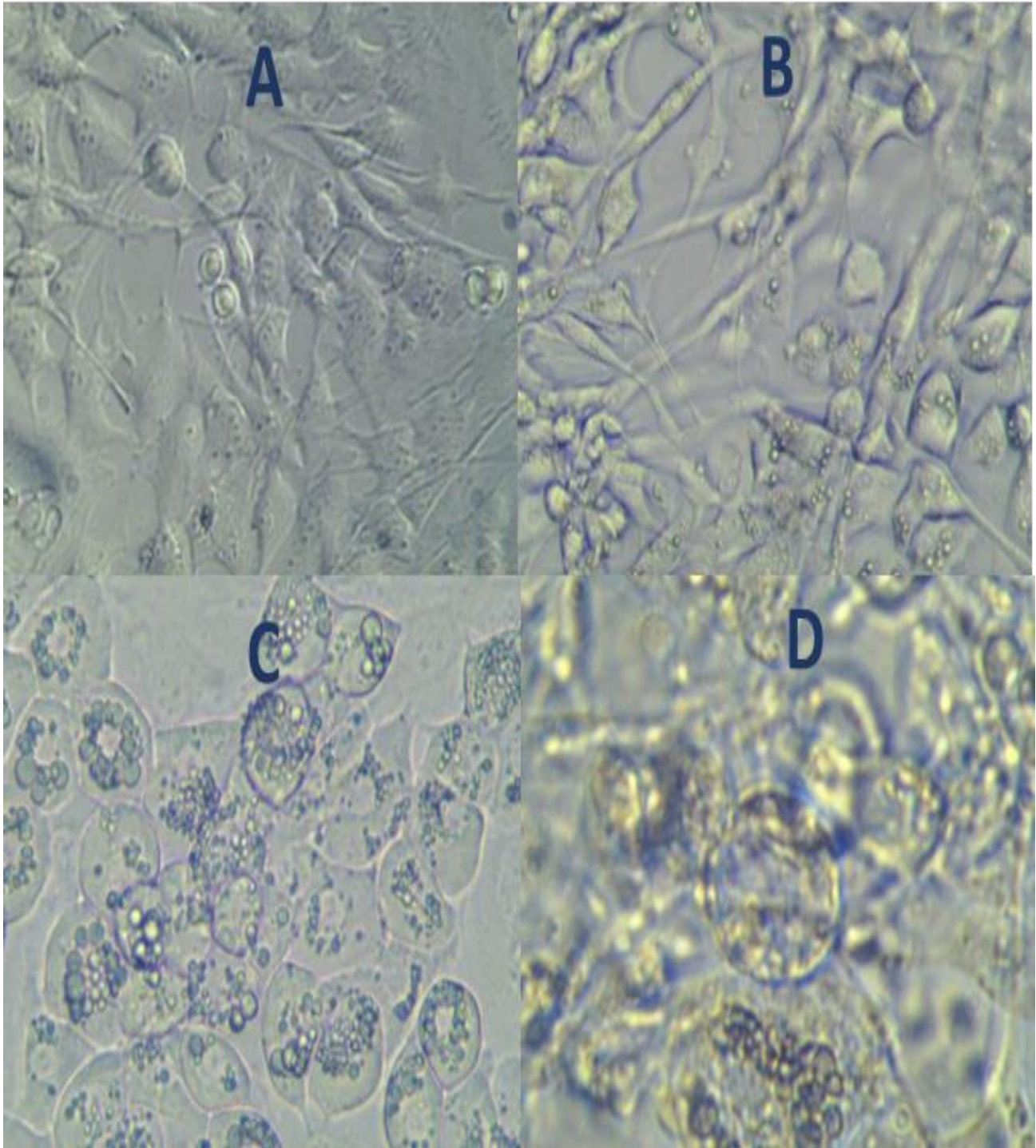


Figura 21. Proceso de diferenciación de los fibroblastos a adipocitos maduros a los días (A) 3, (B) 5, (C) 7 y (D) 9. (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X)

Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de citotoxicidad en la línea celular 3T3-L1 se llevó a cabo exponiendo las células a concentraciones crecientes durante distintos periodos: los ácidos cafeico y ferúlico en el rango de 0.1-1000 μM y el ácido clorogénico en el rango de 10-1000 μM ; fibroblastos a 24, 48 y 72 h y adipocitos a 48 h. El efecto citotóxico generado ante la exposición a los compuestos ácido cafeico, clorogénico y ferúlico puede ser visualizado con la morfología celular resultante presentado en las figuras 22-24, 26-28, 30-32 (fibroblastos 3T3-L1) y 34-36 (adipocitos 3T3-L1). El cálculo de porcentaje de viabilidad celular se encuentra en las Figuras 25, 29, 33 y 37, respectivamente.

En fibroblastos

❖ Ácido cafeico

En las Figuras 22, 23 y 24 se pueden observar las fotografías representativas en las que se presenta el efecto del compuesto ácido cafeico a las diferentes concentraciones evaluadas (0.1, 10, 100, 500 y 10000 μM) sobre la morfología de las células 3T3-L1. A las 24 h se puede observar que a partir de la concentración de 10 μM hay muerte celular evidente. Transcurridas las 48 h se puede observar que la proporción de células muertas incrementó pero no de manera considerable, comienza a ser notorio a partir de la concentración 100 μM , finalmente a las 72 h el comportamiento continuó con la tendencia de disminución del porcentaje de viabilidad celular.

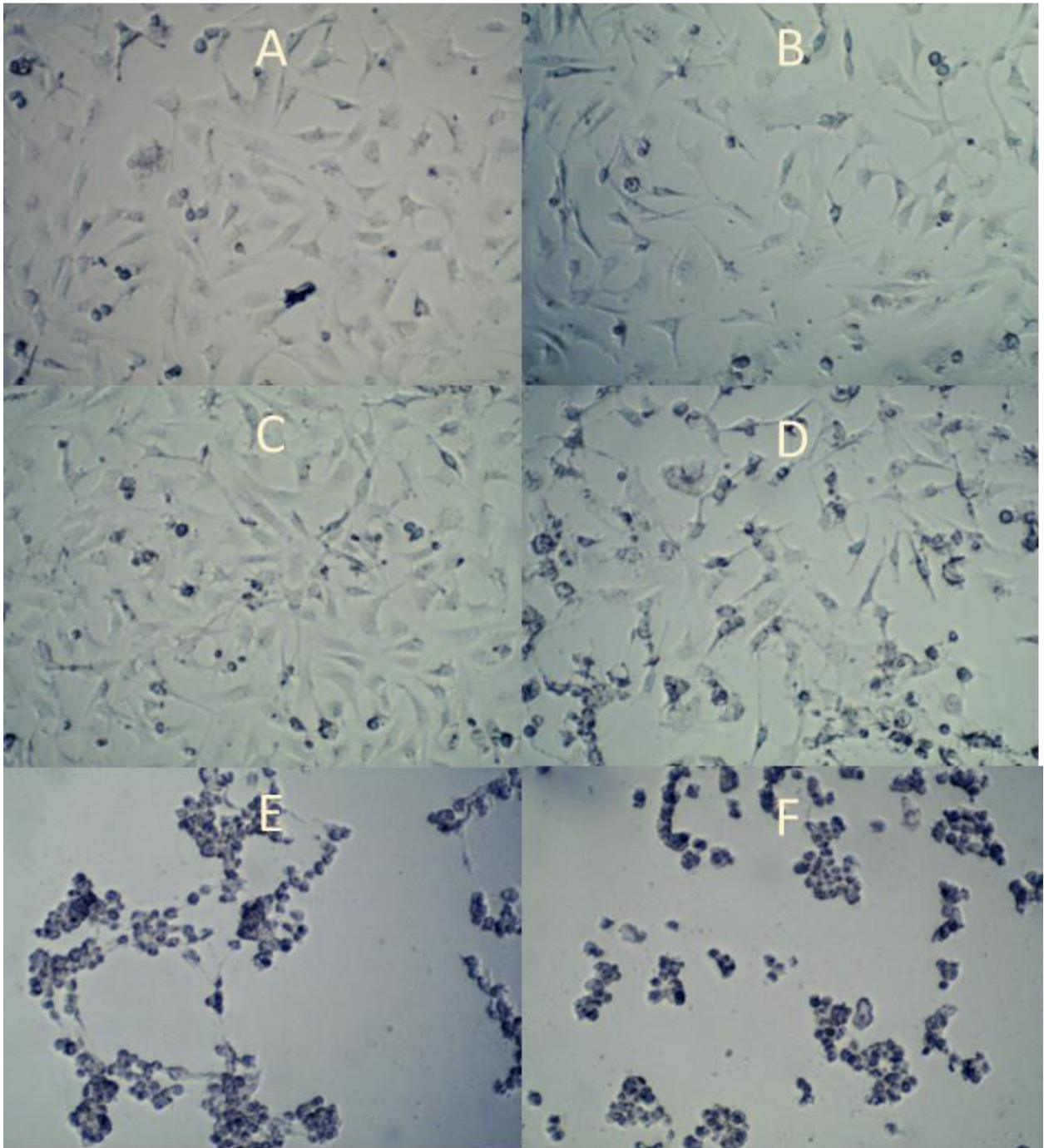


Figura 22. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E), 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

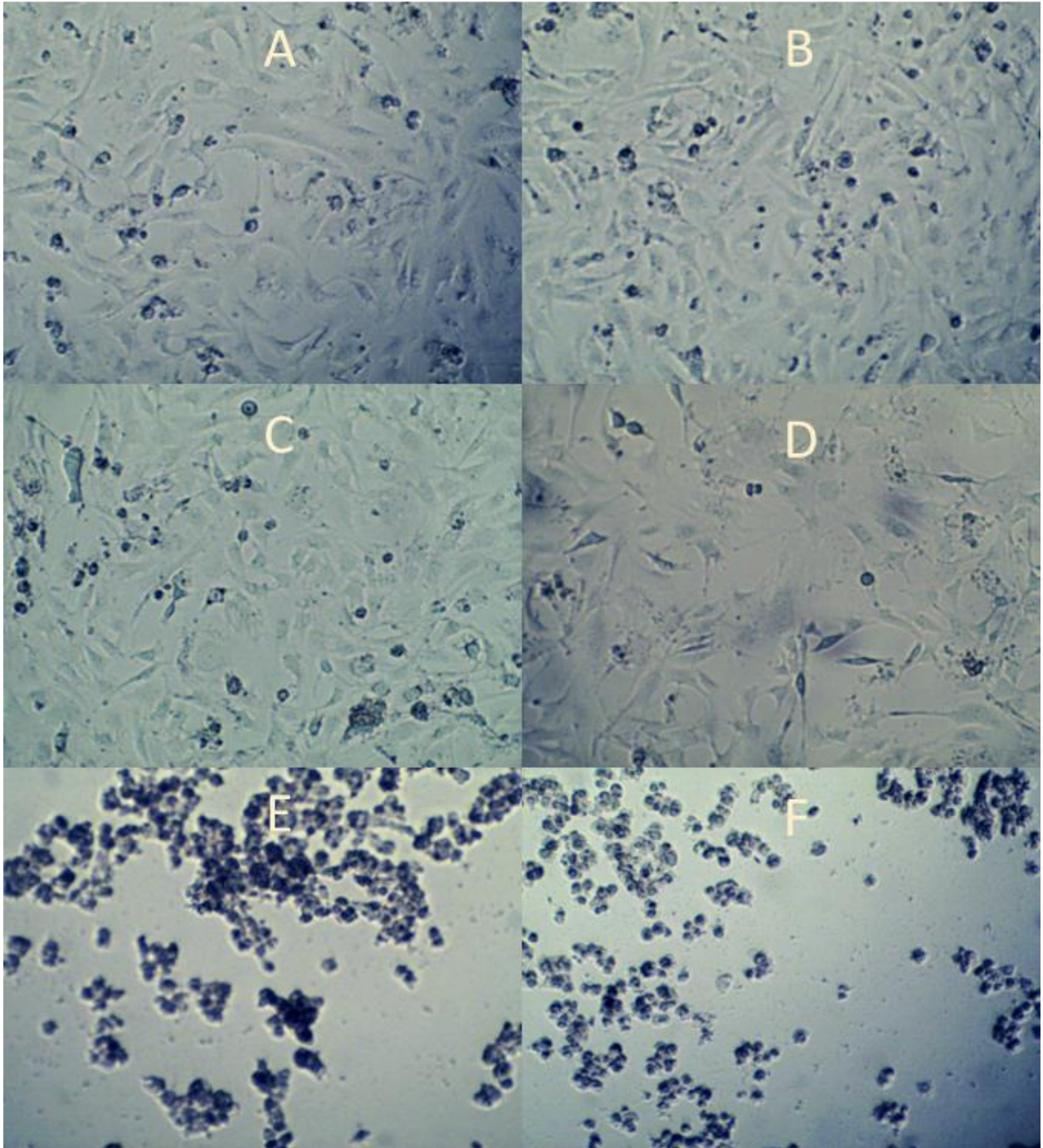


Figura 23. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E), 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

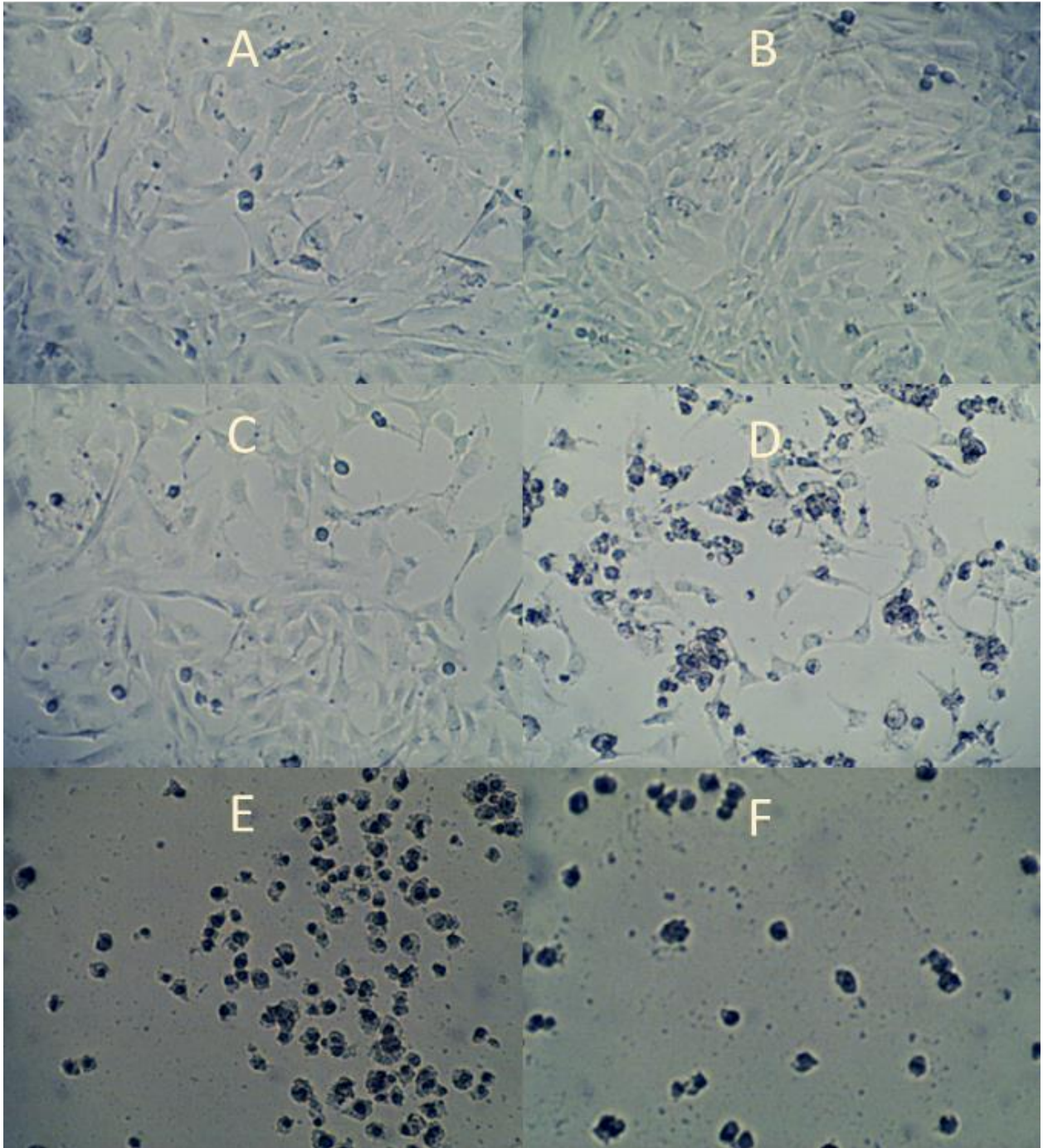


Figura 24. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E), 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

Efecto del ácido cafeico en fibroblastos 3T3-L1

Según los resultados obtenidos mediante el ensayo colorimétrico se observa que el ácido cafeico en un lapso de 24, 48 y 72 h disminuye la viabilidad celular (Figuras 25-27) y es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

En la Figura 25 (A) se calcula que el IC50 se alcanza en la concentración de 500 μM , mientras que en (B) y (C) se observa que a la concentración 500 μM ya se disminuyó considerablemente el % de viabilidad celular a un valor inferior al 50%.

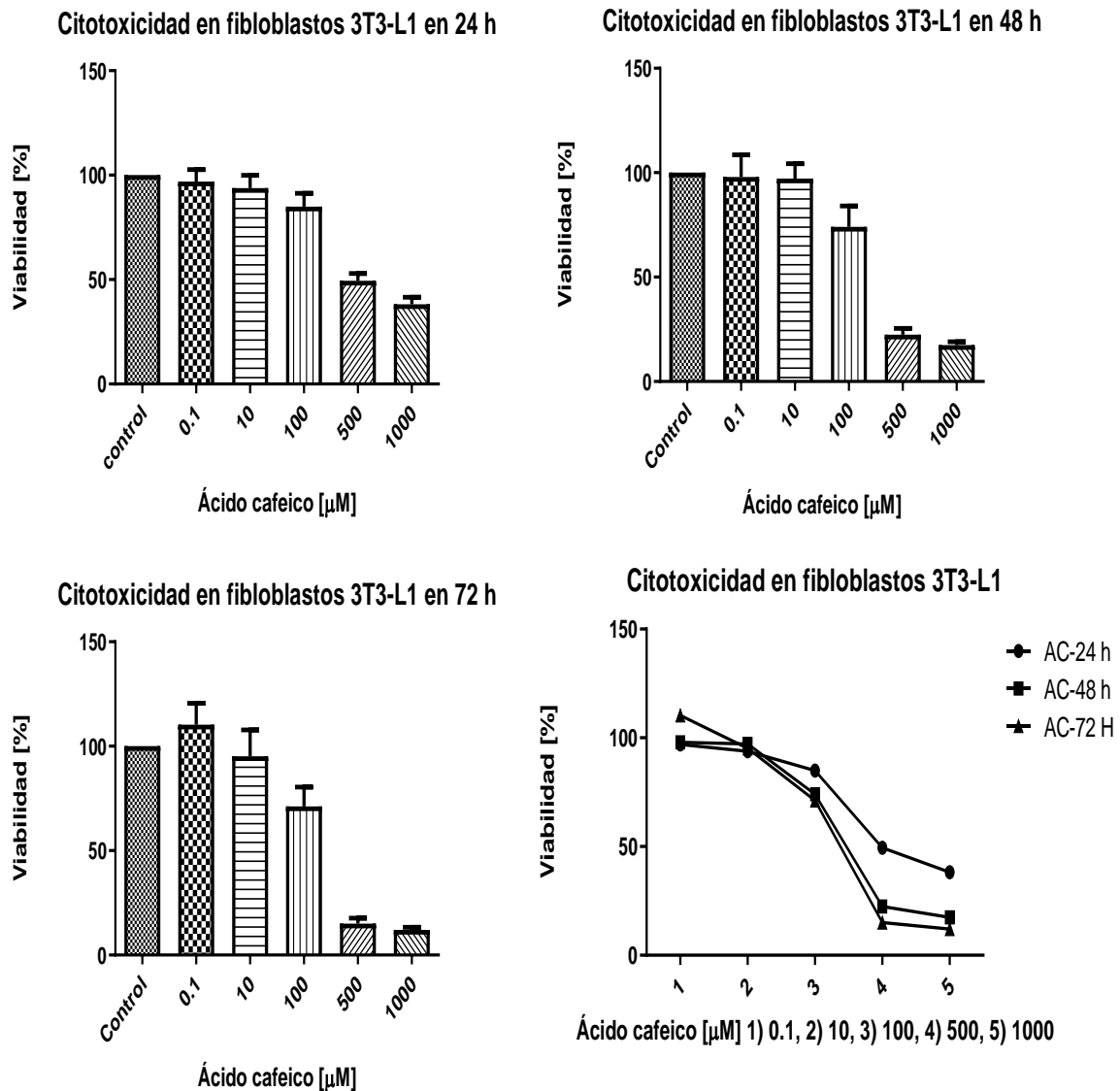


Figura 25. Porcentaje de viabilidad en fibroblastos 3T3-L1 ante la exposición a

concentraciones crecientes del ácido cafeico durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C) y los tres lapsos de tiempo (D). Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos; $n=16$ y $N=48$. ****Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.0001$). (Imagen del autor realizada con el programa GraphPad Prism 8.0)

❖ Ácido clorogénico

En las figuras 26-28 se pueden observar las fotografías representativas en las que se presenta el efecto del compuesto ácido clorogénico a las diferentes concentraciones evaluadas (10, 100, 500, 750 y 10000 μM) sobre la morfología de las células 3T3-L1. A las 24 h se puede observar que a partir de la concentración de 500 μM hay muerte celular evidente. Transcurridas las 48 h se puede observar que la proporción de células muertas incrementó de manera casi imperceptible, finalmente a paso de 72 h el comportamiento continuó con la tendencia de disminución del porcentaje de viabilidad, aunque no es tan evidente el cambio.

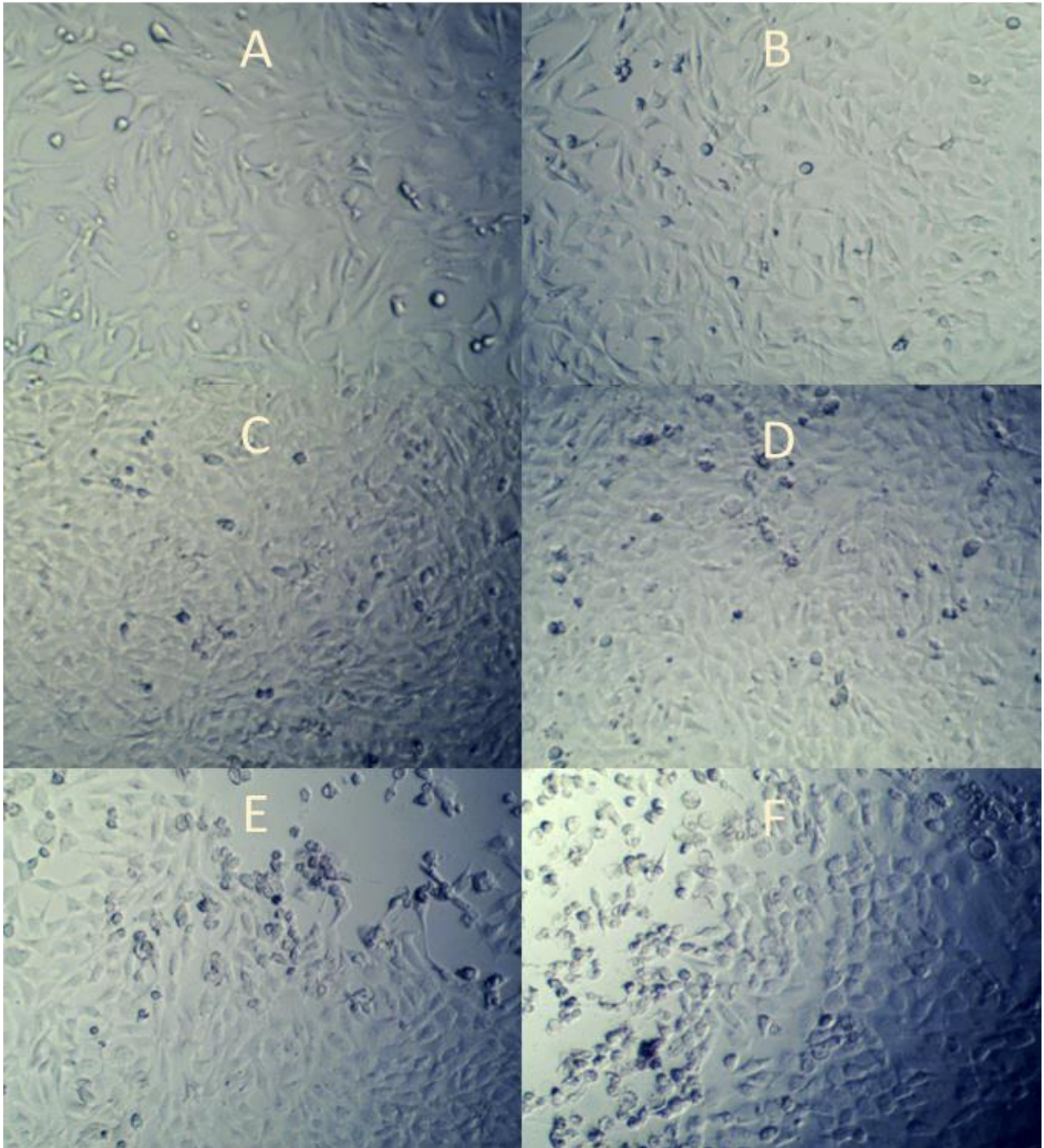


Figura 26. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico. Control (A), 100 μM (B), 250 μM (C), 500 μM (D), 750 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

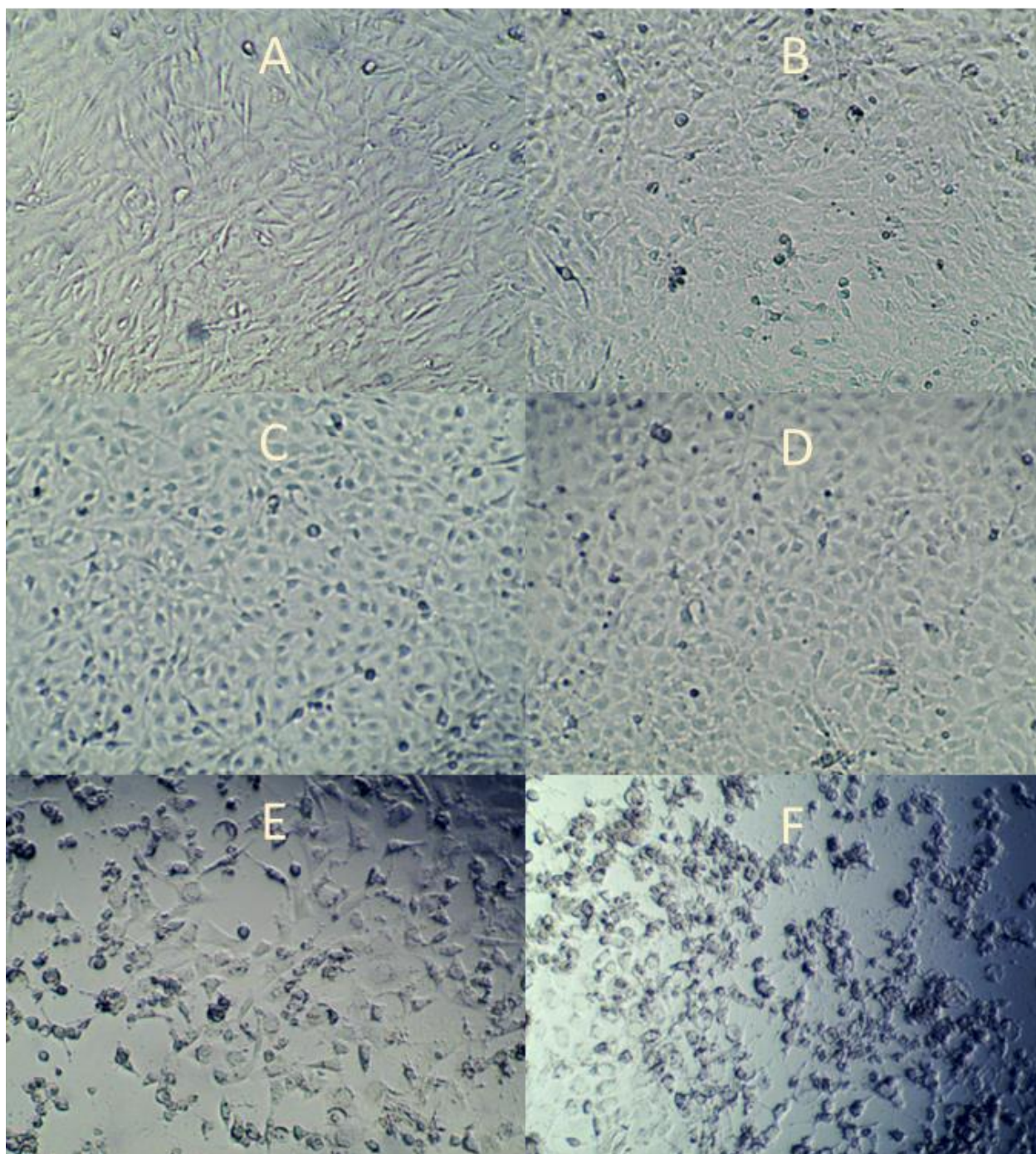


Figura 27. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico. Control (A), 100 μM (B), 250 μM (C), 500 μM (D), 750 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

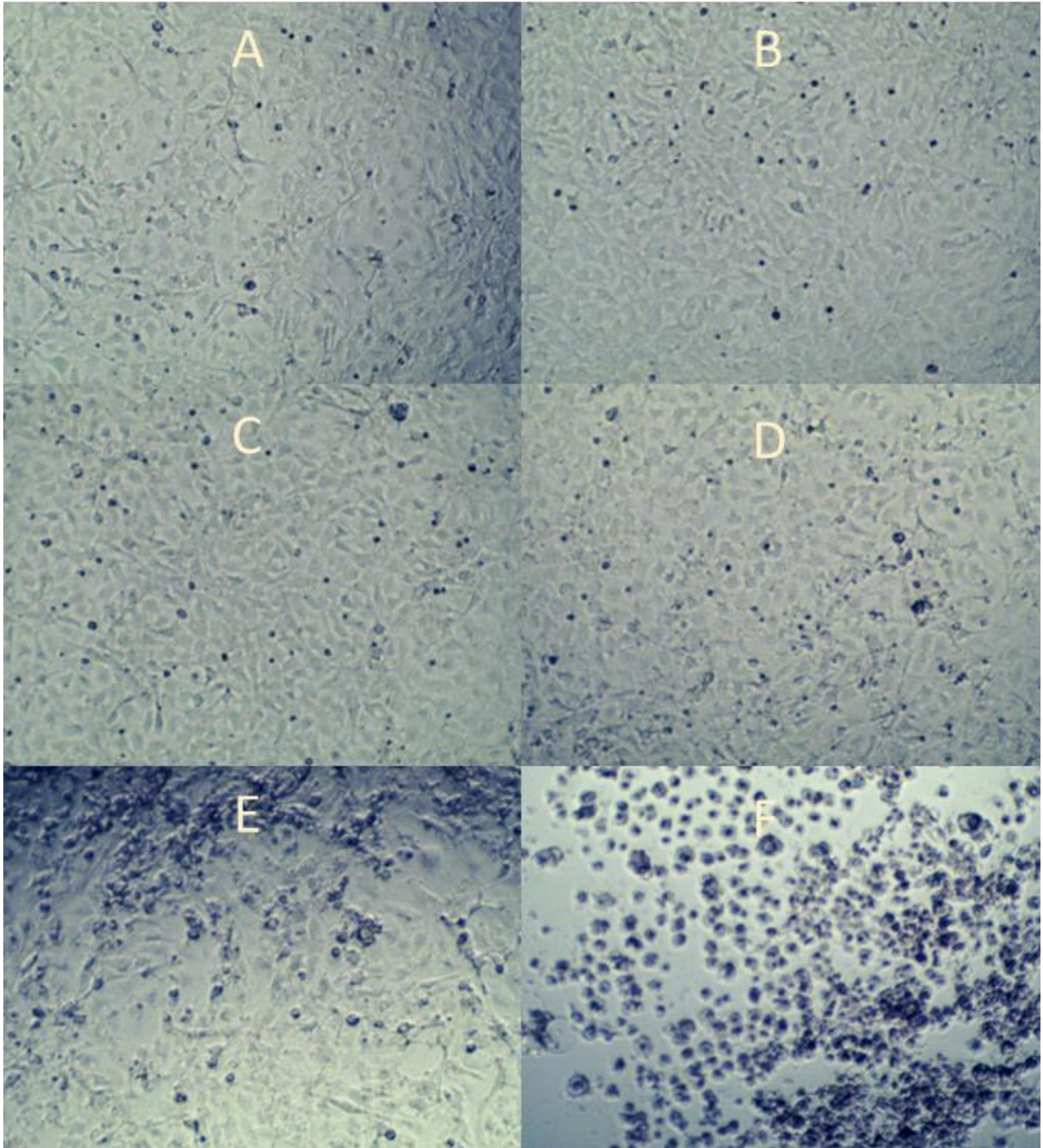


Figura 28. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico. Control (A), 100 μM (B), 250 μM (C), 500 μM (D), 750 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

Efecto del ácido clorogénico en fibroblastos 3T3-L1

Según los resultados obtenidos mediante el ensayo colorimétrico se observa que el ácido clorogénico en un lapso de 24, 48 y 72 h disminuye la viabilidad celular (Figura 29) y es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

En la Figura 29 (A) se calcula que el IC50 no se alcanza ni en la concentración más alta (1000 μM), mientras que en la Figura 29 (B) y Figura 29 (C) se observa que a la concentración 500 μM ya se alcanzó.

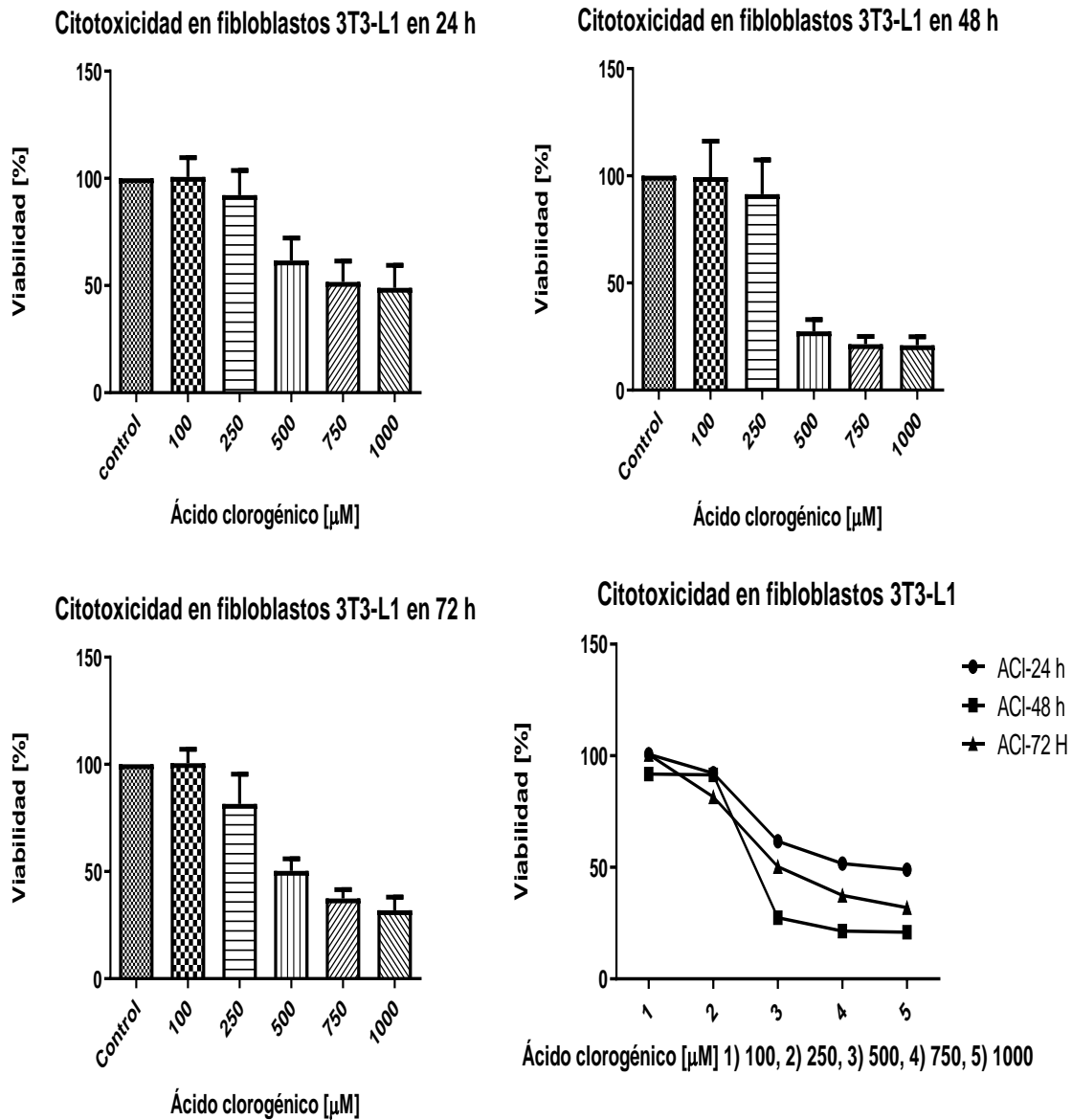


Figura 29. Porcentaje de viabilidad de fibroblastos 3T3-L1 ante la exposición a concentraciones crecientes del ácido clorogénico durante 24 horas (A), 48 horas (B) y 72 horas (C) y los tres lapsos de tiempo (D). Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos; $n=16$ y $N=48$. ****Diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.0001$). (Imagen del autor realizada con el programa GraphPad Prism 8.0)

❖ **Ácido ferúlico:**

En las Figuras 30-32 se pueden observar las fotografías en las que se presenta el efecto del compuesto ácido ferúlico a las diferentes concentraciones evaluadas (0.1, 10, 100, 500 y 10000 μM) sobre la morfología de las células 3T3-L1. A las 24 h se puede observar que la muerte celular comienza a ser evidente a partir de la concentración de 500 μM . Transcurridas las 48 h se puede observar que a partir de la concentración de 100 μM la muerte celular comienza a ser más marcada. Finalmente, a las 72 h se observa un incremento en la confluencia y, a su vez, un incremento de muerte celular.

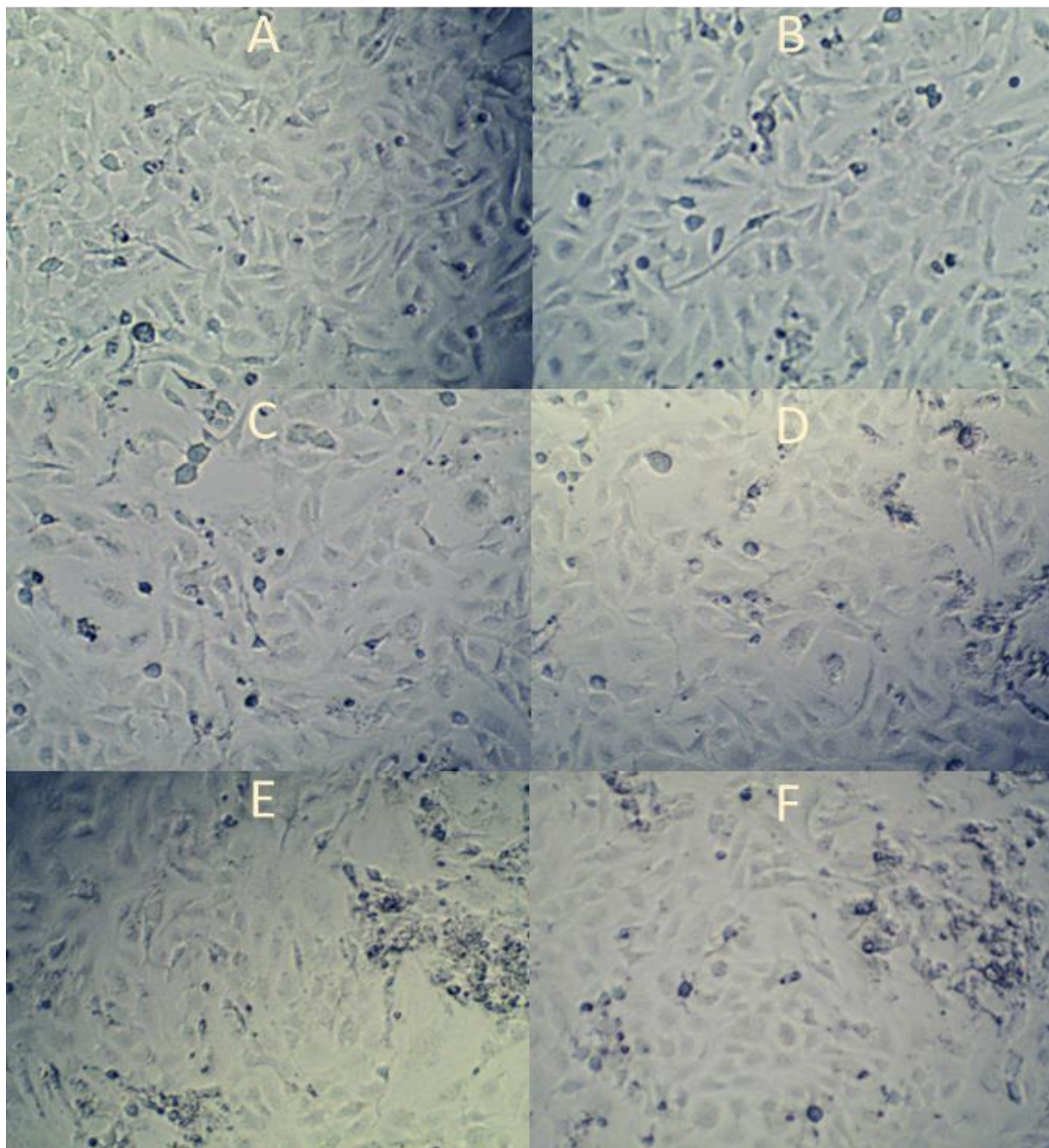


Figura 30. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 24 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

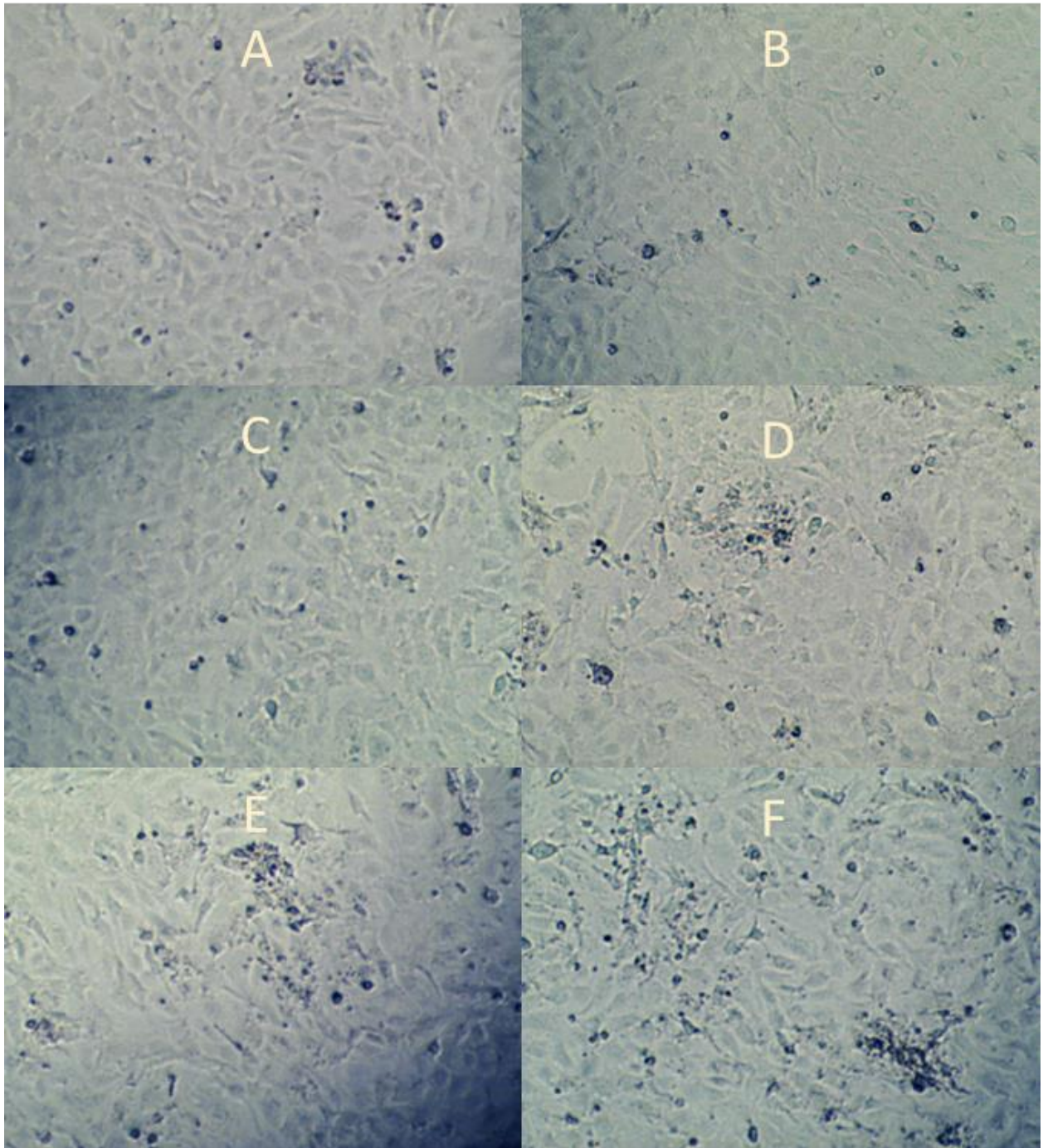


Figura 31. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X).

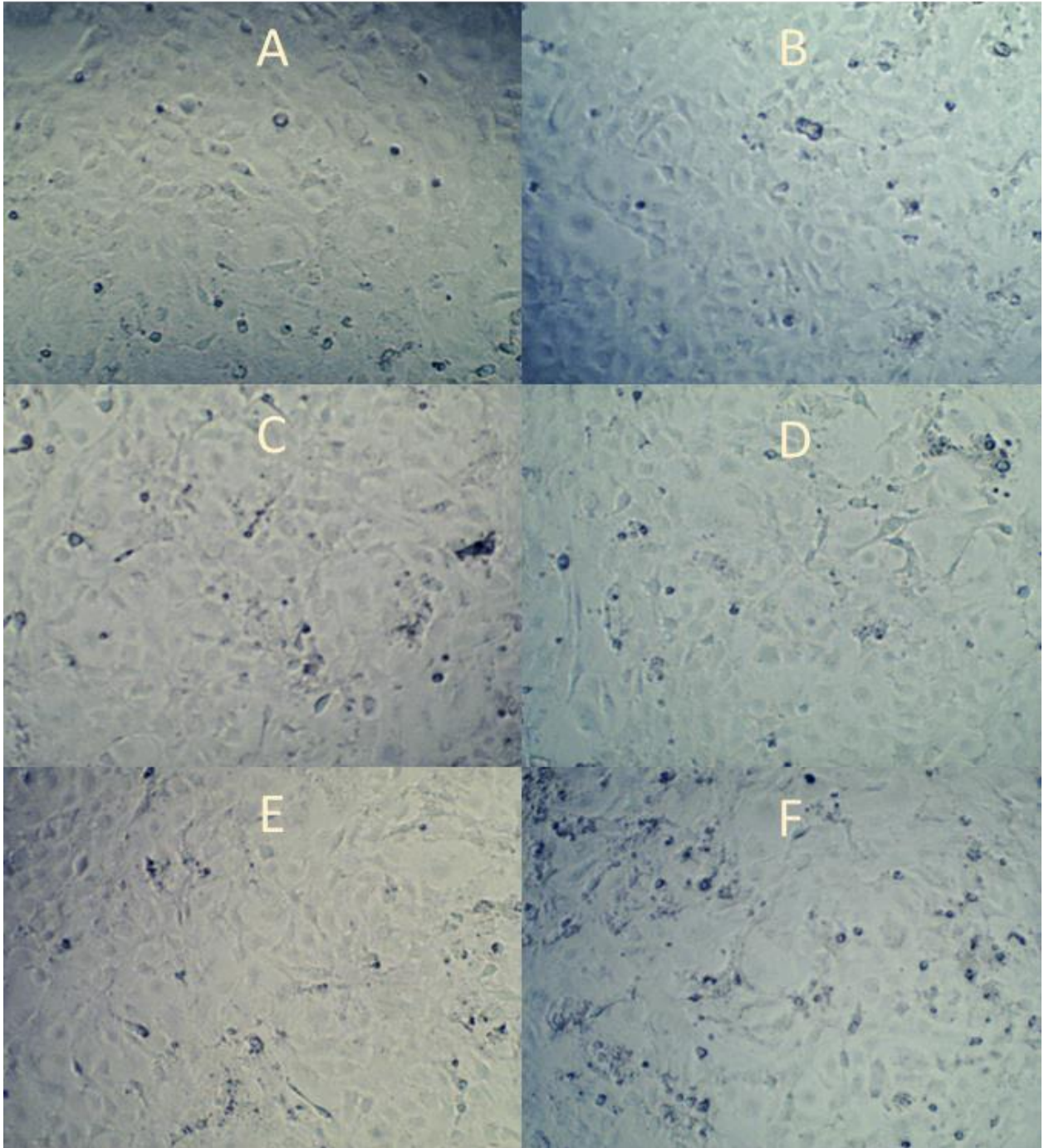


Figura 32. Morfología de fibroblastos 3T3-L1 72 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico. Control (A), 0.1 μ M (B), 10 μ M (C), 100 μ M (D), 500 μ M (E) y 1000 μ M (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 10X)

Efecto del ácido ferúlico en fibroblastos 3T3-L1

Según los resultados obtenidos mediante el ensayo colorimétrico se observa que el ácido ferúlico en un lapso de 48 h disminuye la viabilidad celular (Figura 33) y es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

En la Figura 33 (A), (B) y (C) no es posible calcular el IC50 debido a que en vez de presentar muerte celular se determina el incremento en el porcentaje de viabilidad celular.

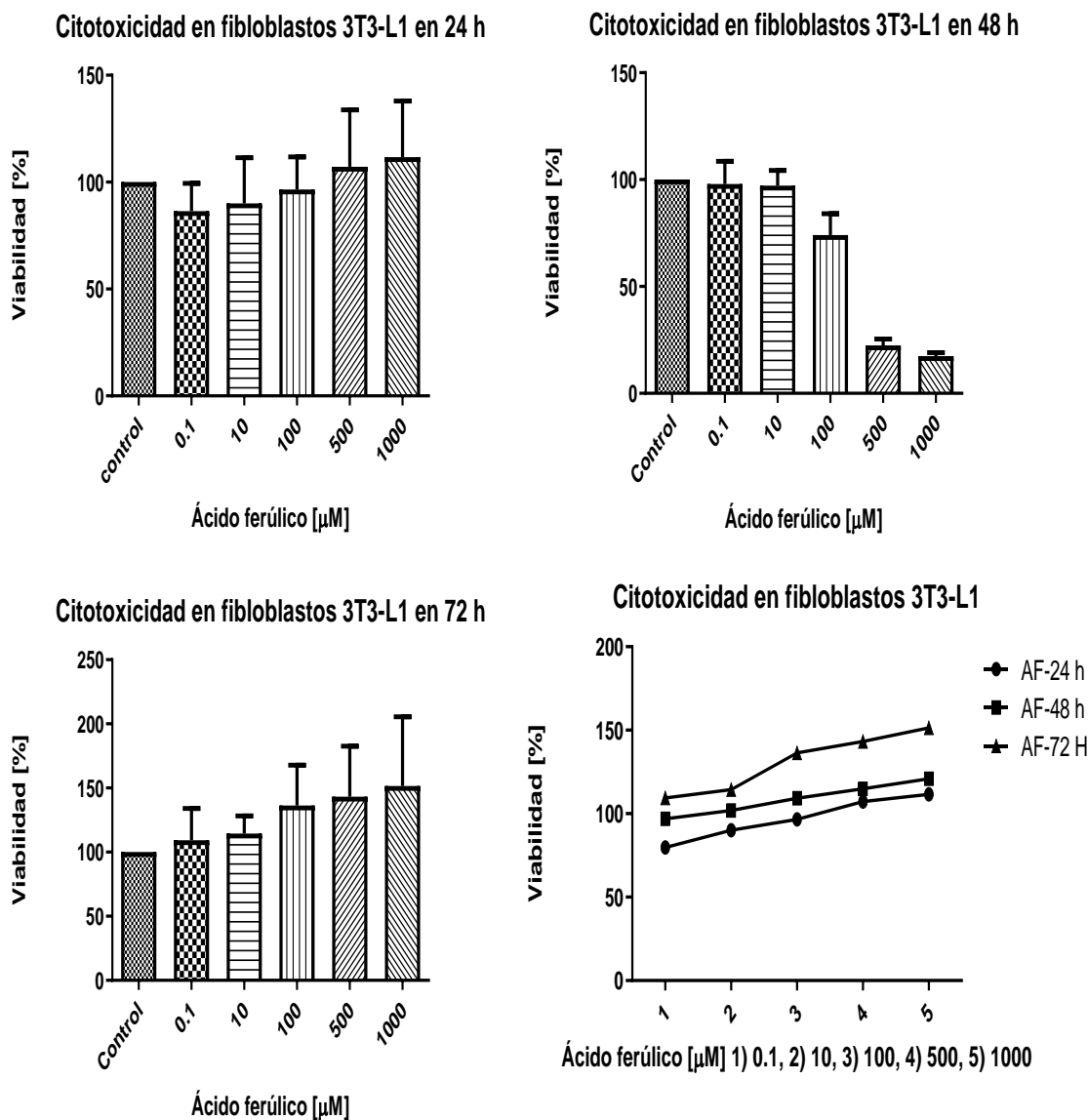


Figura 33. Porcentaje de viabilidad de fibroblastos 3T3-L1 ante la exposición a

concentraciones crecientes del ácido ferúlico durante 24 horas (A), 48 horas (B) y 72 horas (C) y los tres lapsos de tiempo (D). Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos; $n=16$ y $N=48$. No hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. (Imagen del autor realizada con el programa GraphPad Prism 8.0).

En adipocitos

En el día 9 los adipocitos fueron tratados con las diferentes concentraciones, en el caso de los ácidos cafeico y ferúlico se adicionaron en concentraciones de 0.1, 10, 100, 500 y 1000 μM para evaluar su viabilidad y observar su morfología (Figuras 34 y 36, respectivamente); para el ácido clorogénico se emplearon concentraciones de 10, 100, 500, 750 y 1000 μM (Figura 35). A continuación, en las Figuras 34-36, se muestran las imágenes de la morfología de los adipocitos visualizadas a las 48 horas posteriores de que se agregó el tratamiento. Se observan células de forma esférica que en su interior contienen lípidos.

❖ Ácido cafeico

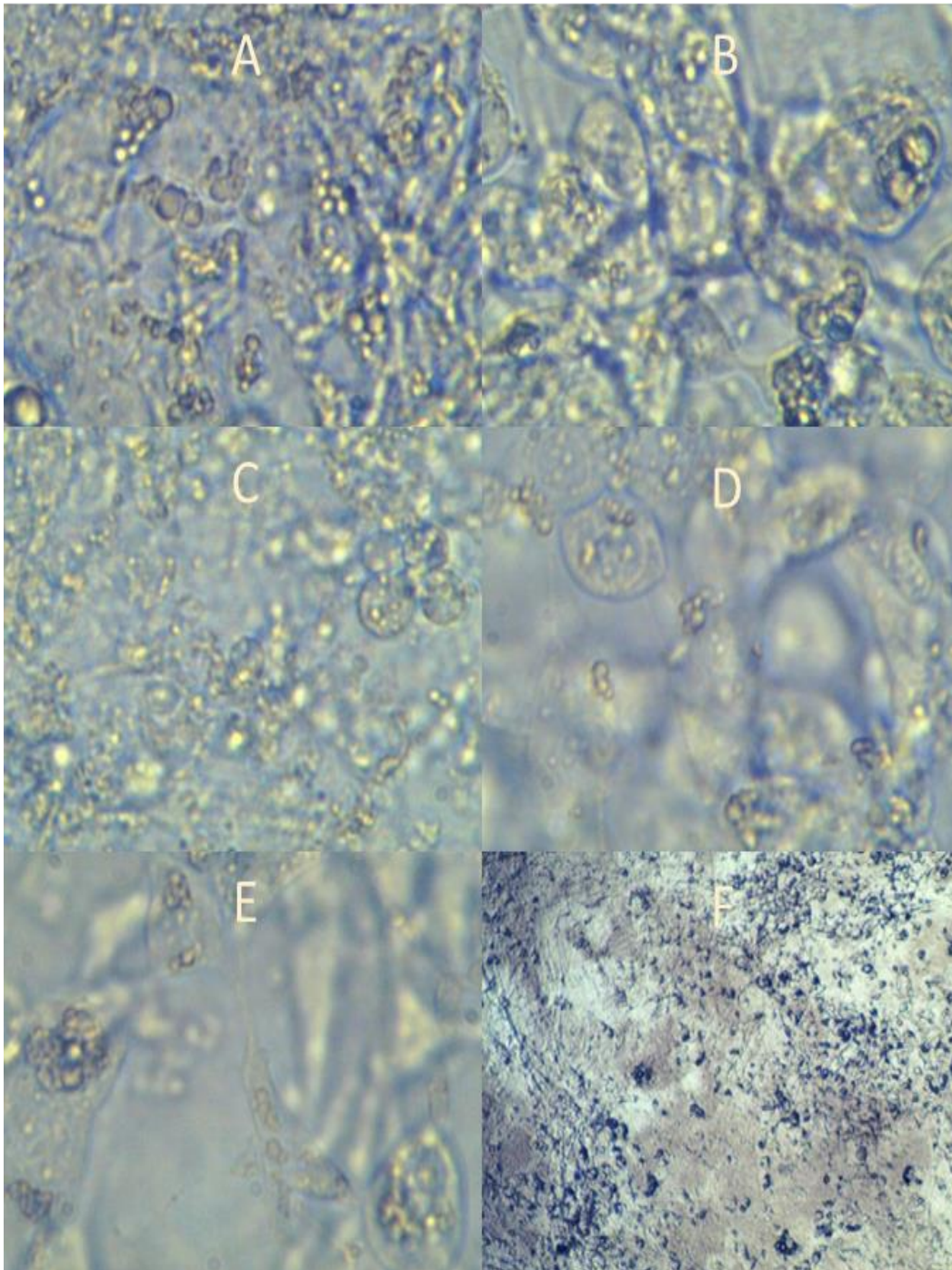


Figura 34. Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido cafeico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 40X).

❖ Ácido clorogénico

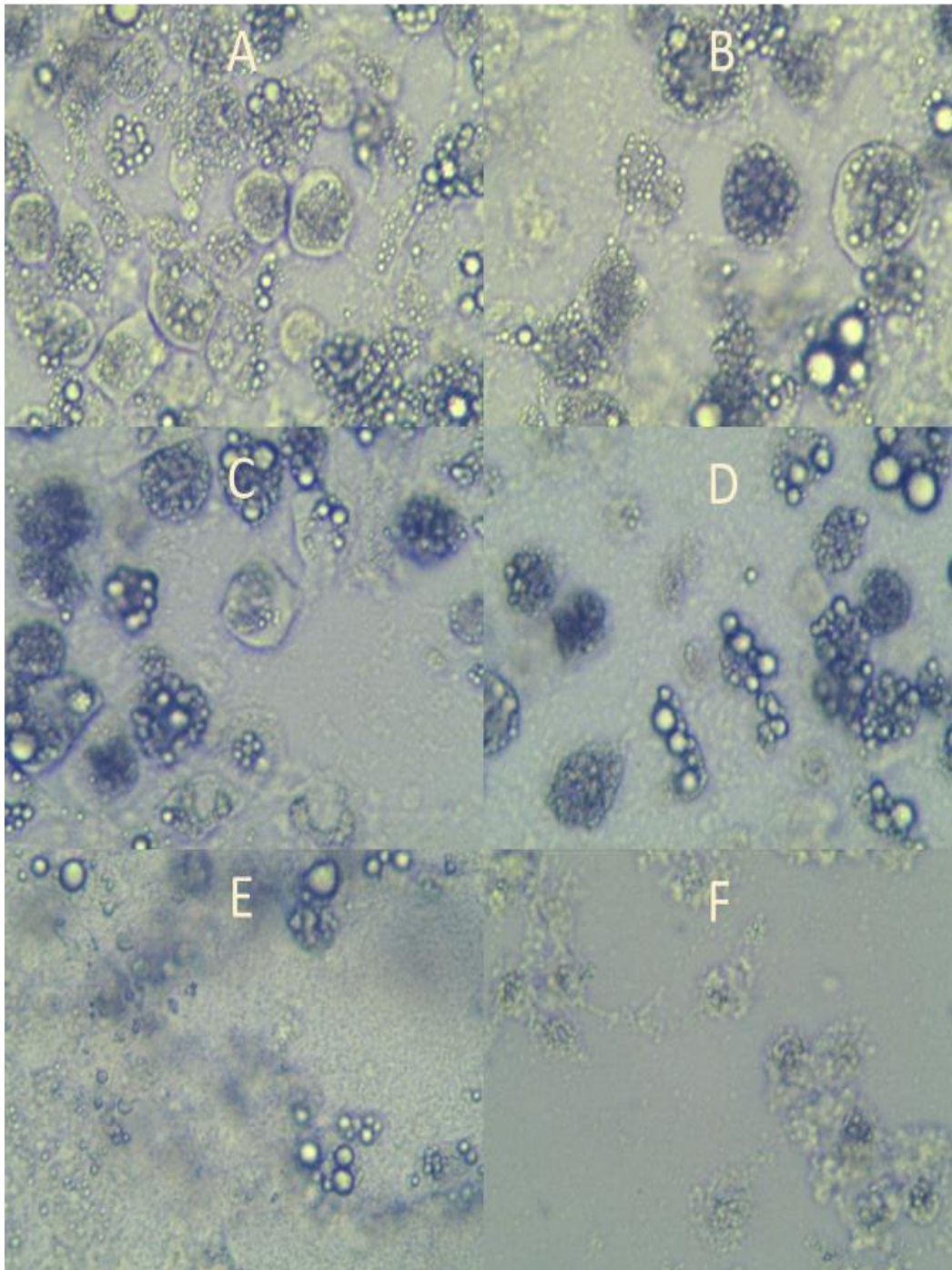


Figura 35. Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido clorogénico. Control (A), 10 μM (B), 100 μM (C), 500 μM (D), 750 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 40X).

❖ Ácido ferúlico

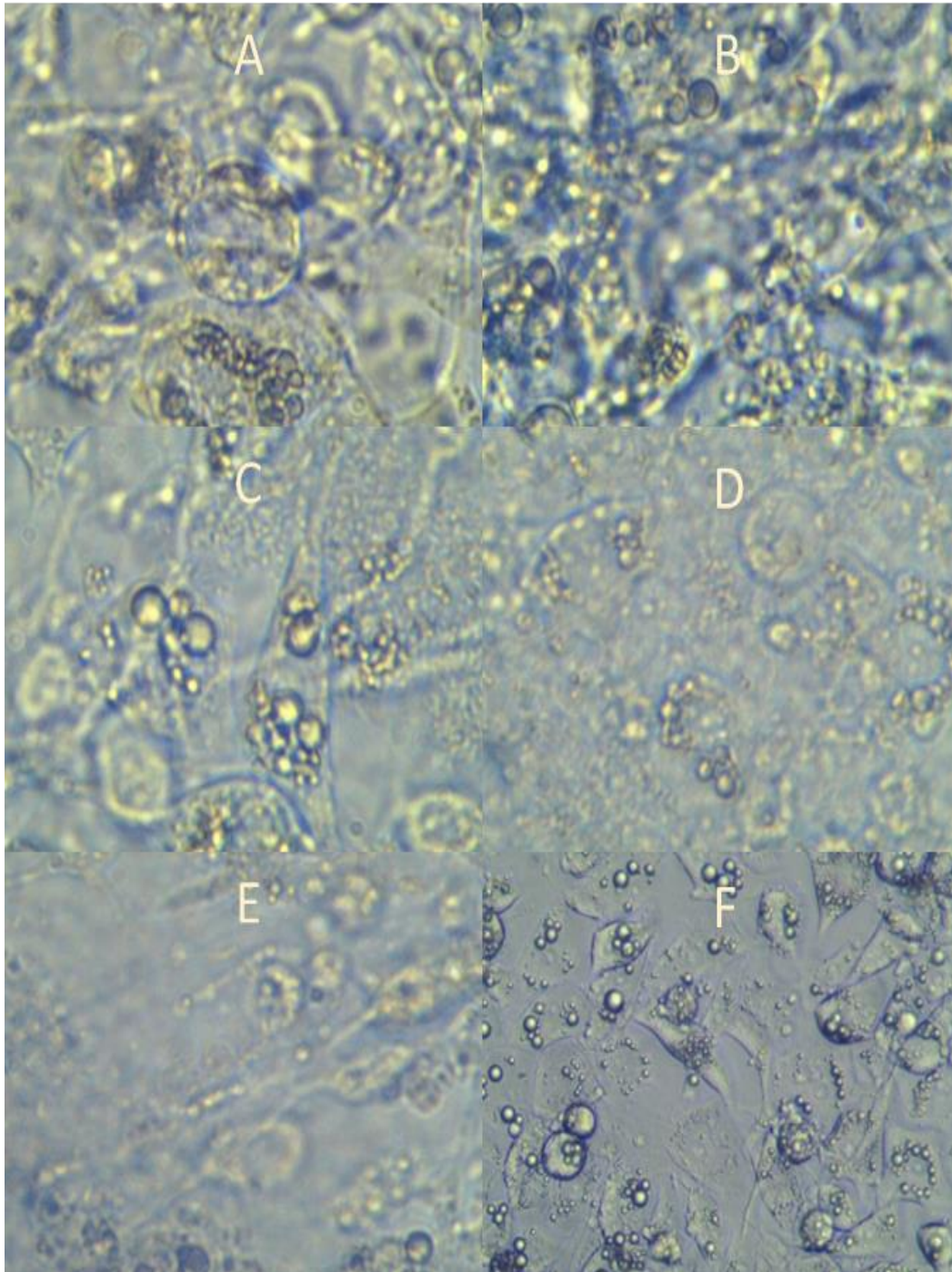


Figura 36. Morfología de adipocitos 3T3-L1 48 h posteriores al tratamiento con el compuesto ácido ferúlico. Control (A), 0.1 μM (B), 10 μM (C), 100 μM (D), 500 μM (E) y 1000 μM (F). (Fuente: Fotos tomadas en un microscopio invertido, Ampliación 40X).

Efecto de los ácidos polifenólicos en adipocitos 3T3-L1

Según los resultados obtenidos mediante el ensayo colorimétrico se observa que los ácidos polifenólicos en un lapso 48 h incrementan el porcentaje de viabilidad celular (Figura 37) y es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.

En las figuras 37 ácido cafeico (A), ácido clorogénico (B) y ácido ferúlico (C) no es posible calcular el IC50 debido a que en vez de generar muerte celular se observa el incremento en el porcentaje de viabilidad celular, presentando el siguiente orden creciente: ácido clorogénico < ácido ferúlico < ácido cafeico.

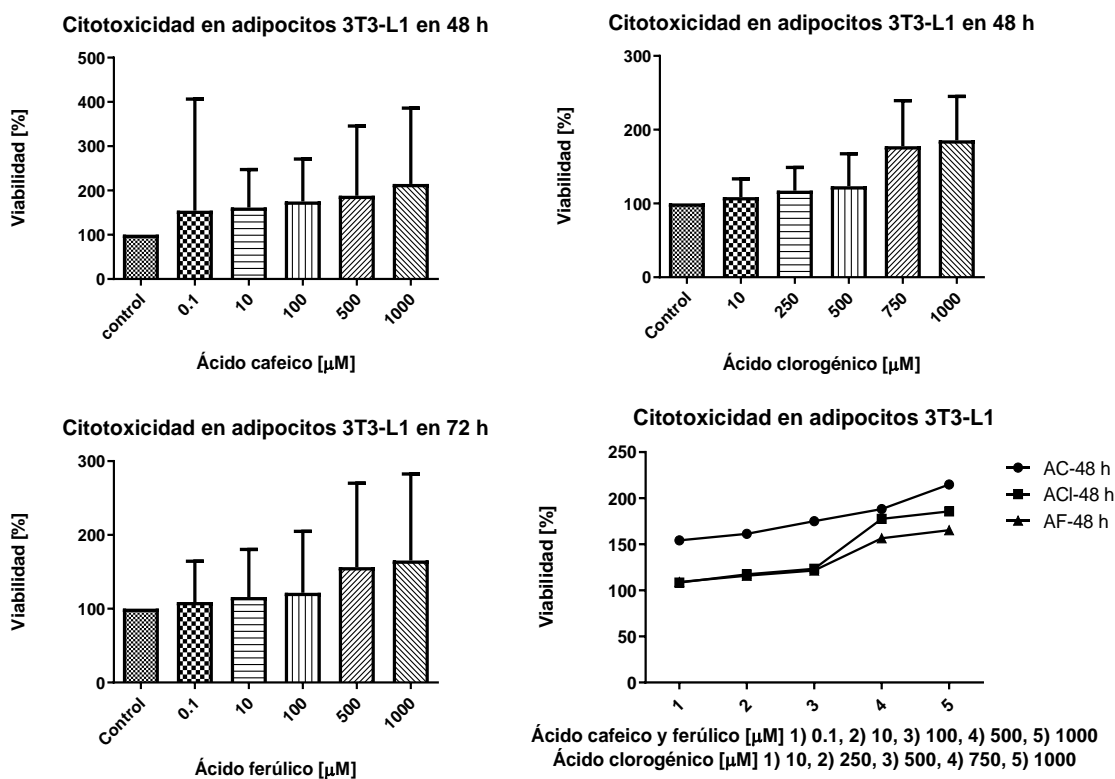


Figura 37. Porcentaje de viabilidad de adipocitos 3T3-L1 ante la exposición a concentraciones crecientes de los ácidos cafeico (A), clorogénico (B) y ferúlico

(C) durante 48 horas y los tres compuestos (D). Se representan los valores medios ($M \pm SD$) obtenidos; $N=16$. (Imagen del autor realizada con el programa GraphPad Prism 8.0).

8. DISCUSIÓN

Estudio *in silico*

El proyecto consistió en el estudio computacional de los compuestos de fármacos hipoglucemiantes metformina, pioglitazona, anagliptina y miglitol, los cuales presentan su efecto farmacológico sobre diferentes proteínas involucradas en la fisiopatología de la diabetes, asimismo se muestran las estructuras de los ácidos polifenólicos: clorogénico, cafeico, ferúlico, quínico y p-cumárico que inicialmente fueron aislados de productos naturales.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el servidor en línea molinspiration y en el software DataWarrior de las propiedades moleculares y parámetros de toxicidad *in silico*, a este conjunto de datos se le denomina reglas de Lipinski, las cuales deben ser cumplidas por las entidades químicas para ser consideradas como potenciales fármacos orales. El peso molecular debe ser menor a 500 g/mol, no debe tener más de 10 aceptores ni más de 5 donadores de puentes de hidrógeno, el coeficiente de partición agua-octanol debe ser menor de 5 para considerar una adecuada liposolubilidad a través de la membrana celular, no se debe rebasar los 10 ángulos rotables y el área de superficie polar debe ser menor a 150 lo cual indica una adecuada permeabilidad en células de tracto digestivo, mientras que, si el valor es menor a 95 se puede suponer una buena penetración de la barrera hematoencefálica. Al realizar el tamizaje virtual de los compuestos bajo estudio se observa que la metformina puede presentar efectos de toxicidad en la reproducción y como un potencial agente mutagénico, mientras que el ácido clorogénico viola las reglas de Lipinski ya que en su estructura presenta 6

heteroátomos que pueden formar puentes de hidrógeno y su área de superficie polar es mayor a 150 lo cual podría afectar su actividad biológica; sin embargo, no se descarta como un compuesto base para modificaciones estructurales de nuevos compuestos. Los parámetros de solubilidad acuosa, farmacocinética y química medicinal de los compuestos analizados en el servidor en línea SwissADME se presentan en la Tabla 3. La solubilidad acuosa es una característica de gran importancia farmacéutica en moléculas que se plantean como potenciales fármacos enterales debido a que esta propiedad facilita el manejo y la formulación de estos compuestos, asimismo esta propiedad influye en su absorción intestinal mientras mayor solubilidad acuosa presenten, menor absorción tendrán, ya que deben atravesar membranas lipofílicas,, en este sentido, la metformina, miglitol y ácido quínico presentan una alta solubilidad, la anagliptina, ácido cafeico y clorogénico son muy solubles, el ácido ferúlico y p-cumárico son solubles, mientras que la pioglitazona es moderadamente soluble, lo cual empalma con su buena absorción gastrointestinal y de las 9 moléculas sólo el ácido ferúlico y p-cumárico podrían atravesar barrera hematoencefálica lo cual concuerda con el valor de su TPSA. Dentro de los parámetros de farmacocinética, resulta de gran valor saber si un compuesto es o no sustrato de la glicoproteína P-gp (proteína de mayor importancia de los transportadores ATP dependientes y ABC), es importante destacar esta proteína por sus múltiples funciones en el tubo digestivo, en el sistema nervioso central y que se sobre expresa en distintos tipos de cáncer conduciendo a una multi drogo-resistencia, de los compuestos bajo estudio se encontró que el miglitol y la anagliptina son sustrato de dicha glicoproteína, la cual, contribuye a una disminución de la absorción y a un aumento de la eliminación del organismo de los fármacos que son sus sustratos , del mismo modo, es esencial

conocer la interacción de los xenobióticos con la super familia de citocromos P450 (CYP), que es la principal super familia de isoenzimas encargadas de la eliminación de fármacos a través de la biotransformación y la inhibición de alguna o algunas isoenzimas CYP está relacionado con diversos fármacos que presentan efectos tóxicos y llevan a efectos adversos, de acuerdo con Li Di y Wolf et al., del 50 al 90% de fármacos interactúan con cinco principales isoformas del CYP450 (1A2, 2C19, 2C9, 2D6, 3A4) y la inhibición de alguna de estas conduce a efectos adversos por toxicidad (Di, L., 2014; Wolf C.R., 2000), por lo cual, es de gran importancia destacar que la pioglitazona es el único compuesto de los evaluados que inhibe las cinco isoformas CYP450 y se relaciona con lo reportado en 2012 por Chinnam et al., dónde encontraron que la pioglitazona origina hipertrofia ventricular y congestión hepática y renal en ratones albinos suizos (Chinnam P., 2012).

Para descartar compuestos con un perfil farmacocinético adecuado se emplea el parámetro de biodisponibilidad, teniendo en consideración que los potenciales fármacos cuando menos tengan un 10% de biodisponibilidad oral en ratas o permeabilidad en células Caco-2, por lo tanto, derivado del análisis de los compuestos polifenólicos y los fármacos empleados como tratamiento para la diabetes se muestra que a excepción del ácido clorogénico todas las moléculas tienen por encima del 50% de probabilidad, mientras que el ácido clorogénico solo es el 11%. Además de utilizar parámetros farmacocinéticos, toxicológicos y las reglas de Lipinski, las principales compañías farmacéuticas han establecido diversos filtros para tener bibliotecas de compuestos químicos confiables y de alta calidad. En esta sección se muestra en la Tabla 3, que el ácido clorogénico es la única molécula que viola las reglas de Lipinski (Pfizer), debido a que en su estructura tiene más de 5 heteroátomos que pueden

donar protones que formen puentes de hidrógeno.

Dentro de las mejoras que se han realizado a las reglas de 5 se publicaron en 1999 las reglas de Ghose (Amgen Inc), en las cuales se establece que el LogP debe encontrarse entre -0.4 y +5.6, la refractividad molar debe tener un valor entre 40 y 130, el PM debe ser mayor de 160 y menor de 500 g/mol y el número total de átomos será entre 20 y 70, tomando en cuenta estas consideraciones la metformina viola dos apartados ya que tiene un peso molecular menor a 160 g/mol y el valor de LogP de la metformina, miglitol, los ácido quínico y clorogénico no es adecuado por ser menor a -0.4. La farmacéutica GlaxoSmithKline estableció las reglas de Veber que principalmente indican que las moléculas deben tener un valor de TPSA menor a 140 y el número de enlaces rotables debe ser menor a 10, con base en estos parámetros el ácido clorogénico es el compuesto que viola estas reglas por tener un TPSA mayor a 140 y de igual manera viola las reglas de Egan establecidas por la compañía farmacéutica y de biotecnología Pharmacia ya que el valor permitido de TPSA debe ser menor a 136.1 y el de LogP menor a 5.88 para considerar a una entidad química como un potencial fármaco. En 2001, Bayer una de las farmacéuticas más importantes a nivel global estableció las reglas de Muegge las cuales establecen que el PM debe ser mayor de 200 y menor de 600 g/mol, el LogP deber estar entre -2 y 5, el TPSA debe ser menor a 150, el número de anillos en una estructura tiene que ser menos de 7, el número de carbonos debe ser mayor a 4 y el número de heteroátomos mayor a 1, no debe tener más de 15 enlaces rotables, los aceptores y donadores de hidrógenos que puedan formar puentes de hidrógeno no debe rebasar los 10 y 5, respectivamente; teniendo en cuenta estas reglas solo la pioglitazona y anagliptina no violan estas reglas.

En la sección de química medicinal se consideran tres aspectos, los PAINS que son estructuras promiscuas que pueden tener actividad biológica frente a diversos targets independiente del blanco farmacológico, mientras que los parámetros de Brenk es un listado de 105 fragmentos que podrían originar toxicidad además de estar asociados con propiedades farmacocinéticas deficientes, metabolismo deficiente y de alta reactividad química, lo cual nos indica que los ácidos cafeico y clorogénico en su estructura tiene catecol como PAINS y las estructuras de Brenk la metformina contiene iminas, la pioglitazona un grupo tioéster, mientras que los ácido ferúlico, cafeico, p-cumárico y clorogénico tienen aceptores de Michael, dicha información nos orienta a una posible modificación química con el objetivo de aumentar la actividad farmacológica y disminuir o evitar los efectos no deseados. Asimismo, un factor de gran importancia en el diseño de fármacos es el proceso de síntesis química, si bien, en este proyecto se analizan productos naturales un punto crítico es valorar el tipo de obtención más favorable, por extracción de productos naturales o síntesis química, por lo tanto la predicción de una alta tasa de éxito en la obtención de los compuestos sintéticos se clasifica como 1 fácil y 10 difícil síntesis, en este sentido todos los compuestos tienen una accesibilidad buena o fácil por síntesis química.

Por último, los resultados obtenidos con en el software AutoDock Tools 4.1. de las interacciones moleculares de los compuestos bajo estudio y las proteínas involucradas en la fisiopatología de la diabetes se presentan en la Tabla 4. Se realizó el estudio de las proteínas PPAR γ , DPP4 y α -Glucosidasa, cada una con el fármaco de referencia y los cinco compuestos polifenólicos. En el caso del receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma, la pioglitazona tiene el mejor valor de energía de unión seguido por el ácido clorogénico, en contraste las mejores

constantes de inhibición las presentan el ácido ferúlico y el cafeico, respectivamente. La mejor interacción molecular con la dipeptidil peptidasa 4 está dada con la anagliptina y seguida por la interacción con el ácido clorogénico, sin embargo, este ácido polifenólico tiene la menor y mejor constante de inhibición. Los datos obtenidos con la α -Glucosidasa muestran que la mejor constante de inhibición e interacción molecular dada por el ΔG es con el ácido clorogénico, seguida por el miglitol que es el fármaco específico de esta enzima. De igual manera en la Tabla 4 se muestran los aminoácidos y átomos de los ligandos que participan en las interacciones moleculares ligando-proteína, destacando que las interacciones electrostáticas son las principales interacciones químicas.

Evaluación *in vitro*

Respecto a los resultados de la evaluación *in vitro*, primero se evaluó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células 3T3-L1. Los resultados demuestran que para los ácidos cafeico y clorogénico a la concentración 500 μM se alcanzó el 50% de muerte celular, demostrando estos compuestos son citotóxicos en fibroblastos 3T3-L1 a muy elevadas concentraciones. Por otra parte, respecto a los resultados del ensayo de MTT mostraron que tras la exposición de los adipocitos 3T3-L1 a las concentraciones de los compuestos mencionadas anteriormente (100, 250, 500, 750, 1000 μM) durante un tiempo de 48 h se observó que la viabilidad se mantuvo al alza a las diferentes concentraciones. Además, al igual que en el caso de los preadipocitos expuestos a ácido ferúlico, no fue posible determinar el valor de la CI_{50} ya que no se alcanzó el 50% de muerte celular a las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, estos resultados demuestran que estos compuestos no ejercen un efecto citotóxico en los adipocitos maduros 3T3-L1.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el estudio *in silico* se puede concluir que el conjunto de compuestos polifenólicos analizados cumplen las reglas de Lipinski, puntos críticos para el diseño o selección de productos naturales como potenciales fármacos. Asimismo, en la evaluación *in vitro*, los ácidos cafeico clorogénico y ferúlico no presentaron características citotóxicas importantes, ya que el porcentaje de viabilidad celular se vio disminuido en concentraciones bastante altas. Estos resultados nos permiten aseverar una mayor seguridad respecto a los fármacos de referencia como la metformina que puede ser un agente mutagénico o la pioglitazona que al inhibir las isoenzimas CYP450 y el miglitol y la anagliptina al ser sustratos de la proteína P-gp pueden originar efectos adversos. De igual manera, las moléculas bajo estudio presentan adecuada solubilidad, biodisponibilidad y alta accesibilidad para síntesis química, pese a que en su estructura química tienen regiones no deseadas estas se pueden modificar por sustituyentes que permitan obtener mejores moléculas.

10. PROPUESTAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, los compuestos propuestos son altamente promisorios, por esta razón resulta alentador dar continuidad a la evaluación del ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido ferúlico y de ésta manera cerciorarnos de que los efectos producidos por éstos se asocian a la interacción con las dianas moleculares implicadas en la DT2: α -glucosidasa, DPP4 y PPAR- γ .

{Se propone:

1. Realizar estudios de dinámica molecular para corroborar las conformaciones e interacciones intermoleculares de los complejos proteína-ligando.
2. Demostrar el efecto de los compuestos sobre la adipogénesis mediante la técnica PCR en tiempo real o Western blot, detectando los genes o proteínas, respectivamente, implicados en el proceso de diferenciación de la línea celular 3T3-L1.
4. Evaluar los compuestos *in vivo* empleando un modelo murino diabético.

11. REFERENCIAS

- ✦ Alcalá H.C, de la Rosa L.A., Wall MA. (2015). *Avances en terapia farmacológica y fitoquímica de la adipogénesis*. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua (México). 32 (2): 545-555
- ✦ Alessi MC, Lijnen HR, Bastelica D, Juhan-Vague I. (2003). Adipose tissue and atherothrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 33(5-6), 290-7.
- ✦ Al-Sulaiti H., Dömling AS., Elrayess MA. (2019). Mediators of Impaired Adipogenesis in Obesity-Associated Insulin Resistance and T2DM. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/adipose-tissue-an-update/mediators-of-impaired-adipogenesis-in-obesity-associated-insulin-resistance-and-t2dm>
- ✦ American Diabetes Association. (2011). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care J.*, 34(1), S11-61.
- ✦ American Diabetes Association. (2020). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care J.*, 37(1), S81-90.
- ✦ American Diabetes Association. (2021). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care J.*, 44(1): S15-S33.
- ✦ Atkinson M., Eisenbarth G., Michels A. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet J.*, 383 (9911), 69-82.
- ✦ Basto A.A., Barrientos G.T., Rojas M.R., Aguilar S.C.A., López O.N., De la Cruz G.V., Rivera D.J., Shamah L.T., Romero M.M., Barquera S., López R.R., Hernández Á.M., Villalpando S. (2020). Prevalencia de diabetes y descontrol

glucémico en México: resultados de la Ensanut 2016. *Salud Publica de México*. 62(1), 50-59.

- ✦ Beltrán V. Nohra. (2016) Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. UAM-CUA. Disponible en: http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf
- ✦ Biblioteca nacional de medicina, Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2020). Chlorogenic-acid, Quinic-acid, Caffeic-acid, 4-Hydroxycinnamic-acid, Ferulic-acid. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ✦ Biomodel, (2021). *Ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT*. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
- ✦ Boker J.D. y Hermann R.B. (1994). *The development of computational chemistry in the United States*. Reviews in computational chemistry, VCH Publishers. 5(1).
- ✦ Canadian Diabetes Association. (2013). Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*. 37(1), S8-11.
- ✦ Carpéné C., Gómez Z.S. (2015). Novel strategies for preventing diabetes and obesity complications with natural polyphenols. *Curr. Med. Chem.* 22(1), 150-164.
- ✦ Carrera A., Martínez M. (2013). Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo "insulin resistance-secretion deficit". *Nutrición Hospitalaria*, 28(2), 78-87.

- ✦ Cernea S. y Dobreanu M. (2013). Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem Med (Zagreb)*. 23(3), 266–280.
- ✦ Chaturvedi N. (2007). The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 76(1), 3-12.
- ✦ Clavijo M.A., Gómez C.D., Gómez A.C. (2007). Adipogénesis in vitro de células 3T3-L. *Revista Med*. 15 (2), 170-176.
- ✦ Cnop M., Welsh N., Jonas J. C. (2005). Mechanisms of Pancreatic-Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes*. 54(2), 97-107.
- ✦ Cuenca V.L., Uriarte S.M., Rodríguez D.J.L., Parcon B.M. (2020). Use of non-conventional medicine for patients with diabetes. *AM Camagüey*. 24(1), 65- 76.
- ✦ De Juan RD. (2021). Estrategias actuales y perspectivas futuras en la terapia de la diabetes tipo 2. Facultad De Farmacia, Universidad Complutense. Disponible en:

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/DANIEL%20DE%20JUAN%20ROBLES.pdf>
- ✦ Esteve M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinol Nutr.*, 61(2), 100-112
- ✦ Facultad de química, Universidad Autónoma de Querétaro. (2021). *Química medicinal*. Disponible en:

<https://quimica.uaq.mx/index.php/investigacion/lineas-inves/qm>
- ✦ García A.P. y Díaz J.P. (2019). Farmacología de sistemas: estudio de las bases

moleculares de respuesta a fármacos. *Gen. méd. y gen.* 3(3), 75-89.

- ✦ Giacco F., Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research.* 107(9), 1058-1070.
- ✦ Giacobini E. (1997). From Molecular Structure to Alzheimer Therapy. *Jpn. J Pharmacol.* 74(3), 225-241.
- ✦ Gómez R., Conde J., Gómez R.J., Lago F., Gualillo O. (2009). Adipocytokines: emerging mediators of the immune response and inflammation. *Reumatología clínica.* 5(1), 6-12.
- ✦ Gregoire FM. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med. (Maywood),* 226(11), 997-1002.
- ✦ Haque WA, Garg A. (2004). Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med.* 24(1), 217-34.
- ✦ Hemlata D., Raj Kumar T., Vikas S. (2017). Past and Future of in-vitro and in-vivo Animal Models for Diabetes: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.* 51(4), 522-530.
- ✦ Henriksen E.J., Diamond-Stanic M.K., Marchionne E.M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine.* 51(5), 993-999.
- ✦ Johnson J.D., Luciani, D.S. (2010). Mechanisms of pancreatic beta-cell apoptosis in diabetes and its therapies. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 654,447-462.
- ✦ Kahn S.E., Cooper M. E., Del Prato S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 383(9922),1068-1083.

- ✦ Lenzen, S. (2008). Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochemical Society Transactions*. 36(3), 343-7.
- ✦ Lupi R., Del Prato S. (2008). Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes & Metabolism*. 34(2). 56- 64.
- ✦ Mateos S.C.N., Castillo R.Z. (2002). Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*. 5(1-2), 33-41.
- ✦ Merck Sharp & Dohme Corp. (2020). *Manual MSD*. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/SearchResults?query=diabetes>
- ✦ Nolan C. J., Damm P., Prentki M. (2011). Type 2 diabetes across generations: pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 378(9786), 169- 181.
- ✦ Olvera G.C., Leo A.G.E., Hernández M.H.L. (2008). Pancreas and β cells: Differentiation mechanisms, morphogenesis and endocrine cellular specification. Regeneration? *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 65(4), 306-324.
- ✦ Palomares C.B. (2016). Caracterización transcriptómica de células troncales mesenquimales inducidas a diferenciarse en adipocitos. Universidad de Córdoba. Disponible en: <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/13456>.
- ✦ Peropadre LA. (2014). Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/660496>
- ✦ Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 27(1), 76-89.
- ✦ ReserchGate. (2019). *Manual para la enseñanza practica del ensayo MTT para*

evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. UNAM. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/336348823> Manual para la enseñanza práctica del ENSAYO MTT PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTICULAS

- ✦ Reyes S.F.A, Pérez Á.M.L., Figueredo E.A., Céspedes C.Y., Ardevol P.E. (2015). Incretins as a new therapeutic option in the diabetes mellitus type 2. *Revista Cubana de Medicina.* 54(2),151-166.
- ✦ Rojas-Gomez Diana Marcela, Angarita Davila Lisse, Cohen-Massabo Maria Alejandra, Giacometto Marcela, Rojas Joselyn, Wilches-Duran Sandra et al . Nuevos enfoques moleculares en la regulación de la adipogénesis: El papel de la Conexina 43. AVFT [Internet]. 2016 Dic [citado 2022 Abr 08] ; 35(4): 86-91. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642016000400002&lng=es.
- ✦ Ruiz G., (2019) Hipoglucemiantes orales para diabetes mellitus tipo 2. *MED-CMC.* Disponible en: <https://med-cmc.com/hipoglucemiantes-orales-para-diabetes-mellitus-tipo-2/>
- ✦ Sánchez JC, Romero CR, Arroyave CD. (2015). El adipocito en el laboratorio: historia, perspectivas y reporte de experiencia. *Rev CES Med.* 29(2), 271- 282.
- ✦ Scior T., Martínez M.E. y Salinas S.E. (2007). Los modelos in silico, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos.* 68, 45-48
- ✦ Smirnov A. V., Snigur G. L., Voronkova M. P. (2012). Pancreatic Islet Beta- Cell Apoptosis in Experimental Diabetes Mellitus. Ntuli, T. (Ed.), *Apoptosis and Medicine.* 226-246.

- ✦ Smushkin G., & Vella A. (2010). What is type 2 diabetes? *Medicine*. 38(11), 597-601.
- ✦ Torrades S. (2005). Diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Offarm*. 25:05.
- ✦ Trujillo ME, Scherer PE. (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27(7), 762-78.
- ✦ World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. *Geneva, World Health Org.* 1999.
- ✦ Wu KK, Huan Y. (2006). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis*. 191(2), 241-249.
- ✦ Xiao J.B., Högge P. (2015). Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes: Current Insights and Future Perspectives. *Curr. Med. Chem.* 22(1), 23-38.
- ✦ Yap C.K., Sánchez G.X., Rivero L.C.A. The Role of the DPP4 Inhibitors: A Current Approach in the Management of Diabetes Mellitus type 2. *Atención Familiar*. 24(3), 136-139.
- ✦ Zárate A., Saucedo R., Hernández M. (2005). El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ) es un factor de transcripción multigénico de versatilidad metabólica. *Acta Médica Grupo Ángeles*. 3(1), 53-54.
- ✦ Zatalia S. R., Sanusi H. (2013). The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. *Acta Medica Indonesiana*. 45(2), 141-147.

12. ANEXOS

Interacciones obtenidas en el docking molecular para cada compuesto propuesto y los fármacos de referencia, con su respectivo blanco.

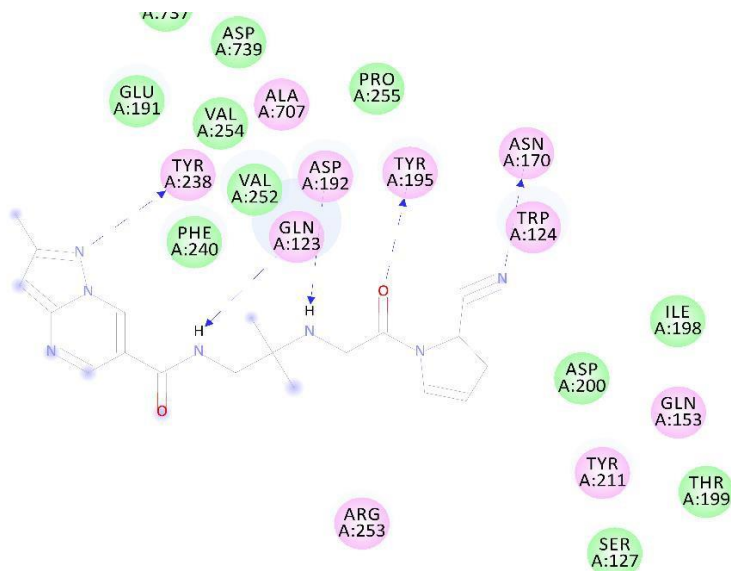


Figura 38. Interacciones de anagliptina-DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

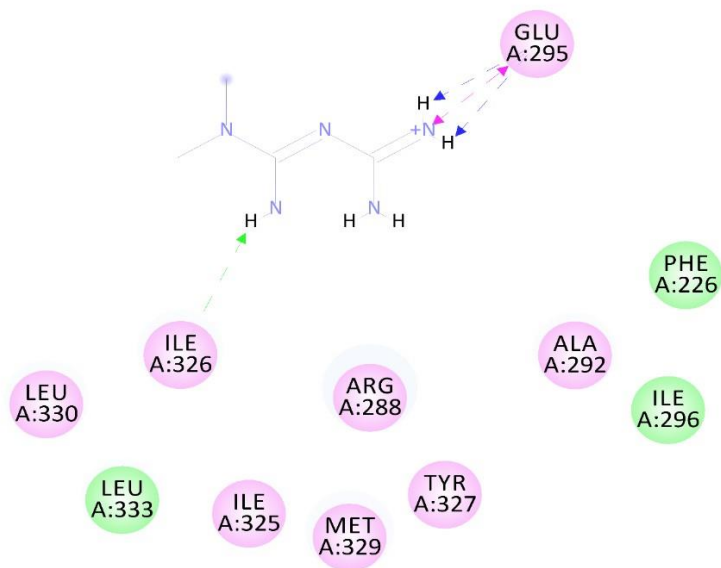


Figura 39. Interacciones de metformina-PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

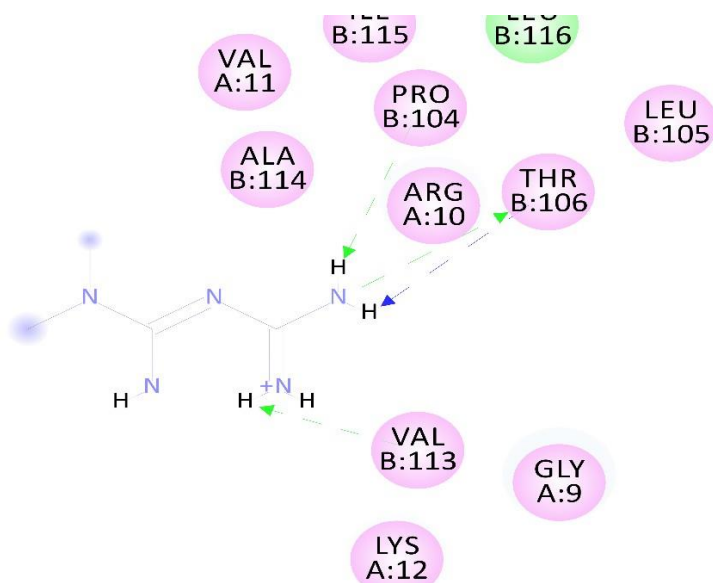


Figura 40. Interacciones de metformina-AMPK, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

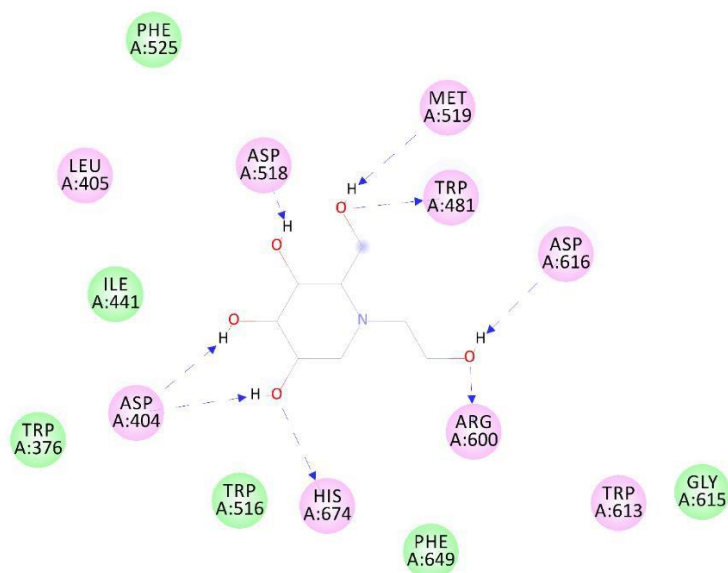


Figura 41. Interacciones de Miglitol- α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

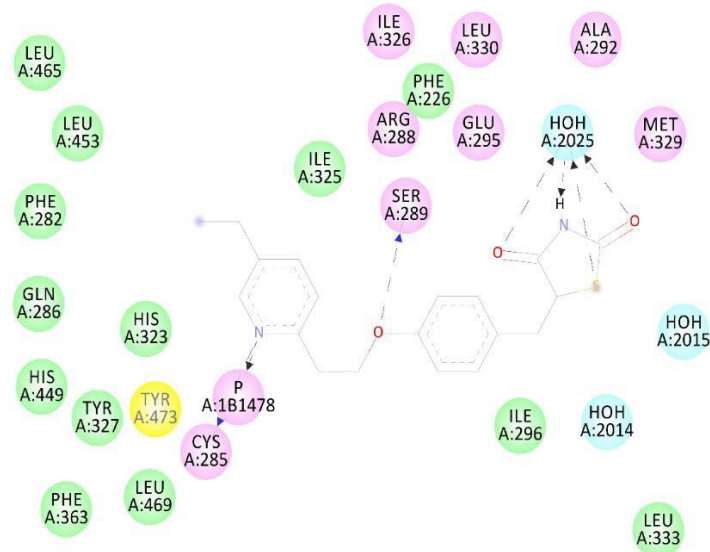


Figura 42. Interacciones de pioglitazona-PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

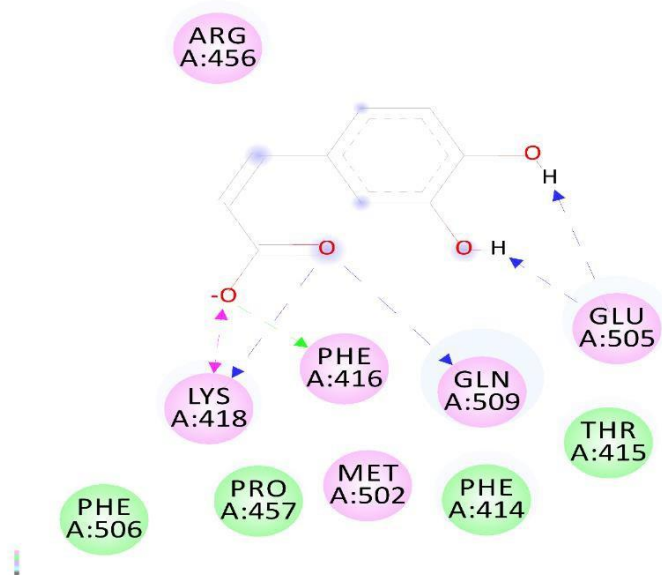


Figura 43. Interacciones de ácido cafeico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

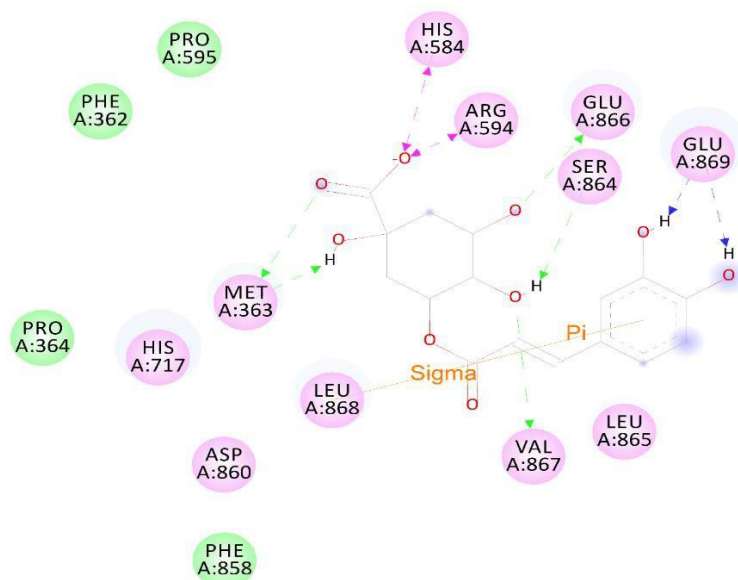


Figura 44. Interacciones de ácido clorogénico SSSSE - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

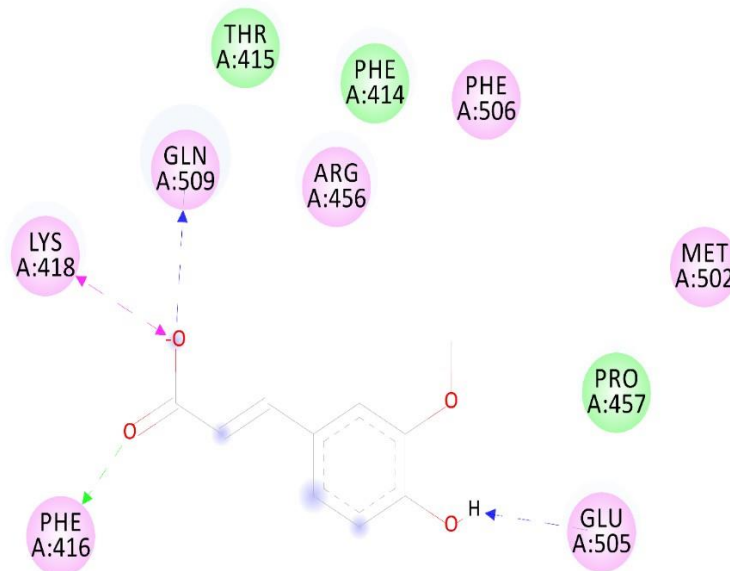


Figura 45. Interacciones de ácido ferúlico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

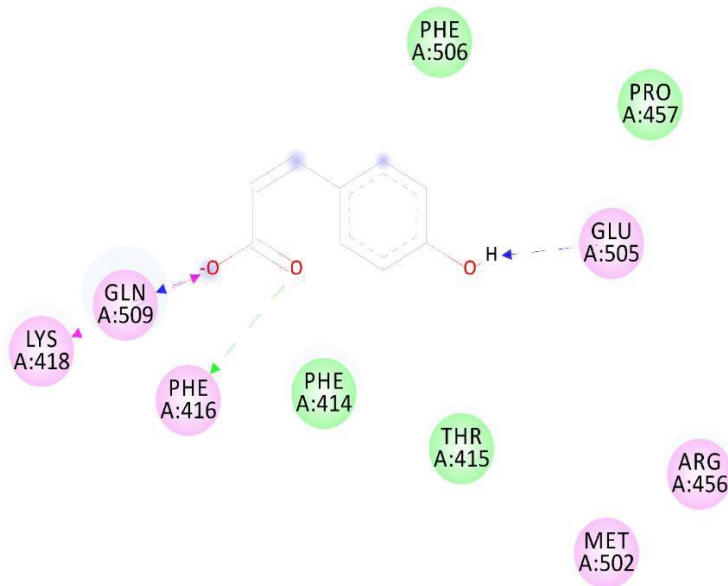


Figura 46. Interacciones de ácido p-cumárico E - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

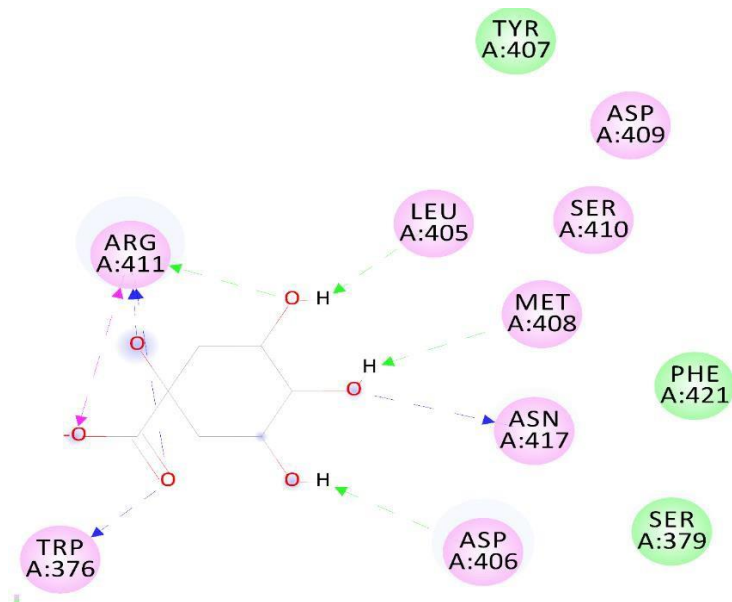


Figura 47. Interacciones de ácido quínico SRRS - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize)

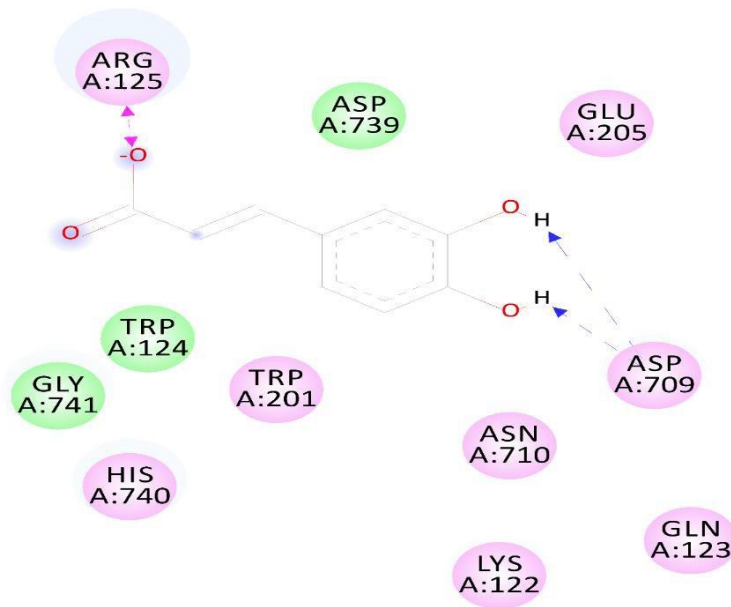


Figura 48. Interacciones de ácido cafeico E – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

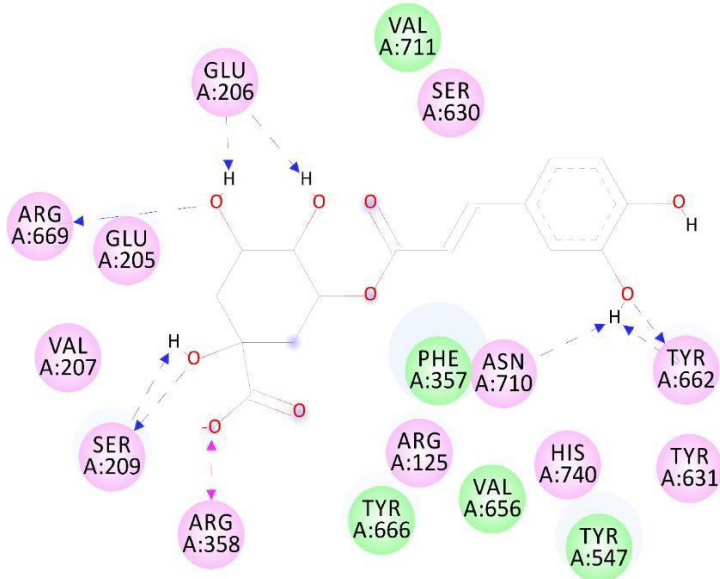


Figura 49. Interacciones de ácido clorogénico RRSSE - α -glucosidasa, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

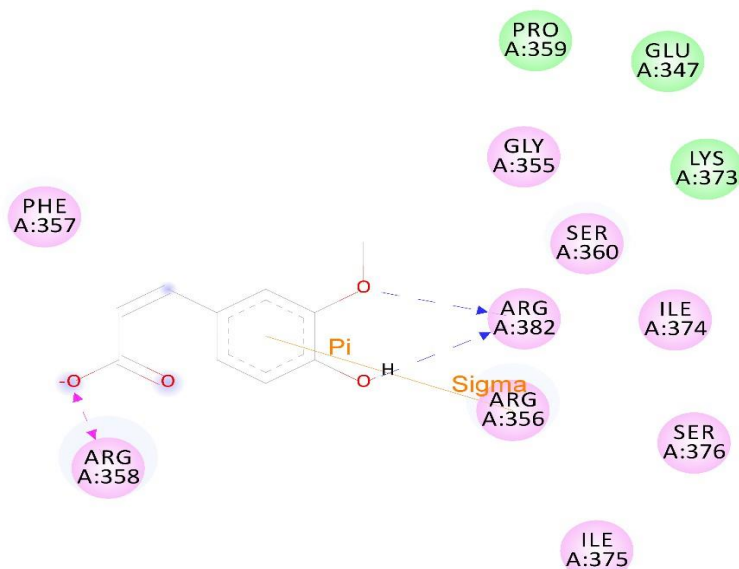


Figura 50. Interacciones de ácido ferúlico E – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

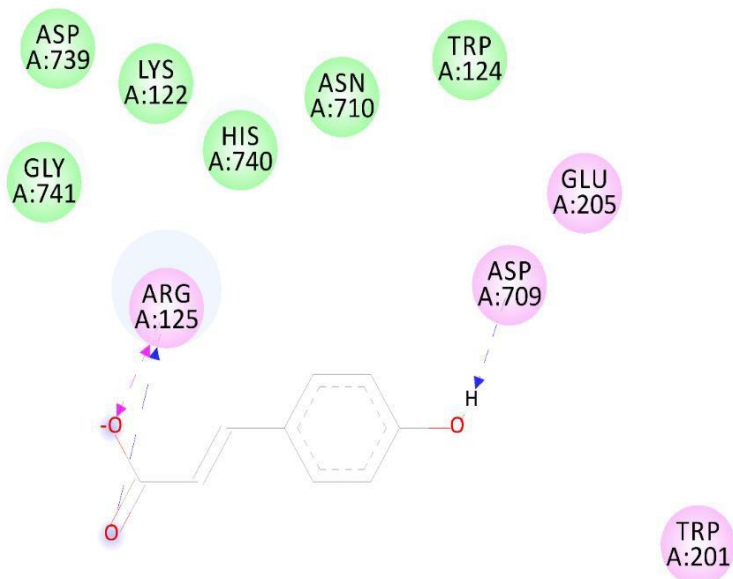


Figura 51. Interacciones de ácido p-cumárico Z – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualizer).

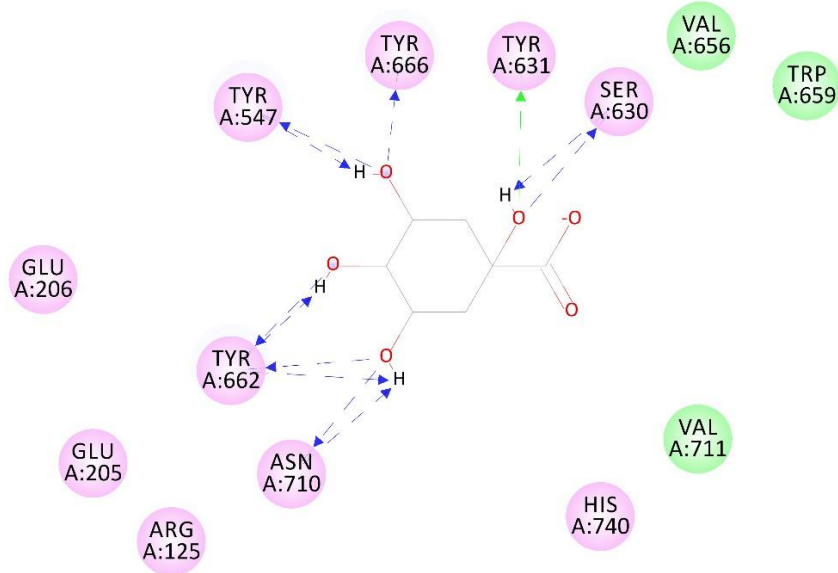


Figura 52. Interacciones de ácido quínico RSRS – DPP4, con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize

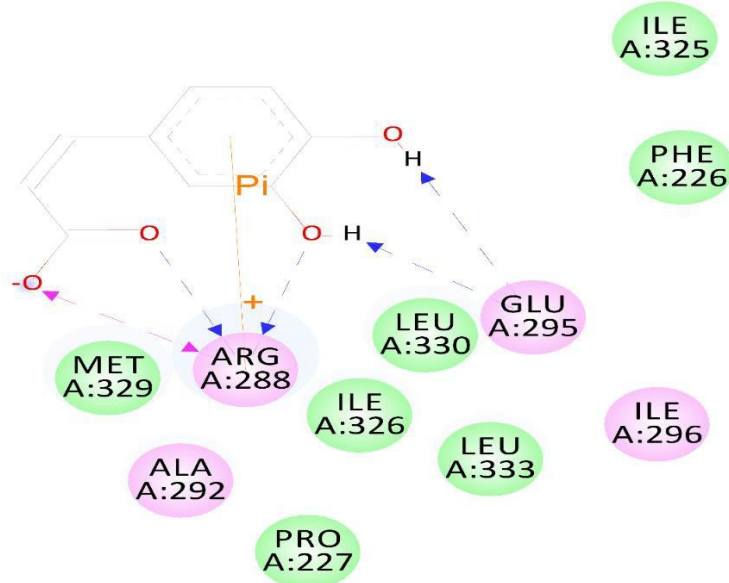


Figura 53. Interacciones de ácido cafeico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize

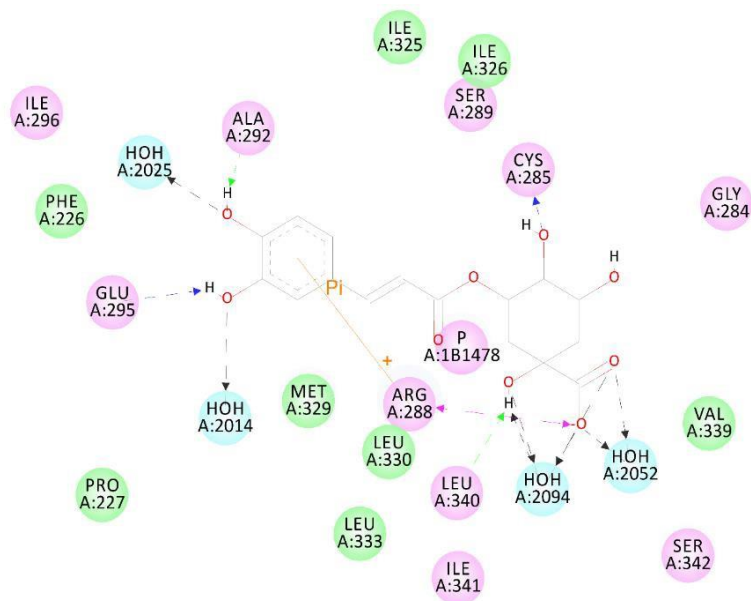


Figura 54. Interacciones de ácido clorogénico RSRRZ – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize)

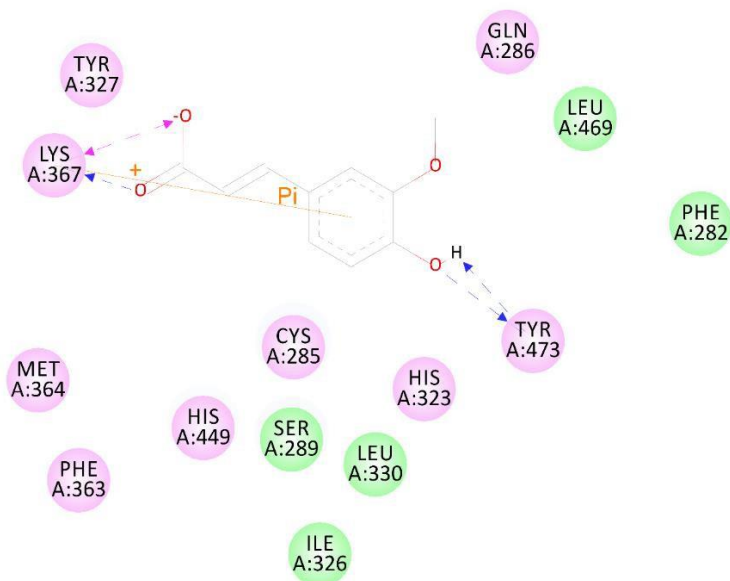


Figura 55. Interacciones de ácido ferúlico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize)

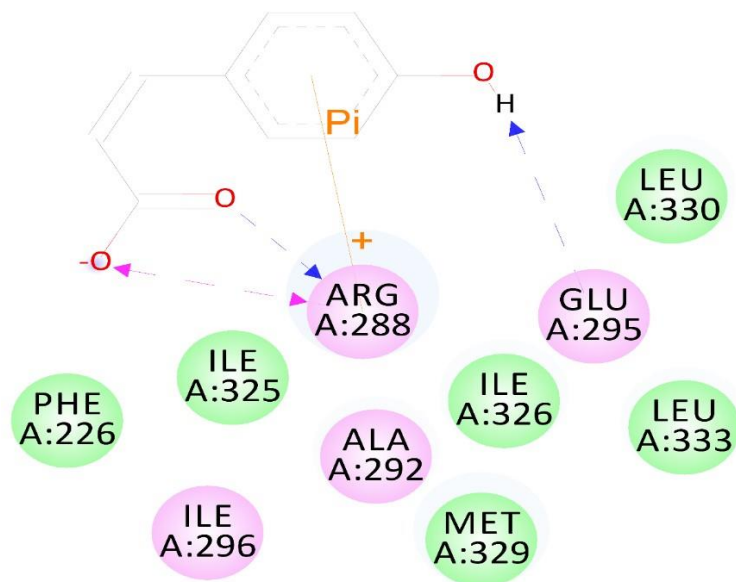


Figura 56. Interacciones de ácido p-cúmarico Z – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize)

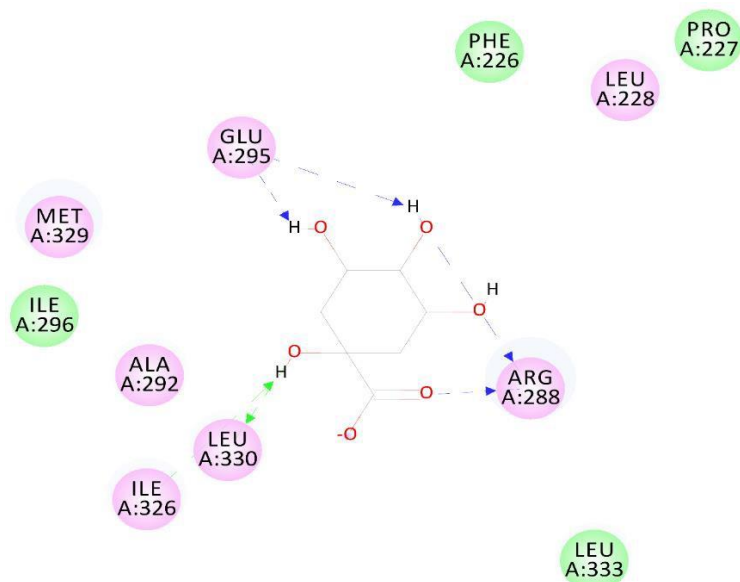


Figura 57. Interacciones de ácido quínico RSRS – PPAR γ , con sus aminoácidos representado en diagrama bidimensional (2D). (Imagen del autor mediante el software Discovery Studio Visualize)

Participación en congresos

ANIVERSARIO 50 1971 2021
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Departamento de Ciencias Médicas, División Ciencias de la Salud
Universidad de Guanajuato, Campus León

XXI Reunión Internacional de Ciencias Médicas

EVENTO VIRTUAL 8-10 septiembre 2021

Otorga la Presente

Constancia

BRENDA MORENO DE JESÚS

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO LIBRE:
ESTUDIO IN SILICO Y EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA IN VITRO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIDIABETES

EN COAUTORÍA CON:
ANA MARÍA CORREA BASURTO, REYNA DEL CARMEN NAVARRETE MONDRAGÓN, MARVIN ANTONIO SORIANO URSÚA, JESSICA ELENA MENDIETA-WEJEBE, JUAN ANDRES ALVARADO-SALAZAR

Dr. Victoriano Pérez Vázquez
Coodinador del Doctorado en Ciencias Médicas

Dr. Tonatiuh García Campos
Director de División de Ciencias de la Salud

Dra. Claudia Luévano Contreras
Director del Departamento de Ciencias Médicas

Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Médicas