



Evaluación del efecto de un extracto rico en triterpenos obtenido a partir de hojas de *Eucalyptus tereticornis* sobre la acumulación de grasa en células hepáticas

Alexandra Echeverri Chica

Trabajo de investigación para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesor

Norman Balcázar Morales, Doctor (PhD) en Área de Bioquímica

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Ingeniería Bioquímica

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2022

Cita	(Echeverri Chica, 2022)
Referencia	Echeverri Chica, A. (2022). <i>Evaluación del efecto de un extracto rico en triterpenos obtenido a partir de hojas de Eucalyptus tereticornis sobre la acumulación de grasa en células hepáticas.</i> 2022 [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación Genética Molecular (GENMOL), Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia.

Asesor: Norman Balcázar Morales.

Auxiliar de investigación: Diana Lorena Muñoz.

Estudiantes de doctorado: Elkin Escobar y Laura Betancur

Profesores: Sergio Acín y Violeta Diez.



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano: Jesús Francisco Vargas Bonilla

Jefe departamento: Lina María González Rodríguez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos

Dedicatoria

A mi familia quienes me ha acompañado a lo largo de este camino, porque sin todo su apoyo, esfuerzo y dedicación no sería posible.

Agradecimientos

Al grupo de investigación GENMOL por abrirme las puertas de su laboratorio y más allá de eso, del conocimiento, la experiencia y los aprendizajes. A la Universidad de Antioquia por formarme como una profesional integral.

Tabla de contenido

Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
1 Objetivos	14
1.1 Objetivo general	14
1.2 Objetivos específicos.....	14
2 Marco teórico	15
2.1 Obesidad.....	15
2.2 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina	16
2.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....	17
2.4 Tratamientos para la Diabetes mellitus tipo 2.....	18
3 Metodología	21
3.1 Obtención de los triterpenos.....	21
3.2 Preparación de la nanoformulación.....	21
3.3 Modelo in vivo	22
3.3.1 Pruebas fisiológicas del metabolismo de carbohidratos	22
3.3.2 Tinción del tejido hepático con Oil red.....	23
3.3.3 Extracción de ARN y PCR en tiempo real.....	23
3.3.4 Ensayos de inmunohistoquímicas	24
3.3.5 Extracción de proteínas y Western blot	25
3.4 Modelo <i>in vitro</i>	25
3.4.1 Inducción de la acumulación de ácidos grasos en las células HepG2	26
3.4.2 Medición in vitro de la concentración de ácidos grasos en células HepG2.....	26

3.4.3 Evaluación in vitro de la viabilidad celular	27
3.4.4 Determinación in vitro del estrés oxidativo en la línea celular HepG2	27
3.4.5 Evaluación in vitro del potencial de membrana de la línea celular HepG2.....	28
3.5 Análisis estadístico.....	28
4 Resultados	29
4.1 Modelo in vivo	29
4.1.1 Efecto del OBE100 sobre el peso de los animales y el metabolismo de carbohidratos.	29
4.1.2 Efecto del OBE100 sobre la acumulación de ácidos grasos del tejido hepático.	32
4.1.3 Efecto del OBE100 sobre la expresión de genes gluconeogénicos y lipogénicos.....	32
4.1.4 Efecto del OBE100 sobre la expresión de las proteínas: ACC, pACC, AMPK y pAMPK.....	33
4.2 Modelo in vitro.....	37
4.2.1 Viabilidad celular en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.....	37
4.2.2 Efecto del OBE100 y sus fracciones individuales sobre la acumulación de ácidos grasos en la línea celular HepG2	38
4.2.3 Estrés oxidativo en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.....	38
4.2.4 Potencial de membrana en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.....	38
5 Análisis.....	40
6 Conclusiones	45
Referencias	46

Lista de tablas

Tabla 1 Grupos de ratones experimentales y tratamiento suministrado.....	23
Tabla 2 Secuencias de primers utilizados para qRT-PCR de hígado de ratones.....	24
Tabla 3 Tratamientos realizados a las células HepG2.....	26

Lista de figuras

Figura 1 Evaluación del peso de los animales y el metabolismo de carbohidratos.....	30
Figura 2 Efecto del OBE100 sobre el peso y la acumulación de ácidos grasos del tejido hepático	31
Figura 3 Efecto del OBE 100 en la expresión de los genes PEPCK, G6Pase, ACC, FAS, Cpt1a y PPAR α	34
Figura 4 Efecto del OBE 100 en la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímicas de tejido hepático	35
Figura 5 Efecto del OBE 100 en la expresión de proteínas: ACC, pACC, AMPK y pAMPK mediante inmunohistoquímicas.....	35
Figura 6 Efecto del OBE 100 en la expresión de ACC y pACC mediante western blot	36
Figura 7 Efecto del OBE100 y sus fracciones individuales sobre la línea celular HepG2.....	37
Figura 8 Contenido de ácidos grasos en la línea celular HepG2 finalizados los tratamientos.....	39

Siglas, acrónimos y abreviaturas

DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
RI	Resistencia a la Insulina
AU	Ácido ursólico
AO	Ácido oleanólico
LAU	Lactona del ácido ursólico
IP	Intraperitoneal
IMC	Índice de masa corporal
EHGNOA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
GENMOL	Genética molecular
QOPN	Química orgánica de productos naturales
RT	Temperatura ambiente (Room temperature)
ACC	Acetil coA carboxilasa
pACC	Acetil coA carboxilasa fosforilada
AMPK	Proteína kinasa activada
pAMPK	Proteína kinasa activada fosforilada
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
HFD	Dieta rica en grasa
AG	Ácidos grasos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
FBS	Suero fetal bovino
BSA	Albúmina sérica bovina
AICAR	5 amino – 4 imidazolecarboxamida ribosita
PPARα	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa
FAS	Ligando FAS
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa 1a
G6Pase	Glucosa 6 fosfatasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
MTT	Metil-tiazolil-tetrazolio

Resumen

La obesidad es un problema nutricional, que en los últimos años ha incrementado su prevalencia a nivel nacional e internacional. La obesidad conduce a la resistencia a la insulina (RI) y esta a su vez tiene un rol causal en el desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A pesar de que existen múltiples tratamientos para la DM2, se presentan dificultades de adherencia al tratamiento y múltiples efectos secundarios, por lo cual los productos naturales son una alternativa que toma más fuerza para el tratamiento de esta enfermedad. Un extracto crudo obtenido de hojas de *Eucalyptus tereticornis*, denominado OBE100, presenta propiedades hipoglucemiantes y antidiabéticas. Sus componentes principales son ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO) y lactona del ácido ursólico (LAU). En este estudio se evaluó el efecto del OBE100 sobre algunas alteraciones metabólicas presentes en el hígado de ratones, administrando una nanoformulación oral. Adicionalmente, se utilizó un modelo de acumulación de grasa en la línea celular HepG2. Se realizaron tinciones con oil red, western blot, inmunohistoquímicas y PCR en tiempo real en el modelo *in vivo*. Además, tinción con oil red a la línea celular y citometría para evaluar la viabilidad, el estrés oxidativo y el potencial de membrana mitocondrial de las células, encontrando una disminución significativa en la acumulación de grasa en ambos modelos, lo que demuestra las propiedades del OBE100 como una excelente opción de tratamiento para la DM2 y la obesidad.

Palabras clave: obesidad, diabetes tipo 2, fitoterapéutico, triterpenos, hígado.

Abstract

Obesity is a nutritional problem, which in recent years has increased its prevalence nationally and internationally. Obesity leads to insulin resistance (IR) and this in turn has a causal role in the development of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Although there are multiple treatments for DM2, there are difficulties in adherence to treatment and multiple side effects, which is why natural products are an alternative that is gaining strength for the treatment of this disease. A crude extract obtained from *Eucalyptus tereticornis* leaves, called OBE100, has hypoglycemic and antidiabetic properties. Its main components are ursolic acid (UA), oleanolic acid (OA) and ursolic acid lactone (UAL). In this study, the effect of OBE100 on some metabolic alterations present in the liver of mice was evaluated, by administering an oral nanoformulation. Additionally, a model of fat accumulation in the HepG2 cell line was used. Oil red staining, western blot, immunohistochemistry, and real-time PCR were performed in the in vivo model. In addition, oil red staining of the cell line and cytometry to evaluate the viability, oxidative stress, and mitochondrial membrane potential of the cells, finding a significant decrease in fat accumulation in both models, which demonstrates the properties of OBE100 as an excellent treatment option for T2DM and obesity.

Keywords: obesity, type 2 diabetes, phytotherapeutic, triterpenes, liver.

Introducción

La obesidad es un problema nutricional, que en los últimos años ha incrementado su prevalencia a nivel nacional e internacional. Es considerada como la epidemia del siglo XXI, tanto por la magnitud como por las complicaciones que ocasiona: diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemias, hipertensión arterial, algunos tipos de cáncer, entre otros (Pajuelo et al., 2018). Según la Encuesta Nacional de Salud Nutricional de 2015, en Colombia existe una prevalencia en adultos de 18 a 64 años con sobrepeso de 37.7% y obesidad de 18.7%. Esto significa que la prevalencia de personas con exceso de peso en Colombia es del 56.4%, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública en el país (Minsalud, 2021).

En la obesidad se establece un estado inflamatorio crónico leve, donde se incrementan los niveles en plasma de ciertas citoquinas y ácidos grasos libres, se generan radicales libres e incrementa el estrés oxidativo. Todo lo anterior puede interrumpir las señales de traducción de la insulina, generando resistencia a la misma, lo que tendría un rol causal en el desarrollo de la DM2 (Pérez et al, 2011).

La DM2 es una de las enfermedades crónicas más comunes en casi todos los países y sigue aumentando en número e importancia, ya que el desarrollo económico y la urbanización conducen a estilos de vida cambiantes caracterizados por una menor actividad física y un aumento de la obesidad (Whiting et al, 2011). La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con DM2, además, el desarrollo de enfermedad renal entre pacientes con este padecimiento es común y aumenta drásticamente. En ese sentido, es necesario reducir la incidencia de la obesidad o cortar el circuito que conecta la obesidad con sus complicaciones, lo cual traería muchos beneficios para la población, ya que se estima que el 90% de los pacientes con DM2 presenta obesidad (Pagidipati, 2021).

En el mercado existen muchos medicamentos para el tratamiento de la DM2, uno de los más populares y utilizado en el mundo es la metformina, por ser muy eficaz para reducir la glucosa en sangre y por su bajo costo. Sin embargo, algunos de los efectos secundarios más comunes son de naturaleza gastrointestinal: diarrea, náuseas y/o malestar abdominal, suelen ser leves, transitorios y relacionados con la dosis, pero pueden ocurrir en hasta el 50% de los pacientes que

toman el medicamento. Además, cerca del 5% de las personas no pueden tolerar el fármaco, incluso en dosis bajas.

Otros medicamentos estimuladores de la liberación de insulina pueden producir hipoglucemia (niveles bajos de azúcar en sangre), aumento de peso o inclusive algunos pueden llevar al desarrollo de anemia. Además de las dificultades de adherencia que puede tener el paciente con cualquier medicamento, porque deben administrarse dosis continuas y por largos periodos de tiempo para garantizar su efectividad, lo cual es complejo porque muchos pacientes suspenden el tratamiento (Cross, J. 2006).

El eucalipto es conocido por ser una planta medicinal hipoglucemiante; tradicionalmente se han utilizado sus hojas como infusión para el tratamiento de la diabetes. Debido a estas propiedades, los grupos de investigación Genética Molecular (GENMOL), y Química Orgánica de Productos Naturales (QOPN) de la Universidad de Antioquia, han estudiado los efectos metabólicos de un extracto crudo obtenido a partir de las hojas del *Eucalyptus tereticornis*, compuesto principalmente por los siguientes triterpenos: ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO) y lactona del ácido ursólico (LAU). A este extracto crudo se le denominó OBE100.

Los ensayos realizados en un modelo de ratones obesos y con resistencia a la insulina (prediabéticos) han demostrado excelentes resultados con el tratamiento evidenciando su potencial como hipoglicemiante y antidiabético. El extracto OBE100 mejora la tolerancia a la glucosa y a la insulina en un modelo nutricional de DM2, efecto que se asocia, probablemente, con una reducción en la inflamación del tejido adiposo visceral, donde se ha observado la disminución de la expresión transcripcional de genes proinflamatorios (MCP-1, TNF, IL-1 e IL-6). Igualmente, a nivel hepático, reduce la expresión de ARNm de las enzimas glucosa 6 fosfatasa (G6Pase) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), lo que regularía negativamente la gluconeogénesis y consecuentemente contribuiría a reducir los niveles plasmáticos de glucosa (Guillen et al, 2015).

Sin embargo, la gran limitación es que, para obtener el efecto biológico deseado, la mezcla de triterpenos debe ser administrada por inyección intraperitoneal (IP). Este tipo de administración no sería la mejor opción a la hora de escalar a pruebas clínicas en pacientes, por lo tedioso que puede ser inyectar el medicamento de manera frecuente. Por este motivo, se desarrolló una nanoformulación oral, esperando obtener un efecto equivalente al de la administración IP. El OBE100 se encapsuló utilizando nanopartículas poliméricas buscando incrementar la estabilidad y

aumentar la biodisponibilidad del principio activo y de esta manera obtener el efecto biológico deseado.

En este proyecto se evaluó el efecto de una nanoformulación oral basada en el extracto OBE100 sobre algunas alteraciones metabólicas presentes en el hígado de ratones obesos y resistentes a la insulina (prediabéticos). Adicionalmente, se utilizó un modelo de acumulación de grasa en la línea celular HepG2, para tratar de identificar algunos mecanismos celulares involucrados en la reducción de la acumulación intracelular de grasa, después de los tratamientos con el extracto y sus fracciones individuales. Se identificó una disminución en la acumulación de grasa en el tejido hepático y en la línea celular, adicionalmente se evaluó los niveles de expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis y lipogénesis, además, la expresión de las proteínas ACC y AMPK para identificar su papel dentro del proceso de reversión de alteraciones metabólicas. Para el modelo *in vitro* se realizaron pruebas de citometría con el fin de evaluar la viabilidad, el estrés oxidativo y el potencial de membrana mitocondrial de la línea celular al finalizar los tratamientos. En conclusión, se encontró un buen efecto al emplear el tratamiento con OBE100 en ambos modelos.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un extracto natural rico en triterpenos obtenido a partir de hojas de *Eucalyptus tereticornis*, sobre la acumulación de grasa en modelos *in vivo* e *in vitro* de células hepáticas.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de una nanoformulación oral basada en el extracto natural, en un modelo *in vivo*, sobre hígado de ratones obesos y resistentes a la insulina.
- Evaluar la respuesta *in vitro* sobre la acumulación de grasa en la línea celular HepG2, tratadas con un extracto rico en triterpenos y sus fracciones individuales.

2 Marco teórico

2.1 Obesidad

La obesidad es uno de los problemas de salud pública más serios del siglo XXI. Se trata de un trastorno que comienza en la infancia, florece en la edad adulta y da origen a múltiples problemas de salud. Factores genéticos y moleculares, desencadenantes ambientales y conductuales, intervienen en su patogenia y condicionan su tratamiento de forma decisiva. En la obesidad se establece un estado inflamatorio crónico de bajo grado, que está relacionado directamente con el aumento del volumen del tejido adiposo. Se estima que más de mil millones de personas en todo el mundo son obesas: 650 millones de adultos, 340 millones de adolescentes y 39 millones de niños. La OMS estima que para 2025, aproximadamente 167 millones de personas (adultos y niños) se volverán menos saludables debido a que tendrán sobrepeso u obesidad y estas cifras continúan aumentando (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022)

La obesidad es una enfermedad compleja que se caracteriza por tener una cantidad excesiva de grasa corporal; lo que a simple vista es un problema estético, de igual manera es un trastorno médico que aumenta el riesgo de enfermedades y problemas de salud pública a nivel mundial. Un índice de masa corporal (IMC) superior a 25 se considera sobrepeso, y superior a 30, obesidad. El problema ha adquirido proporciones de epidemia; más de cuatro millones de personas mueren cada año por causas relacionadas con el sobrepeso o la obesidad, según estimaciones realizadas en 2017 por la OMS sobre la carga mundial de morbilidad (2022).

La obesidad se considera como un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (RI) la cual se caracteriza por una capacidad disminuida de esta para llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales. El aumento del tejido adiposo se ha relacionado con el aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias. Así, la mayor o menor expansibilidad o capacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos también parece jugar un papel importante en el desarrollo de la RI, ya que la superación de esta capacidad que es variable en cada caso, podría ser la causa del escape de lípidos a otros tejidos (hígado, músculo, células β del páncreas, entre otros), donde podrían interferir con la señal de insulina, lo cual, a su vez, incrementa el riesgo de que una persona adquiera DM2. El cuerpo requiere una mayor cantidad de insulina, para llevar la glucosa a las células que conforman dichos tejidos. Esto produce un sobre esfuerzo en las células β del páncreas

que termina debilitándolo y reduciendo la producción de insulina, lo que conduce a niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) (Aguilar, 2015).

Generalmente, la obesidad conlleva a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la cual es una afección en la que se acumula un exceso de grasa en el hígado, incluso si se consume poco o nada de alcohol. Los mecanismos implicados en la aparición de EHGNA y su desarrollo son la acumulación excesiva de lípidos en el hígado, incluida una vulnerabilidad genética expresada en una situación de trastorno metabólico y relacionada con una mayor ingesta de grasas (Lian et al., 2020). Esta afección aumenta el riesgo en el desarrollo de DM2 y hasta el momento, no hay un tratamiento específico para la EHGNA, por lo que se busca controlar sus factores de riesgo, al igual que otras afecciones médicas relacionadas como el colesterol alto y la presión arterial alta (Sheth, 2017).

2.2 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se produce cuando las células de los músculos, grasa e hígado no responden bien a la insulina y, por lo tanto, no pueden absorber la glucosa de la sangre fácilmente. Como resultado, el páncreas produce más insulina para ayudar a que la glucosa ingrese a las células. La prediabetes usualmente ocurre en personas que ya tienen cierta resistencia a la insulina o cuyas células β del páncreas no están produciendo suficiente insulina para mantener la glucosa en la sangre en el rango normal. Sin suficiente insulina, la glucosa adicional permanece en el torrente sanguíneo sin poder ingresar a las células. Esta condición si se mantiene con el tiempo puede desencadenar DM2. (Instituto Nacional de Diabetes [NIH], 2022).

La insulina circulante cuando se une a su receptor aumenta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, inhibe la producción hepática de glucosa, estimula la glucólisis (oxidación de la glucosa para obtener energía), la lipogénesis (síntesis de ácidos grasos), la glucogénesis (síntesis de glucosa), la síntesis de proteínas e inhibe la oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis (degradación de glucógeno a glucosa) y la proteólisis (degradación de proteínas) (Zamora et al, 2004). Sin embargo, el mecanismo principal de resistencia a la insulina en pacientes con DM2 es la alteración del transporte de glucosa que se caracteriza por defectos de la expresión de enzimas intracelulares y de la translocación de GLUT4 (una proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina), por cambios en la actividad del receptor de insulina, estas modificaciones

reducen la incorporación de glucosa en el tejido muscular y adiposo y promueven alteraciones a nivel metabólico.

En el caso de la obesidad, hay un aumento del nivel de ácidos grasos libres provenientes de la lipólisis en el tejido adiposo, este aumento de los ácidos grasos produce resistencia a la acción de la insulina a nivel muscular, lo que se traduce en una mayor secreción de insulina en las células β como mecanismo compensatorio a la resistencia periférica (Araya, 2003).

2.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La obesidad juega un papel transcendental en el desarrollo de DM2. Aproximadamente del 90 al 95% de las personas que presentan diabetes tienen el tipo 2. En comparación con el tipo 1 que la presentan aproximadamente entre 5 al 10% de las personas que tienen diabetes o la gestacional que sucede durante el embarazo (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2022). Las estadísticas mundiales permiten afirmar que la prevalencia de la DM2 sigue en aumento y afecta principalmente a la población más desfavorecida socialmente. Debido a que, este incremento del desarrollo de la enfermedad se relaciona con países de ingresos medios y bajos (International Diabetes Federation [IDF], 2013).

La enfermedad puede ocasionarse por dos factores: el primero de ellos, es la resistencia a la insulina, donde la hormona es incapaz de suprimir la producción hepática de glucosa y promover la correcta captación de glucosa por los tejidos periféricos (DM2), y la segunda cuando las células β del páncreas no realizan correctamente su función de producir la insulina (DM1). De esa manera, hay una disminución progresiva en la acción de la insulina seguida de que las células β del páncreas no puedan compensar los niveles de la hormona (Muñoz, 2006).

Metabólicamente la DM2 inicia con la resistencia a la insulina la cual se ve mayormente influenciada por los hábitos de vida poco saludables: como el sedentarismo y la mala alimentación, que están directamente asociados con cambios metabólicos generando el sobrepeso y la obesidad. Luego, la RI causa un fallo en la captación de glucosa estimulada por insulina en músculo y en el tejido adiposo, la resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina ocasionan un aumento en la liberación de ácidos grasos, los cuales, a su vez, atenúan la capacidad de la insulina para inhibir la producción hepática de glucosa, generando hiperglucemia. Cuando se llega a este punto, las células β del páncreas intentan compensar la RI incrementando la secreción de insulina, lo cual agrava el

problema ya que las células β van perdiendo su capacidad y dejan de responder a las altas concentraciones de glucosa. De esta manera, se conduce a un estado de deterioro de la homeostasis de la glucosa apareciendo una intolerancia a la misma. Se estima que cada año, aproximadamente entre un 5 a 10% de los pacientes intolerantes a la glucosa progresan hacia diabetes, que continúa empeorando mientras la resistencia a la insulina incrementa, llegando a situaciones en las que requieren mayores dosis de insulina para sobrevivir (Muñoz, 2006).

2.4 Tratamientos para la Diabetes mellitus tipo 2

Entre los medicamentos más utilizados para tratar la DM2 se encuentra la metformina, un antidiabético oral que se postuló como primera opción de tratamiento de esta enfermedad, por el beneficio de aumentar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, con poco riesgo de hipoglucemia y reducción discreta del peso. Adicionalmente, se ha demostrado en ensayos clínicos, la reducción del riesgo de complicaciones macrovasculares que son la mayor causa de morbimortalidad en el paciente con DM2. La metformina actúa mediante la reducción de la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) y los mecanismos moleculares de estos efectos parecieran ser múltiples, donde se evidencia que a nivel celular la mitocondria ocupa un papel clave, ya que se encarga de producir la energía para todo el organismo y en condiciones de DM2 y obesidad se genera un estrés oxidativo que no permite que la mitocondria funcione correctamente (Vargas, 2019).

Dentro de los mecanismos de acción de la metformina se encuentran la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un complejo enzimático que se activa con el aumento de la relación AMP-ATP, así es considerado un detector de energía celular el cual ayuda al balance energético de la célula y el consumo de calorías. Diversos estudios para el tratamiento de la DM2 incluyen este complejo enzimático porque disminuye los procesos anabólicos e incrementa los catabólicos. La AMPK se encuentra en la mayoría de los órganos como el hígado, los músculos y células adiposas. También, puede ser activada en el cerebro dando la sensación de hambre debido a la pérdida de energía en el cuerpo (Adam et al, 2015). Además, participa en procesos de producción de energía como la glucólisis, la oxidación de lípidos y la gluconeogénesis. De igual manera, la AMPK cuenta con la capacidad para tratar trastornos metabólicos y enfermedades como la DM2 (Bering, 2021).

Además de la metformina, otros medicamentos utilizados para el tratamiento de la DM2 incluyen la insulina, sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de la α glucosidasa, terapia basada en la hormona incretina e inhibidores del cotransportador de la glucosa dependientes de sodio (Donath. 2014). Sin embargo, los efectos adversos de dichos tratamientos reducen la satisfacción y calidad de vida de los pacientes, que no se adhieren correctamente a la terapia o la abandonan. Dentro de los efectos secundarios más comunes se encuentran los problemas gastrointestinales cuando se usa la metformina. Al igual que la hipoglicemia y el aumento de peso con el tratamiento que incluye insulina. Las sulfonilureas o tiazolidinedionas que pueden causar osteoporosis y finalmente los pacientes tratados con inhibidores del cotransportador de la glucosa dependientes de sodio han manifestado infecciones en sus genitales (Donath. 2014).

Como alternativa a este tipo de efectos adversos, los productos naturales se han convertido en una alternativa en el mercado, debido a sus principios activos que son de gran interés para el desarrollo de nuevos medicamentos, principalmente porque han demostrado efectos terapéuticos sobre diversas enfermedades. Los grupos GENMOL y QOPN, desde hace varios años vienen trabajado en la identificación de compuestos químicos obtenidos a partir de plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional colombiana, como hipoglucemiantes y antidiabéticas. Uno de los hallazgos más relevantes y novedosos ha sido la identificación de una fracción estandarizada de triterpenos, la cual se ha denominado OBE100 y que es extraída a partir de hojas de *Eucalyptus tereticornis*.

Los compuestos químicos mayoritarios identificados en esta fracción cruda, rica en triterpenos, fueron; ácido ursólico (AU - 47,6%), ácido oleanólico (AO - 14,1%) y lactona del ácido ursólico (LAU - 16,3%) (Ceballos et al, 2018). Adicionalmente, en la fracción cruda, están presente una serie de compuestos químicos que no han sido identificados y que representan el 22% de la masa de la fracción. La mezcla de estos 3 componentes principales ha demostrado un efecto en el catabolismo de los ácidos grasos, tanto a nivel hepático, como a nivel del adipocito. Igualmente, confirma la actividad anti-inflamatoria, establecida en el tejido adiposo de ratones obesos, lo cual podría contribuir a cortar el circuito entre inflamación crónica leve y resistencia a la insulina (Guillen et al, 2015).

En el desarrollo de nuevos medicamentos o en el estudio de enfermedades, las líneas celulares son de gran importancia, ya que permiten realizar estudios *in vitro* bajo condiciones

controladas en las cuales sea posible tener una aproximación a la hora de escalar hacia un modelo *in vivo*. Las células HepG2 son un sistema modelo *in vitro* adecuado para el estudio de hepatocitos humanos, debido a su alto grado de diferenciación morfológica. Son un modelo apropiado para estudiar la dinámica intracelular de las proteínas y lípidos en hepatocitos humanos, lo cual puede ser importante para el estudio de enfermedades hepáticas humanas (Moscato et al, 2015).

El grupo de investigación GENMOL ha realizado estudios encaminados a valorar el efecto hipoglucemiante y antidiabético de un extracto de hojas de *Eucalyptus tereticornis* donde han encontrado que se aumenta la captación de glucosa en la línea celular muscular de ratón C2C12 resistentes a insulina. Además, este extracto tiene la capacidad de inhibir la producción de glucosa en la línea celular de células hepáticas humanas HepG2 resistentes a insulina (Guillen et al, 2015).

En otro de los estudios, se encontró que el tratamiento con OBE100 administrado vía inyección intraperitoneal (IP) sobre un modelo de ratón prediabético, aumentó la tolerancia a la glucosa y se redujeron: el peso corporal del ratón, el contenido de grasa hepática y adiposa, y los niveles de lípidos en plasma. Además, el tratamiento con OBE100 también demostró una disminución de los niveles de ARNm hepático de PPARA, CPT1A y SERBP1, y en el tejido adiposo visceral, redujo la expresión de PPARA y ACACA y aumentó la expresión de UCP1 (Acín et al, 2021). A pesar de que estos estudios demostraron excelentes resultados, la administración del OBE100 por vía IP no sería un método muy cómodo o con buena adherencia para el paciente; por lo cual se requiere de una formulación oral. Para ello, investigadores del grupo se apoyaron en el uso de la nanotecnología para encapsular el OBE100 en nanopartículas poliméricas y de esa manera evitar su degradación en el estómago que es altamente ácido. La nanoencapsulación permite aumentar la biodisponibilidad del principio activo y obtener un efecto equivalente a la administración intraperitoneal, para lo cual este estudio se centrará en la comparación de ambas vías de administración y su efecto sobre el hígado.

3 Metodología

3.1 Obtención de los triterpenos

Las hojas de *Eucalypto tereticornis* se colectaron en Valledupar, Colombia en 2011. Las hojas secas se extrajeron mediante una separación líquido-líquido con hexano: metanol: agua 4: 3: 1 (v / v). La fase orgánica se recogió y se filtró al vacío. El precipitado formado se recogió, almacenó y fue denominado OBE100. Los principales compuestos de OBE100 fueron identificados por resonancia magnética nuclear (RMN), encontrando en esta fracción cruda, rica en triterpenos: ácido ursólico (AU - 47,6%), ácido oleanólico (AO - 14,1%) y lactona del ácido ursólico (LAU - 16,3%).

El AU y el AO se obtuvieron comercialmente de la compañía Sigma-Aldrich (Ref: 1707770 y Ref: 42515 respectivamente). La LAU no se encuentra disponible comercialmente, por lo tanto, se obtuvo en colaboración con el grupo de Química orgánica de productos naturales de la Universidad de Antioquia. Las hojas de eucalypto se secaron y licuaron con 100 ml de metanol por cada 100 g de material vegetal. La mezcla heterogénea se maceró por 7 días consecutivos, agitándola todos los días. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró y el material sólido se descartó. Posteriormente, de la solución líquida de metanol se extrajeron las grasas y clorofilas con hexano en un embudo de separación y mediante la agitación vigorosa se da la formación de dos fases de diferentes densidades. La solución metanólica se concentró en un rotoevaporador (Heidolph-laborota 4001) obteniéndose así la fracción con la LAU.

3.2 Preparación de la nanoformulación

El OBE100 fue encapsulado en nanovehículos poliméricos orgánicos biocompatibles y biodegradables utilizando ácido poliláctico- co -glicólico (PLGA) con tocoferol (vitamina E) utilizado como surfactante, ambos en una proporción 50:50. Luego de la conjugación y ensamble del polímero se realizó la formación de nanopartículas para encapsular OBE100 usando la técnica de Emulsión – evaporación de solvente. Este procedimiento se realizó en conjunto con el grupo de investigación de nanobioingeniería Max Planck, de manera que el nanoencapsulado contenga una carga adecuada del componente terapéutico (triterpenos) y cuya liberación en el sitio específico de acción, se lleve a cabo de forma controlada.

3.3 Modelo *in vivo*

Se evaluaron las actividades metabólicas *in vivo* en un modelo de ratón obeso inducido por dieta, estos ratones son resistentes a la insulina, levemente hiperglucémicos y dislipidémicos. Se utilizaron ratones macho C57BL6/J de más de 4 semanas de edad, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en seis grupos para este estudio (5 a 7 ratones en cada grupo). Un grupo de control se alimentó con una dieta normal (14% grasa, 54% carbohidratos y 32% proteína). Los otros 5 grupos se alimentaron con una dieta rica en grasas (HFD: con 42% grasas, 42% carbohidratos y 15% proteínas) durante 10 semanas.

Para llevar a cabo los tratamientos, la emulsión de OBE100 obtenida se diluyó en PBS para la administración por vía intraperitoneal y la encapsulación en nanopartículas poliméricas se realizó por el grupo de investigación en nanobioingeniería Max Planck de la Universidad de Antioquia por el método Emulsión - Evaporación del solvente. Posteriormente, se realizó el promedio de peso de los animales por cada grupo para llevar a cabo la formulación del fitoterapéutico OBE100.

En investigaciones previas realizadas en el Grupo de investigación, se identificó que la administración intraperitoneal de 300 mg de OBE100 por Kg de peso del animal, presentaba el efecto biológico deseado, en la reversión de las anormalidades metabólicas del ratón obeso y resistente a la insulina. En el proceso de nanoencapsulación, la máxima cantidad presente de OBE100 en un volumen de 300 uL de suspensión de nanopartícula fue de 214 mg. En ese sentido, con el fin de poder comparar la vía de administración IP y oral se utilizó una dosis de 214 mg de OE100 por Kg peso del animal en ambos casos, y la dosis de IP 300 como control positivo. Además, una dosis de nanopartículas solas, sin el fitoterapéutico para evaluar si el nanovehículo causaba algún efecto por sí solo. Se suministraron 15 dosis intraperitoneales u orales cada 48 horas (**Tabla 1**). Todos los estudios en animales fueron aprobados por el comité Institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Antioquia (Protocolo número 65).

3.3.1 Pruebas fisiológicas del metabolismo de carbohidratos

Una vez transcurridas las 10 semanas los ratones alimentados con HFD consiguieron un peso igual o mayor a 40 gramos. Alcanzado este peso y después de un ayuno de 6 horas, investigadores del grupo tomaron muestras de sangre de la cola de los ratones para medir la concentración de glucosa en sangre de todos grupos, utilizando el glucómetro Accu-Chek (Roche).

Además, realizaron una prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal (IPGTT) suministrando una carga de glucosa de 2 g/Kg por peso de ratón vía intraperitoneal (IP). Midieron los niveles de glucosa a los 0, 30, 60 y 120 min. Una semana después se realizaron la prueba de tolerancia a la insulina vía intraperitoneal (ITT), utilizando la insulina comercial de acción rápida (Humulin, Lilly) a 0,75 U/Kg y así, midieron los niveles de glucosa a los 0, 15, 30 y 60 min. Los tiempos cero fueron medidos justo antes de inyectar la glucosa o la insulina.

Tabla 1

Grupos de ratones experimentales y tratamiento suministrado

Grupo	Alimentación	Tratamiento
Control (Chow)	Dieta normal	PBS como placebo
Dieta rica en grasa (HFD)	Dieta rica en grasa	PBS como placebo
Intraperitoneal 300	Dieta rica en grasa	Intraperitoneal 300 mg/Kg (IP300)
Intraperitoneal 214	Dieta rica en grasa	Intraperitoneal 214 mg/Kg (IP214)
Nanopartículas 214	Dieta rica en grasa	Nanopartículas 214 mg/Kg (NP214)
Nanopartículas solas	Dieta rica en grasa	Nanopartículas sin Fitoterapéutico

3.3.2 Tinción del tejido hepático con Oil red

Para la detección de lípidos neutros se utilizó el kit de tinción de lípidos Oil Red-O (C26H24N4O). Oil Red-O es un colorante de diazol soluble en grasa que tiñe los lípidos neutros y los ésteres de colesterilo pero no las membranas biológicas (Mehlem et al., 2013). Después de realizados los tratamientos, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los hígados. Se cortaron secciones de tejido fresco o congelado en OCT entre 10-12 μm de espesor en criostato y se realizó el montaje de la muestra en portaobjetos electrocargado (procedimiento realizado por el Grupo de Neurociencias de Antioquia, GNA). Se adicionaron 500 μL de solución de Oil Red y se incubó a RT durante 10 min, luego se lavó con agua del grifo y se adquirieron las fotografías en el microscopio a 40x, las cuales fueron cuantificadas en el software ImageJ.

3.3.3 Extracción de ARN y PCR en tiempo real.

El ARN total del tejido hepático se extrajo utilizando el kit Direct-zol RNA Miniprep siguiendo el protocolo del fabricante (Zymo Reserch) y fue cuantificado en el NanoDrop (Thermo Scientific). La reacción de transcripción inversa se realizó con 500 ng de ARN total, 50 ng/ μL de hexámeros aleatorios, dNTP Mix 100 mM, Buffer 10X, 40 U/ l de RNaseOut y 200 U/l de SuperScript III RT (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante.

Se realizaron análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con 50 ng de cDNA y cebadores sentido y antisentido 100 nM (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE. UU.) (**Tabla 2**) en un volumen de reacción final de 12 µl utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). El programa de ciclos térmicos fue de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Los resultados se normalizaron a los niveles de expresión de ciclofilina (línea celular de ratón).

Tabla 2

Secuencias de primers utilizados para qRT-PCR de hígado de ratones

Gen	Nombre	Secuencia	TM
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	F 5'- ATCTTTGGTGGCCGTAGACCT -3'	60°C
		R 5'- GCCAGTGGGCCAGGTATTT -3'	
G6Pase	Glucosa-6-fosfatasa	F 5'- TTACCAAGACTCCCAGGACTG -3'	60°C
		R 5'- GAGCTGTTGCTGTAGTAGTCG -3'	
FAS	Ligando FAS	F 5'- CCCTTGATGAAGAGGGATCA-3'	60°C
		R 5'- ACTCCACAGGTGGGAACAAG-3'	
PPR α	Receptor activado por proliferador de peroxisomas	F 5'- TGTCGAATATGTGGGGACAA-3'	60°C
		R 5'- AATCTTGCAGCTCCGATCAC-3'	
CPT1	carnitina palmitoiltransferasa 1a	F 5'- AGATCAATCGGACCCTAGACAC-3'	60°C
		R 5'- CAGCGAGTAGCGCATAGTCA-3'	
ACC	Acetil coA carboxilasa	F 5'- GCCTCTTCCTGACAAACGAG-3'	60°C
		R 5'- TGACTGCCGAAACATCTCTG-3'	
Ciclofilina	Gen constitutivo	F 5'-GGAGATGGCACAGGAGGAA -3'	60°C
		R 5'-GTAGTGCTTCAGCTTGAAGTTCTCAT -3'	

3.3.4 Ensayos de inmunohistoquímicas

Para teñir los tejidos y permitir la detección de proteínas de interés, se empleó la técnica de inmunohistoquímica. Al finalizar el sacrificio de los animales, los órganos fueron fijados en PBS con Formol al 10% y se realizó el proceso de deshidratación e inclusión en parafina de las muestras (grupo de neurociencias) Se obtuvieron los bloques y se procedió a realizar secciones transversales consecutivas de 5-7 µm de grosor en micrótopo, para realizar las diferentes tinciones, cada sección se monta sobre un portaobjetos electrocargado, a fin de minimizar la pérdida de tejido. Se realizó la desparafinización y el bloque para reducir la tinción de fondo inespecífica debida a la actividad

de peroxidasa endógena, incubando la muestra en una solución de H₂O₂ al 6% durante 5 min y se realizó un lavado con TBST (Tris buffer salino con tween 20) a 1X.

Luego, se realizó la recuperación antigénica y la tinción adicionando el anticuerpo primario diluido ACC (1/200), pACC (1/800), AMPK (1/500) y pAMPK (1/300), durante 1 hora en cámara húmeda. Para el revelado se añadieron 100 µl de la solución de cromógeno DAB Quanto con el sustrato DAB Quanto y se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina. Finalmente se procedió con el montaje: colocando una gota de medio de montaje permanente (CONSUL-MOUNT) y sobre éste un cubreobjetos y las observaciones se realizaron en microscopio óptico tomando fotos de 5 campos por cada placa en 40x, además se toma una foto del tejido completo en scanner (Ventana DP200, Roche)

3.3.5 Extracción de proteínas y Western blot

La extracción de proteínas del hígado se llevó a cabo empleando nitrógeno líquido y RIPA como buffer de lisis compuesto por: Tris-HCl a 50mM, NP-40 al 1%, SDS al 0.1%, NaCl a 150mM y EDTA 2mM. La proteína total extraída fue cuantificada con el método de ácido bicinónico (BCA) y midiendo la absorbancia a 562 nm en un multilector de microplatos Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 7% (ACC y pACC) o al 10% (AMPK y pAMPK), luego, se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en Buffer TBST. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios ACC, pACC, AMPK, pAMPK (1:1000), durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las membranas fueron lavadas 5 veces con TBST y se incubaron con anticuerpo secundario (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se utilizó un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico PLUS de ThermoFisher) para ser reveladas en un fotodocumentador Syngene G: BOX.

3.4 Modelo in vitro

Las células HepG2 (ATCC® HB8065) de ATCC® son un modelo in vitro adecuado y económico para el estudio de la biología de los hepatocitos humanos. Estas células se mantienen en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 5.5 mM de glucosa, suplementado con

suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina al 1 % y 0,25 µg/mL de Fungizone® (SigmaAldrich) a 37 °C en un Incubadora de CO₂ al 5%.

3.4.1 Inducción de la acumulación de ácidos grasos en las células HepG2

Para implementar un modelo *in vitro*, que permita estudiar el efecto de tratamientos potenciales en la reversión de la acumulación de grasas neutras en los hepatocitos, la línea celular HepG2 deben cargarse con grasa (Triacilgliceroles). Las células fueron cultivadas en frascos de 75 mL, hasta alcanzar una confluencia mayor al 70%. Se sirvieron en platos experimentales utilizando 3 pozos por cada grupo, donde se dejaron crecer 24 horas, luego se cambió el medio para inducir la acumulación de ácidos grasos empleando una relación ácido oleico y ácido palmítico 2:1 respectivamente, con 1% de albúmina de suero bovino (BSA), diluida en DMEM con agitación 2h a 37°C. A los pozos de control únicamente se añadió DMEM con BSA al 1% sin ácidos grasos.

Las células se dejaron en incubación durante 48 horas para que se llevara a cabo la acumulación de ácidos grasos. Transcurridas las 48 horas, se retiró el medio y se adicionaron las soluciones con los tratamientos (**Tabla 3**), las cuales se incubaron durante 72 horas.

Tabla 3

Tratamientos realizados a las células HepG2

Grupo	Tratamiento
Control	DMEM + BSA 1%
Control de ácidos grasos	DMEM + BSA 1%
Metformina	DMEM + BSA 1% + Metformina 5mM
Aicar	DMEM + BSA 1% + Aicar 250 µM
OBE100	DMEM + BSA 1% + 100 µg/mL
Acido ursólico (AU)	DMEM + BSA 1% + AU 47.6 µg/mL
Ácido oleanolico (AO)	DMEM + BSA 1% + AO 14.4 µg/mL
Lactona del ácido ursólico (LAU)	DMEM + BSA 1% + LAU 16.3 µg/mL

3.4.2 Medición *in vitro* de la concentración de ácidos grasos en células HepG2

Al finalizar las 72 horas de tratamiento de las células, se llevó a cabo la tinción de los ácidos grasos con oil red. Inicialmente, se eliminó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se adicionaron 500 uL de formol al 10% a cada pozo del plato (se trabajó con platos de 24 pozos para permitir mayor área y que las células se expandieran mejor). El formol se deja mínimo 1 hora y máximo 1 semana. Se lavó con ddH₂O 2 veces y con isopropanol al 60%. Luego se realizó la

tinción adicionando 350 uL de oil red y agua en una proporción 6:4 respectivamente. Transcurridos 10 minutos se lavó 4 veces con agua destilada y se adicionó isopropanol al 100%. Finalmente se midió la absorbancia a 500 nm en un multilector de microplatos Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). Una mayor intensidad de rojo representa una mayor acumulación intracelular de grasa (triacilgliceroles).

3.4.3 Evaluación in vitro de la viabilidad celular

Para evaluar si la carga de grasa o los diferentes tratamiento tienen algún impacto en la viabilidad celular, se utilizó el método con yoduro de propidio (PI). Este es un marcador fluorescente que permite teñir las células debido a que se intercala entre las dobles cadenas de ácidos nucleicos, dando una fluorescencia roja cuando se excita con luz azul. La molécula de yoduro de propidio es incapaz de atravesar la membrana celular intacta; sin embargo, cuando las células se mueren, la integridad de la membrana falla y dicha molécula puede entrar y teñir los ácidos nucleicos (Ormerod, 1990), formando un complejo fluorescente. Se utilizaron las células HepG2 72 horas después de finalizar los tratamientos como se describió anteriormente en la **Tabla 3**. Las células se resuspendieron en PBS con SFB al 4% y PI a 0.7 ug/uL, se incubaron durante 10 minutos y se analizaron usando el citómetro BD LSRFortessa™ TM (BD).

3.4.4 Determinación in vitro del estrés oxidativo en la línea celular HepG2

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos en la generación y/o control de las especies reactivas del oxígeno (ROS), se utilizó como marcador Dihidrorodamina 123 (DHR). DHR123 es una molécula sin carga y no fluorescente que puede difundirse pasivamente a través de la membrana celular. Es un indicador de ROS por su capacidad de oxidarse a la rodamina catiónica 123 que se localiza en las mitocondrias y exhibe fluorescencia verde. Se utilizaron las células HepG2 72 horas después de finalizar los tratamientos como se describió anteriormente en la **Tabla 3**. Como control positivo se usaron hepatocitos cargados de grasa tratados con 80 nmol/L de forbol-12-miristato-13- acetato (PMA) un activador farmacológico de la NADPH oxidasa (Betancur, 2019). Las células se resuspendieron en PBS con 4% de SFB y DHR al 0.001 mM, se incubaron durante 10 minutos y se analizaron usando el citómetro BD LSRFortessa™ TM (BD) (excitación 488 nm, emisión 530 nm).

3.4.5 Evaluación in vitro del potencial de membrana de la línea celular HepG2

Para evaluar el proceso oxidativo en la mitocondria, se utilizó MitoTracker (MT) Deep Red (Invitrogen). Este es un fluorocromo que permite teñir las mitocondrias de células vivas, y su acumulación depende del potencial de membrana de la célula (proceso oxidativo). Se utilizaron las células HepG2 72 horas después de finalizar los tratamientos como se describió anteriormente en la **Tabla 3**. Las células se resuspendieron en PBS con 4% de SFB y MT a 0.7 ug/uL, se incubaron durante 10 minutos y se analizaron usando el citómetro BD LSRFortessa TM (BD).

3.5 Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias como media \pm error estándar. Las comparaciones entre grupos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido por una prueba post hoc de Dunnett de comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el software estadístico Prism 4 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.)

4 Resultados

4.1 Modelo in vivo

4.1.1 Efecto del OBE100 sobre el peso de los animales y el metabolismo de carbohidratos

Se identificó una reducción en el peso corporal de los ratones a los que se les administró la nanoformulación con 214 mg/kg de OBE100, los cuales muestran una diferencia en comparación con el peso tanto de los animales HFD, como a los que se le administraron las nanopartículas solas (NP) (**Figura 1A**). Además, se presentan resultados similares respecto al tratamiento de la misma dosis (214 mg de OBE100 /Kg de peso del animal) pero administrado por vía IP y al control positivo que es el tratamiento de 300mg/kg de OBE100 vía IP.

Los resultados en el metabolismo de carbohidratos fueron analizados como área total bajo la curva (AUC) entre los 0 y 120 min, para la prueba IPGTT y entre los 0 y 60 min, para la prueba ITT. Después de 5 semanas con los diferentes tratamientos (15 dosis) se observa que los ratones alimentados con HFD y tratados con IP 300 y IP 214, son más tolerantes a la glucosa, que los ratones alimentados con HFD que no recibieron tratamiento (**Figura 1B y 1D**). Resultados similares se observan, cuando se analiza el AUC, generada por las pruebas ITT (**Figura 1C y 1E**).

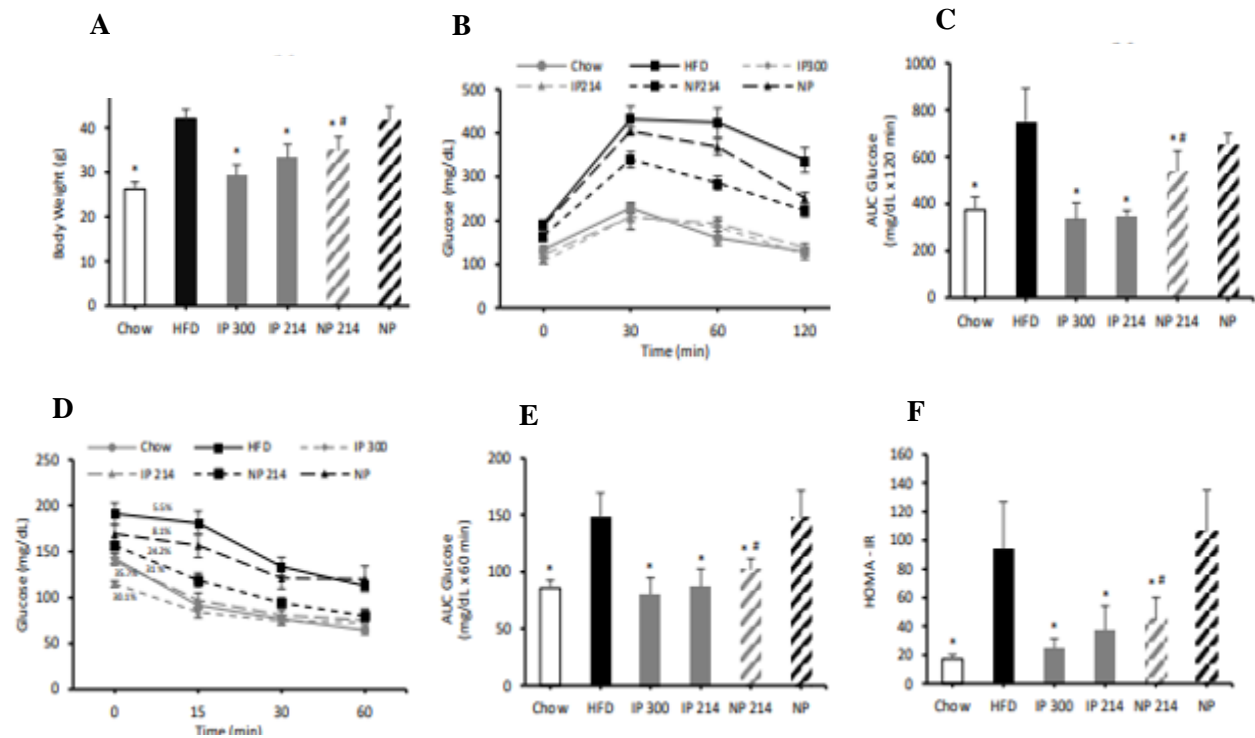
Los animales tratados con la nanoformulación (NP 214) son más tolerantes a la glucosa y a la insulina después de recibir 15 dosis orales, pero el efecto no es tan pronunciado como el observado con la administración IP del extracto OBE 100. Por otro lado, la administración de NP solas no muestra una diferencia significativa con el grupo control alimentado con HFD, ni en el peso corporal, ni en las pruebas de IPGTT e ITT. Sin embargo, se evidencia una diferencia entre los animales tratados con NP 214 y con las nanopartículas solas (NP), lo cual demuestra que las nanopartículas solas no tienen efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos y que el efecto identificado con el tratamiento de NP 214, se debe exclusivamente al efecto de OBE100.

En la **Figura 1D** se observa una reducción del 35,7% de glucosa en los ratones controles alimentados con dieta normal mientras que los ratones alimentados con HFD, la glucosa se redujo solo un 5.5% después de 15 min de la administración de insulina, un 30,1% para los tratados con IP 300; 31 % para los tratados con IP 214; 24,2% para los tratados con NP 214 y solo un 8,1% para los tratados con las nanopartículas solas (NP). En cuanto al índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en los animales tratados con la nanoformulación se observó un índice bajo respecto

al grupo alimentado con HFD, en los cuales se presenta un índice muy alto por lo que no hay una homeostasis entre la relación de glucosa e insulina. Además, al grupo al que se le suministró las nanopartículas solas presenta un índice alta en relación con el tratamiento oral y a los intraperitoneales, lo cual indica que se reduce la resistencia a la insulina por el efecto del OBE100 y no de la nanopartícula sola (**Figura 1F**).

Figura 1

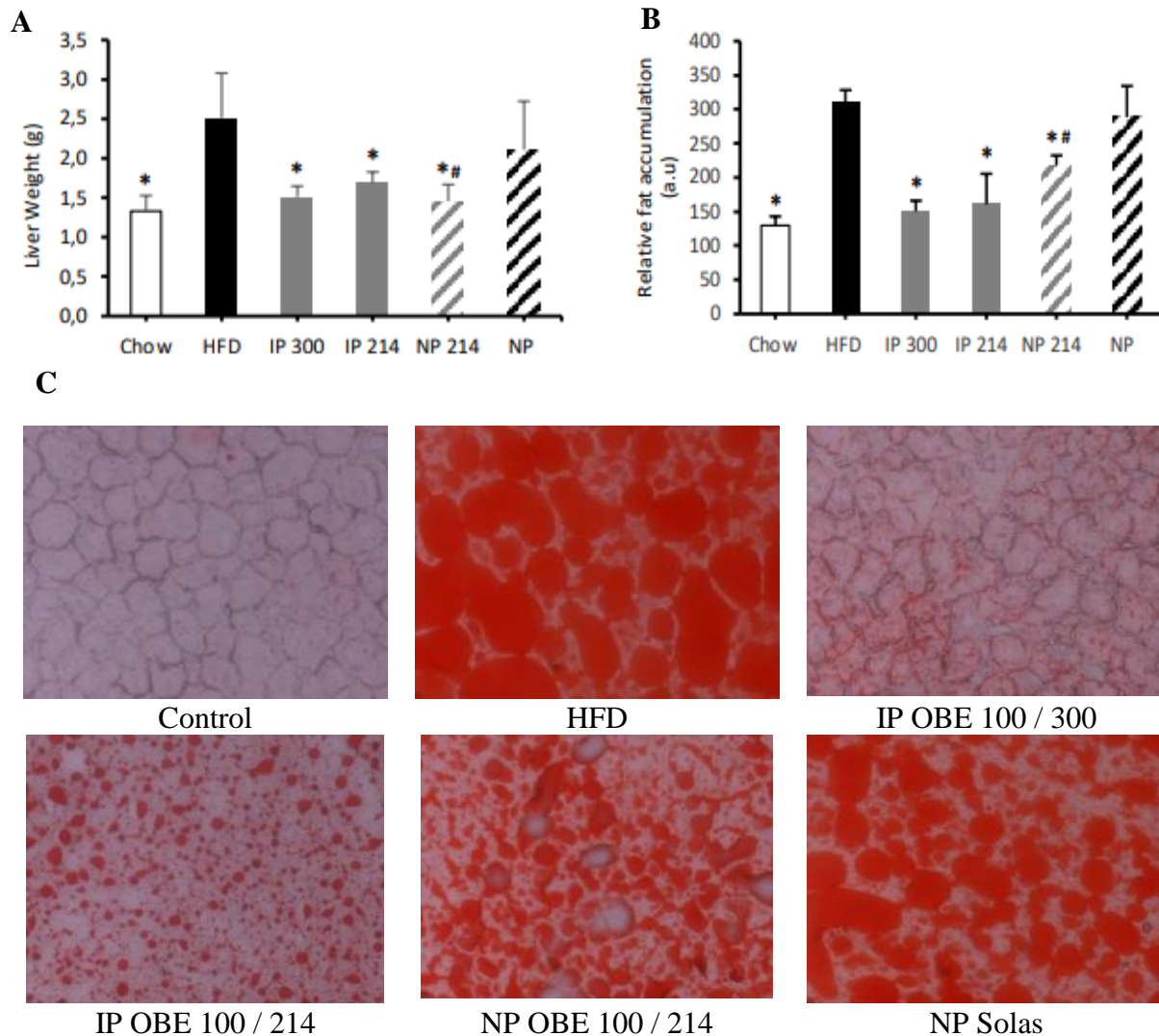
Evaluación del peso de los animales y el metabolismo de carbohidratos



(A) Evaluación del peso corporal en animales pre-diabéticos tratados con la administración intraperitoneal de 300 y 214 mg/kg de OBE100 (IP300 e IP214), administración oral de la nanoformulación con 214 mg/kg de OBE 100 (NP 214) y nanopartículas solas (NP). (B) Pruebas de tolerancia a la glucosa (IPGTT) durante 120 minutos y (D) Pruebas de tolerancia a la insulina (ITT) durante 60 minutos, después de la administración de 15 dosis de tratamiento en ambos casos. (C y E) Área bajo la curva (AUC), calculada a partir de los datos obtenidos en (B y D). (F) Pruebas de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en animales pre-diabéticos con los diferentes tratamientos. HFD: High Fat Diet (Dieta Rica en Grasa). *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnet de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$. Se compararon todos los grupos con el grupo alimentado con HFD (*) El grupo de NP 214 con el grupo de NP (#).

Figura 2

Efecto del OBE100 sobre el peso y la acumulación de ácidos grasos del tejido hepático



(A) Peso del hígado de los animales. (B) Área de tinción con oil red del hígado de los animales. (C) Imágenes de la tinción con oil red del hígado de los ratones pre-diabéticos tratados con la administración intraperitoneal de 300 y 214 mg/kg de OBE100 (IP300 e IP214), administración oral de la nanoformulación con 214 mg/kg de OBE 100 (NP 214) y nanopartículas solas (NP). HFD: High Fat Diet (Dieta Rica en Grasa). *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnett de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$. Se compararon todos los grupos con el grupo alimentado con HFD (*). El grupo de NP 214 con el grupo de NP (#).

4.1.2 Efecto del OBE100 sobre la acumulación de ácidos grasos del tejido hepático.

Al evaluar los pesos del hígado de cada grupo experimental de los animales hay una disminución de este en los ratones tratados con las nanopartículas 214 respecto a los animales alimentados con HFD (**Figura 2A**). Además, en las **Figuras 2C** se observa de manera cualitativa que los animales alimentados con HFD incrementan significativamente el contenido de grasa neutra (TAG) al interior del hepatocito, y a su vez este efecto se observa cuantitativamente (**Figura 2B**). La administración de 15 dosis de IP 300, IP 214 y NP 214, reducen significativamente el contenido de grasa. Resultados que están en concordancia con una reducción significativa del peso hepático. El efecto visto después del tratamiento con NP 214, es exclusivo del extracto OBE 100, debido a que los niveles de grasa intracelular son significativamente menores que los identificados en los animales tratados con NP. Adicionalmente, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos HFD y NP (**Figuras 2A y 2B**).

4.1.3 Efecto del OBE100 sobre la expresión de genes gluconeogénicos y lipogénicos.

Al analizar los niveles de expresión de los genes involucrados en la gluconeogénesis: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G6Pase), la administración del tratamiento con las 15 dosis orales de las nanopartículas NP214 reduce significativamente la expresión de dichos genes, contribuyendo en parte, a la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Además, se pudo identificar un efecto similar al obtenido en los animales a los que se les administró el extracto IP. Al comparar los niveles relativos de expresión de los genes PEPCK y G6Pase en el grupo de animales tratados con NP214, se identificaron niveles más bajos que los encontrados en el grupo de animales tratados con las NP solas (**Figuras 3A y 3B**).

En cuanto a los niveles de expresión de los genes de las enzimas acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS); involucrados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos; se identificó una reducción en los animales tratados con las NP 214, muy similar al comportamiento de los tratamientos suministrados vía IP. Nuevamente, se identificó una expresión más baja en los animales tratados con NP214, cuando se comparan con los niveles de expresión en los animales tratados con las NP solas (**Figuras 3C y 3D**)

La ACC fosforilada queda inactiva, lo cual aumenta la activación de la malonil CoA, que a su vez desinhibe a la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1). Con ello se incrementa el ingreso de

ácidos grasos a la mitocondria y aumenta la oxidación de ácidos grasos para generar ATP.

Asimismo, el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR α) al igual que CPT1 es un gen lipolítico involucrados en el catabolismo de ácidos grasos, en este caso el tratamiento con NP214 no alteró significativamente los niveles de expresión de ambos genes. Por su parte la administración IP 214 e IP300 inhiben la expresión de estos genes, cuando se compara con los identificados en los animales controles alimentados con HFD (**Figuras 3E y 3F**). El hecho que el tratamiento con NP 214 no module la expresión de los genes Cpt1a y PPAR α , como lo hace la administración IP, puede deberse a que la liberación del extracto OBE 100 de las NP en el tracto gastrointestinal se hace de manera diferencial, de tal manera que las proporciones de los componentes mayoritarios es diferente a la identificada en el OBE100. 2. También se desconoce el efecto de la interacción de las NP con el alimento, de tal manera que afecte la liberación y absorción de los componentes mayoritarios del OBE100.

4.1.4 Efecto del OBE100 sobre la expresión de las proteínas: ACC, pACC, AMPK y pAMPK

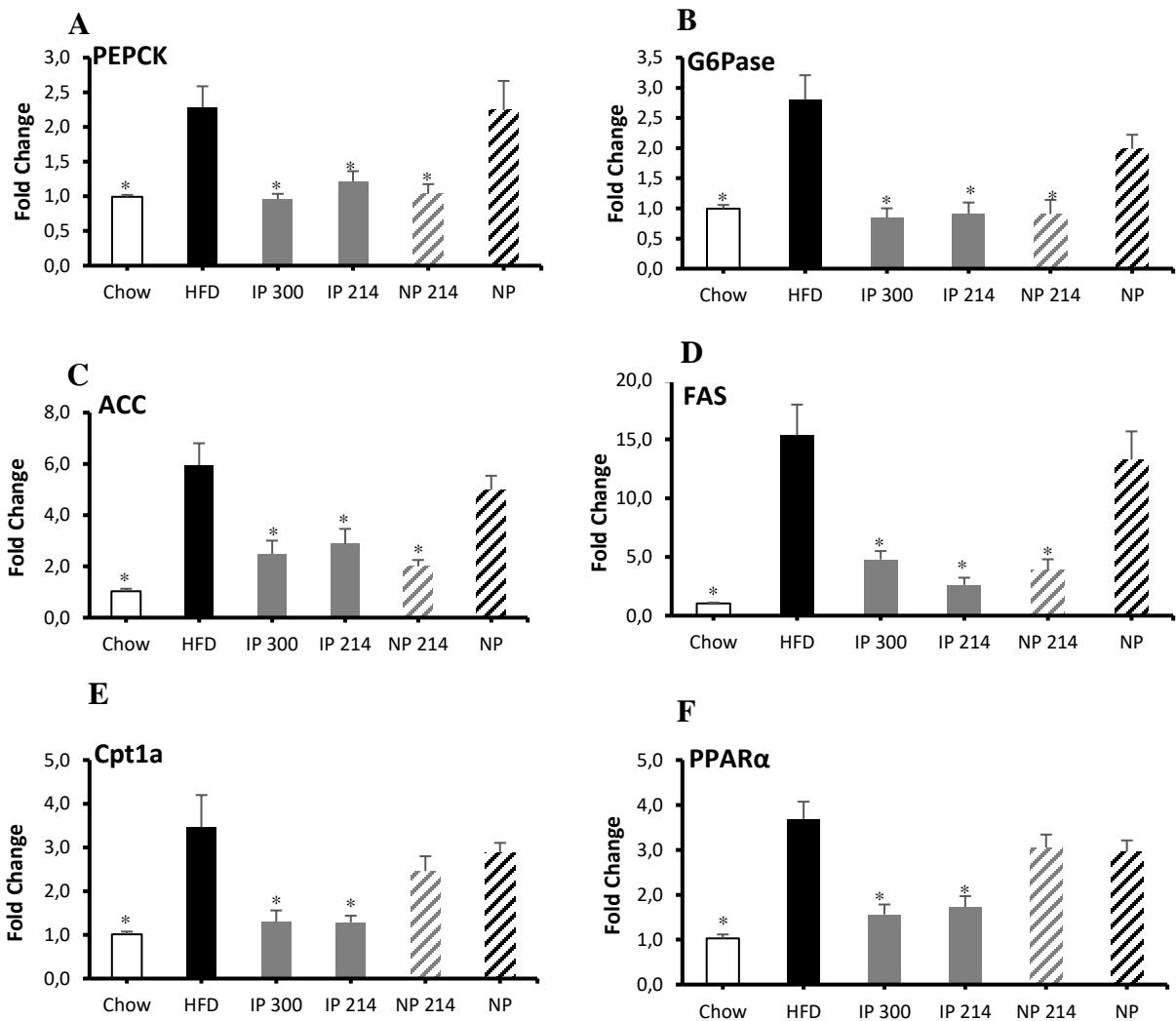
En la **Figura 4** se observa de manera cualitativa mediante la tinción con inmunohistoquímicas la expresión de las proteínas intracelulares: ACC, pACC, AMPK, pAMPK (color café) notando una diferencia entre los ratones alimentados con dieta normal (controles) y los que se alimentaron con la dieta rica en grasa (HFD), asimismo, el tratamiento vía oral presenta una reducción notoria en la expresión de dichas proteínas muy comparable con los tratamientos administrados vía IP.

De manera cuantitativa el tratamiento con OBE100 disminuyó la expresión de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) (**Figura 5C y 5D**), la cual en su forma fosforilada se activa (Miranda et al, 2007), y de esta manera se encarga de regular e inhibir otras vías u otras enzimas como lo es el caso de la acetil coA carboxilasa (ACC) la cual en su forma activa inicia la lipogénesis. Además, cuando la proteína se encuentra fosforilada (pACC) se presenta una inactivación de esta, lo que conlleva a que se aumente la oxidación de ácidos grasos. En los animales alimentados con HFG hay una sobreexpresión de dichas proteínas (**Figura 5A y 5B**), al compararse con el grupo que se le administró el tratamiento con la nanoformulación NP214 se observa una reducción significativa, la cual es similar a los tratamientos por vía IP. Este resultado se validó por medio de Western Blot, donde se encontró la misma tendencia para las proteínas ACC

y pACC donde hay una reducción en su expresión después del tratamiento con la nanoformulación (**Figura 6A y 6B**), comparado con los animales alimentados con HFD. Además, no hay un efecto significativo con las nanopartículas solas NP, por lo cual se asume que la expresión y reducción se debe al tratamiento con OBE100.

Figura 3

Efecto del OBE 100 en la expresión de los genes *PEPCK*, *G6Pase*, *ACC*, *FAS*, *Cpt1a* y *PPARα*



Valoración por qRT-PCR de genes gluconeogénicos: Fosfoenol piruvato carboxi-quinasa (*PEPCK*) y glucosa 6-fosfatasa (*G6Pase*) (**A y B**). Genes lipogénicos: Acetil CoA Carboxilasa (*ACC*) y Ácido graso sintasa (*FAS*) (**C y D**). Genes involucrados en el catabolismo celular: Carnitina palmitoil transferasa 1 (*Cpt1a*) y el receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas (*PPARα*) (**E y F**). HFD: High Fat Diet (Dieta Rica en Grasa). *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnet de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$.

Figura 4

Efecto del OBE 100 sobre la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímicas de tejido hepático

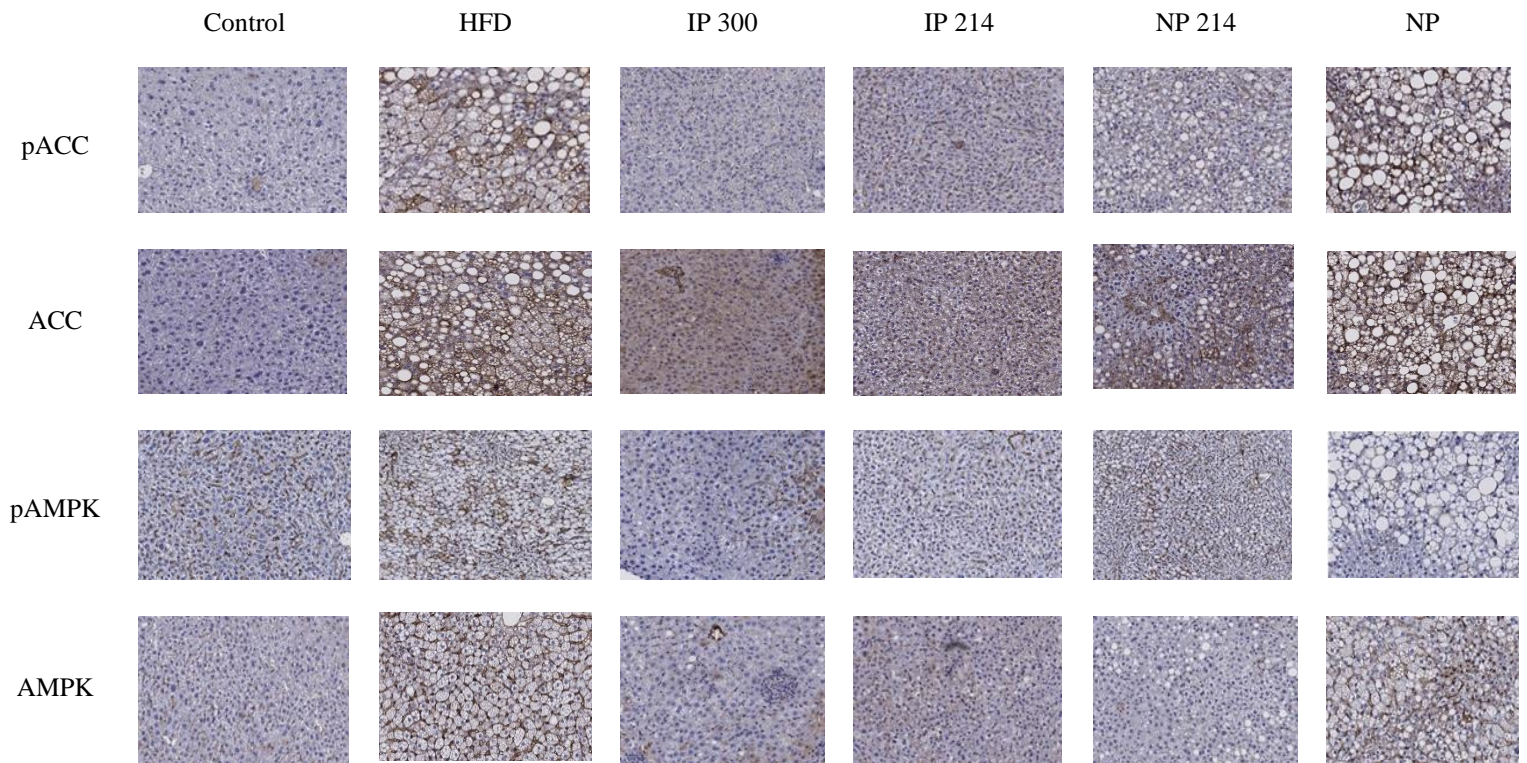
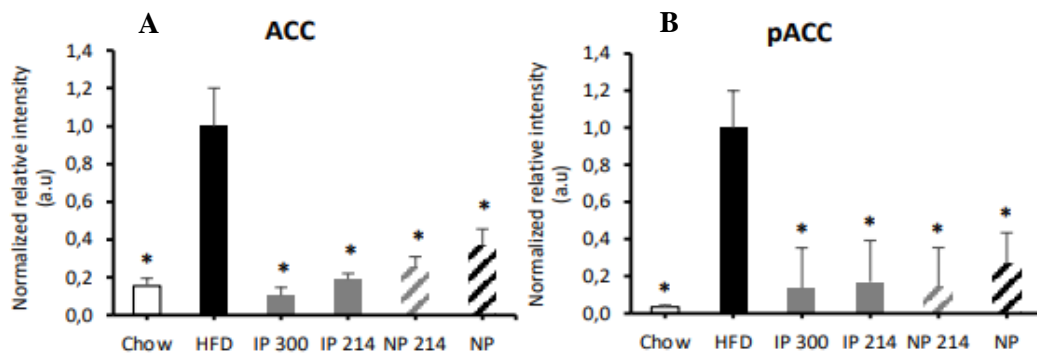
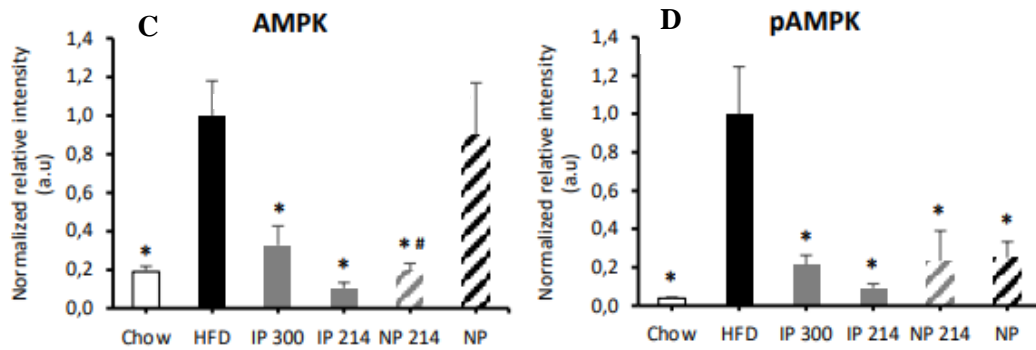


Figura 5

Efecto del OBE 100 en la expresión de ACC, pACC, AMPK y pAMPK mediante inmunohistoquímicas

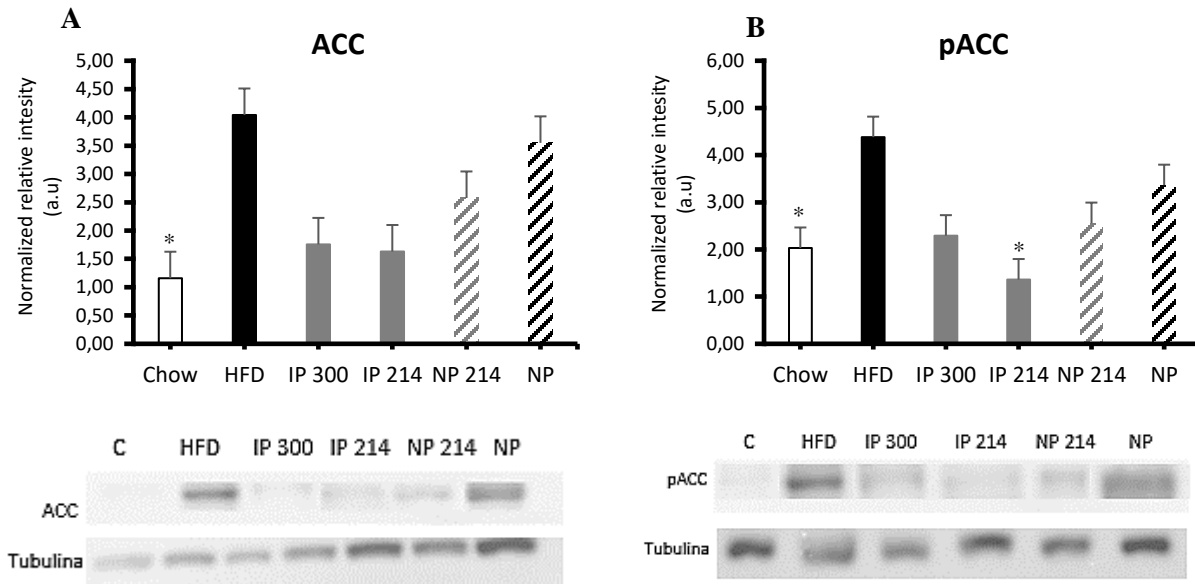




Valoración por inmunohistoquímicas de las proteínas intracelulares: (A). Acetil coA carboxilasa (ACC), (B) Acetil coA carboxilasa fosforilada (pACC). (C) Proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) y (D) Proteína cinasa activada por monofosfato de adenina fosforilada (pAMPK). HFD: High Fat Diet (Dieta Rica en Grasa). *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnett de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$.

Figura 6

Efecto del OBE 100 en la expresión de ACC y pACC mediante western blot



Valoración por Western blot de las proteínas: (A) ACC y (B) pACC. HFD: High Fat Diet (Dieta Rica en Grasa). *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnett de múltiples comparaciones. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$.

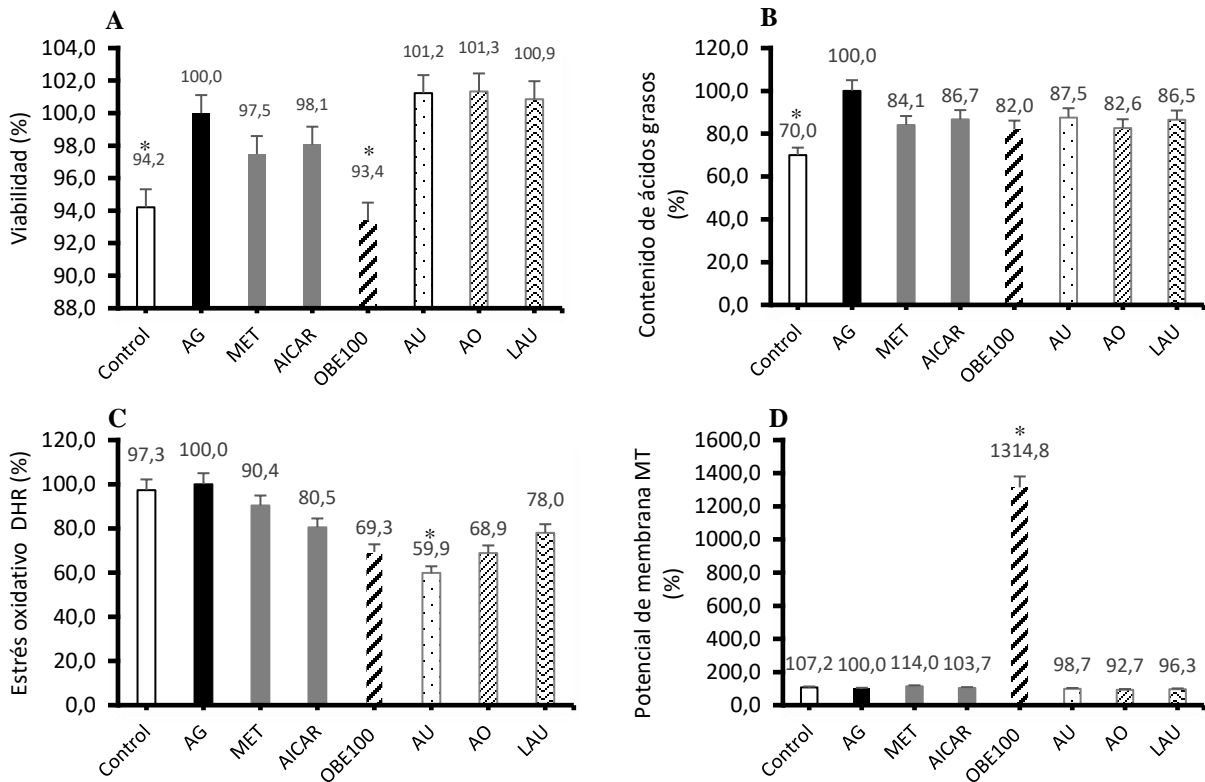
4.2 Modelo in vitro

4.2.1 Viabilidad celular en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.

Los tratamientos no tuvieron alteraciones sobre la viabilidad de las células HepG2, dado a que esta fue superior al 80% en todos los casos (**Figura 7A**). La metformina y el AICAR utilizados como controles positivos disminuyeron la viabilidad celular entre un 3 y 2% respectivamente, el tratamiento con OBE100 disminuyó un 7% la viabilidad, mientras que las fracciones individuales del OBE 100 aumentaron un 1% la viabilidad, lo que puede indicar que el tratamiento no es tóxico para la célula. Además, el medio de cultivo empleado contiene los nutrientes necesarios para que se lleve a cabo el crecimiento celular sin afectar que esté presente el tratamiento.

Figura 7

Efecto del OBE100 y sus fracciones individuales sobre la línea celular HepG2



(A) Viabilidad (%). (B). Contenido de ácidos grasos (%). (C). Estrés oxidativo. (D) Potencial de membrana mitocondrial. Todos los experimentos fueron realizados luego de 48 horas de carga de ácidos grasos y 72 horas de tratamiento. Citometría de flujo (A, C y D). Tinción con oil red (B). AG: Ácidos grasos, MET: Metformina, AICAR: ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida, AU: Ácido ursólico, AO: Ácido oleanólico LAU: Lactona del ácido ursólico. *: $p < 0.05$, ANOVA con post hoc de Dunnett.. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$.

4.2.2 Efecto del OBE100 y sus fracciones individuales sobre la acumulación de ácidos grasos en la línea celular HepG2

Para evaluar la reducción en la concentración de triacilgliceroles al interior de las células, al finalizar las 48 horas de carga de grasa y 72 horas de tratamientos se observa de manera cualitativa mediante un registro fotográfico la disminución en la acumulación de ácidos grasos en las células con los diferentes tratamientos (**Figura 8**). En general se observa una mayor diferencia con el OBE100 y la metformina respecto al control de ácidos grasos (AG).

Al realizar la cuantificación de la tinción mediante espectrofotometría las células tratadas con OBE100 presentaron una disminución del 18% en la acumulación de triacilgliceroles (TAGs), resultados similares en comparación con la metformina y el AICAR usados como control positivo, en los cuales la reducción fue del 16 y 13.2% respectivamente (**Figura 7B**). En cuanto a las fracciones individuales del OBE100: AU, AO y LAU la disminución en la acumulación de ácidos grasos fue del 12.5, 17.4 y 13.5% respectivamente, por lo tanto, no hubo una disminución significativa en la acumulación de TAGs.

4.2.3 Estrés oxidativo en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes que conduce a la lesión celular y que parece implicado en enfermedades hepáticas. Se determinó este parámetro finalizado los tratamientos y se encontró que los datos no mostraron diferencias significativas entre el grupo de control y el grupo cargado con ácidos grasos (AG). Sin embargo, se encontró una disminución del 30.7% en el estrés oxidativo de la línea celular al utilizar el tratamiento con el OBE100 y sus fracciones individuales: AU, AO, y LAU; del 40.1, 31.1 y 22% respectivamente. En cuanto a los controles positivos (metformina y AICAR) hay una reducción en el estrés oxidativo del 9.6 y el 19.5% respectivamente, estos resultados demuestran que hay mayor reducción con el uso del OBE100 como tratamiento (**Figura 7C**).

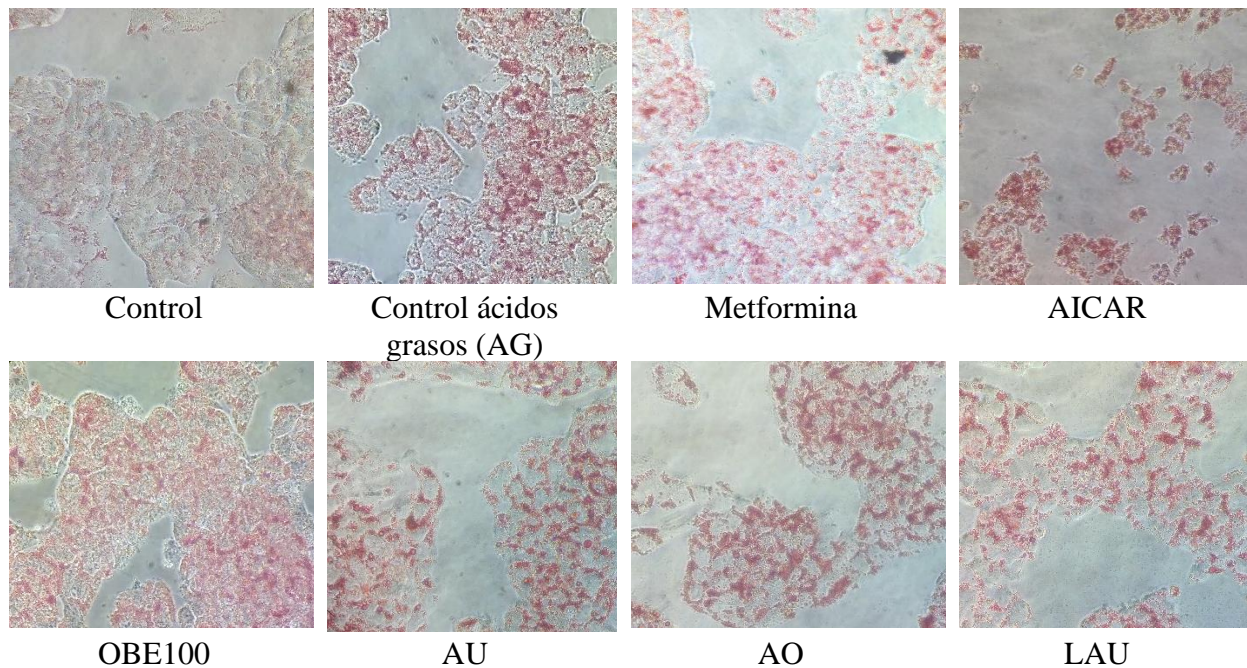
4.2.4 Potencial de membrana en células HepG2 tratadas con OBE100 y sus fracciones individuales.

Se estudió la actividad mitocondrial de la línea celular HepG2 al finalizar los tratamientos, mediante el marcaje con MitoTracker, un colorante catiónico lipofílico que se transporta a las

mitocondrias de acuerdo con el potencial de la membrana mitocondrial, donde, la cantidad de MitoTracker absorbida por las mitocondrias está directamente relacionada con su potencial y puede visualizarse monitoreando los niveles de fluorescencia a través de la citometría. (Pendergrass et al., 2004). Las alteraciones en el potencial pueden significar daño en la membrana, pero este caso la citometría no confirma daño. El tratamiento con OBE100 aumentó significativamente el potencial de membrana mitocondrial (1214.8%) respecto al control cargado con ácidos grasos (100%), como se observa en la **Figura 7D**. Cuando el potencial es alto, significa que hay un alto bombeo de protones, por lo cual parte de la materia prima necesaria para producir ATP está disponible. Ninguno de los demás tratamientos demostró una variación significativa excepto el tratamiento con OBE100 que incrementó enormemente el potencial de membrana mitocondrial.

Figura 8

Contenido de ácidos grasos en la línea celular HepG2 finalizados los tratamientos



5 Análisis

En este estudio se evaluó el efecto de un extracto obtenido a partir de hojas de *Eucalypto teretecornis* denominado OBE100 sobre la acumulación de grasa en el hígado de ratones obesos y con resistencia a la insulina. Además, se evaluó el efecto del OBE100 y sus tres constituyentes principales, los triterpenos: AU, AO y LAU en la línea celular HepG2 de hepatocitos humanos debido a su alto grado de diferenciación morfológica, además, porque son un modelo económico y estable para realizar pruebas bajo condiciones controladas y obtener resultados que permitan tener una aproximación a la hora de escalar hacia un modelo *in vivo*. Se estudiaron los constituyentes principales del OBE100 por separados para confirmar la importancia de dichos componentes y si el efecto biológico se conserva cuando se utiliza cada uno por separado o la mezcla de estos triterpenos.

Como se ha estudiado anteriormente, la obesidad es la mayor causa de la RI y lo que induce a su vez al desarrollo de la DM2 y EHGNA (Czech, 2017). Esta última es una enfermedad hepática crónica caracterizada por esteatosis hepática y estrés oxidativo. Por lo tanto, reducir la acumulación de lípidos y el estrés oxidativo podría ser útil en la prevención y el tratamiento de EHGNA (Musso et al., 2011). En investigaciones previas se ha demostrado el efecto del OBE100 como excelente opción de fitoterapéutico para el tratamiento de la DM2 y la obesidad, sin embargo la vía de administración intraperitoneal no es una buena opción para garantizar buena adherencia al tratamiento, en ese sentido, se desarrolló una nanoformulación oral donde se encapsuló el OBE100 utilizando nanopartículas poliméricas, buscando incrementar la estabilidad y aumentar la biodisponibilidad del principio activo y de esta manera obtener el efecto biológico deseado.

Inicialmente, en el modelo *in vivo* de ratones alimentados con HFD al finalizar los tratamientos, se encontró una disminución en los pesos de los animales a los cuales se les administró la nanoformulación oral respecto a los animales alimentados con HFD y este resultado es comparable con el control positivo correspondiente a la administración IP de 300mg de OBE100 por Kg de peso del animal y el equivalente de 214 mg vía IP (**Figura 1A**). Además, se encontró que los ratones alimentados con HFD y tratados con IP300 e IP214, son más tolerantes a la glucosa, que los ratones alimentados con HFD que no recibieron tratamiento (**Figura 1B y 1D**). Resultados similares se observan, cuando se analiza el AUC, generada por las pruebas ITT (**Figura 1C y 1E**).

Los animales tratados con la nanoformulación (NP 214) son más tolerantes a la glucosa y a la insulina después de recibir 15 dosis orales, pero el efecto no es tan pronunciado como el observado con la administración IP del extracto OBE 100. La administración de NP solas no muestra una diferencia significativa con el grupo control alimentado con HFD, ni en el peso corporal, ni en las pruebas de IPGTT e ITT. Pero, se evidencia una diferencia entre los animales tratados con NP 214 y con las nanopartículas solas (NP), lo cual demuestra que las nanopartículas solas no tienen efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos y que el efecto identificado con el tratamiento de NP 214, se debe exclusivamente al efecto de OBE100. A partir de los resultados fisiológicos es posible concluir que la nanoencapsulación del OBE100 y su administración vía oral presenta un efecto similar al que se obtiene con la administración IP300, sobre la reducción de la hiperglucemia en ayuno, la intolerancia a la glucosa y reducción en la resistencia a la insulina ya que se incrementa la sensibilidad a la hormona.

Se presentó una reducción en el peso de los hígados de los animales lo cual indica que el fitoterapéutico OBE100 tiene un efecto directo sobre la reducción de la acumulación de grasa en hígado con disminución del peso hepático tanto para el tratamiento administrando la nanoformulación oral respecto a los animales alimentados con HFD (**Figura 2A**).

Este efecto además fue posible corroborarlo con la tinción con Oil red al tejido hepático, con el cual era posible identificar si hubo una reducción en la acumulación de grasa presente en el tejido. De manera cualitativa se observa una disminución significativa en la intensidad de la coloración roja del control alimentado con HFD respecto a los tratamientos, los cuales disminuyen la acumulación de ácidos grasos (**Figura 2C**) y de manera cuantitativa en la **Figura 2B**, la nanoformulación tuvo un efecto en dicha reducción respecto a los animales alimentados con HFD, el cual fue comparable con el tratamiento usado como control positivo (IP300) y el tratamiento con la misma dosis vía intraperitoneal (IP214). La reducción de la acumulación de ácidos grasos en el tejido hepático realizando una tinción con hematoxilina y eosina de secciones de hígado de ratones después del tratamiento demostró un efecto comparable respecto a este estudio, debido a que la histopatología hepática confirmó que el tratamiento con OBE100 y metformina provocaba cambios patológicos significativos que disminuían la degeneración vacuolar y grasa (Acín et al, 2021).

Uno de los efectos de la insulina en el hígado, es reducir o inhibir, la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Este efecto se logra en parte, mediante la inhibición de la expresión de genes

gluconeogénicos, como la enzima fosfoenolpiruvato carboxilo quinasa (PEPCK) y la glucosa 6 fosfatasa (G6Pase). Cuando se establece la condición de resistencia a la insulina, la expresión de estos genes no se encuentra inhibida y la síntesis de glucosa se estimula. Esta es una de las razones, mediante la cual, en condiciones de resistencia a la insulina, se puede evidenciar una hiperglucemia. En ese sentido, al evaluar dichos genes involucrados en la gluconeogénesis el OBE 100 redujo la expresión de PEPCK y G6Pasa en el hígado (**Figuras 3A y 3B**), por lo cual el tratamiento con OBE100 disminuye la producción de glucosa. En estudios previos con otros fitoterapéuticos estos genes disminuyeron su expresión en hígado en ratones tratados con un extracto de arándanos. (Takikawa et al. 2010).

En el hígado hubo una reducción en la expresión de genes involucrados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos: FAS y ACC (**Figura 3C y 3D**), la fosforilación de ACC produce una caída en los niveles de malonil-CoA, inhibiendo la síntesis de ácidos grasos y por otro lado libera el efecto inhibitorio de malonil-CoA sobre CPT-1, lo cual resulta en la entrada de acil-CoA en las mitocondrias elevando la producción de ATP. La disminución en la expresión de ACC empleando el tratamiento con la nanoformulación se corroboró mediante la RT-qPCR, inmunohistoquímicas y western blot, donde se estableció el mismo patrón en los 3 ensayos.

En muchos mecanismos de los diferentes medicamentos para tratar la RI y DM2 se ha encontrado que la metformina o las tiazolidinedionas pueden activar a la AMPK (Miranda, 2007). El OBE100 y uno de sus componentes individuales, el AU tiene la capacidad de activar AMPK (Acin et al., 2021) lo cual regula el metabolismo de los lípidos, aumentando la oxidación de los ácidos grasos y reduciendo el depósito de grasa en el hígado (Yun et al., 2006), por medio de una disminución de la acetil CoA carboxilasa (ACC), la cual en su estado de fosforilación se inactiva para disminuir la síntesis de malonil CoA y como consecuencia aumenta la oxidación de ácidos grasos mediada por la CPT1 α , cuya expresión es estimulada por PPAR α y PGC1 (Song et al., 2010). Asimismo, la expresión del gen PPAR α fue inhibida por OBE100 con los tratamientos administrados vía IP, lo cual es consecuente con los niveles de expresión de CPT1 α . (**Figura 3E y 3F**). Sin embargo, al administrar el tratamiento con la nanoformulación NP 214 no hay una reducción significativa en la expresión de los genes Cpt1a y PPAR α , como lo hace la administración IP, esto podría deberse a que la liberación del extracto OBE 100 encapsulado en las NP en el tracto gastrointestinal podría llevarse a cabo de manera diferencial, de tal manera que las

proporciones de los componentes mayoritarios es diferente a la identificada en el OBE 100. También, se desconoce el efecto de la interacción de las NP con el alimento, de tal manera que pueda afectar la liberación y absorción de los componentes mayoritarios del OBE100. Estas causas pueden presentar como consecuencia que no llegue al hígado las mismas cantidades de los componentes mayoritarios de OBE 100, y por lo tanto, no afecten la expresión de los genes que son modulados cuando se administra el extracto por vía IP.

En cuanto al modelo *in vitro* el efecto del OBE100 sobre la línea celular HepG2 redujo de manera efectiva la acumulación de lípidos, similar al modelo *in vivo* donde hubo una reducción en el peso y la grasa del hígado, lo cual se corroboró en este estudio y en investigaciones previas de Acin *et al.*, 2021. Ambos resultados emplean la metformina como tratamiento de referencia y en el caso de este estudio el AICAR como estimulador de la AMPK, donde ambos disminuyeron la acumulación de lípidos, por lo tanto, estos resultados son muy comparables con el OBE100 y sus fracciones individuales ya que se observan porcentajes de reducción de ácidos grasos muy similares al finalizar los tratamientos (**Figura 7B**). Asimismo, la viabilidad celular con el OBE100, no se vio afectada lo cual indica que este extracto ni sus fracciones individuales son tóxicos para la supervivencia celular, debido a que esta presentó porcentajes muy cercanos respecto al control de ácidos grasos que se usaba como referente de 100% de viabilidad (**Figura 7A**). En estudios previos se encontró que el OBE100 empleado a diferentes concentraciones no fue tóxico para la célula y se obtuvieron porcentajes de viabilidad muy altos tanto por el ensayo de metil-tiazolil-tetrazolio (MTT), como por citometría empleando 7-Aminoactinomycin D (Quintero S, 2021).

Los triterpenos individuales encontrados en el OBE100 disminuyen la esteatosis hepática: AO mejora la adiposidad hepática en ratones (de Melo *et al.*, 2010). El AU reduce significativamente la esteatosis hepática en ratones (Li *et al.*, 2015) y el tratamiento con LAU reduce la acumulación de lípidos en la línea celular HepG2 (Acin *et al.*, 2021), sin embargo, hay un mejor efecto empleando el OBE100 completo que cada una de sus fracciones individuales, lo cual fue muy notorio al evaluar el potencial de membrana mitocondrial (**Figura 7D**). Dicho potencial es fundamental para mantener la función fisiológica de la cadena respiratoria de electrones para generar ATP, ya que una pérdida significativa de dicho potencial conlleva a la muerte celular (Dinesh, 2011). El incremento tan significativo en este potencial al emplear el

tratamiento con OBE100 indica que hay un aumento de los insumos para la producción de ATP gracias al alto bombeo de protones. De manera similar en un estudio realizado a células de adipocitos 3T3-L1 se encontró un alto porcentaje de potencial de membrana mitocondrial y relación ADP/ATP, cuando las células fueron tratadas con OBE100 sin encontrar que sufrieran daño celular. (Acin et al., 2021)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes en la señalización para regular la función celular, pero su acumulación en condiciones patológicas conduce al estrés oxidativo. La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo han sido implicados en la fisiopatología de muchas enfermedades, por lo tanto, su estudio brinda información sobre el estado fisiológico de la célula y la función de la mitocondria (Dinesh, 2011). En este estudio se encontró una disminución en el estrés oxidativo de la línea celular (**Figura 7C**) lo cual puede ser debido a que el OBE100 disminuye el daño oxidativo en las células al reducir las ROS intracelulares que aumentan la lesión hepática (Quintero S, 2021). Además, en otra investigación con la línea celular J774 de macrófagos de ratón, el tratamiento con OBE100 es el único que tiende a disminuir de manera dosis dependiente la cantidad de ROS, a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Betancur, 2019).

6 Conclusiones

Este estudio permitió evidenciar que el OBE100 obtenido a partir de hojas de eucalipto podría ser de múltiples beneficios para el tratamiento de la obesidad y la DM2. La mezcla de los compuestos bioactivos presentes en el OBE100 altera la expresión génica y los eventos celulares que dan como resultado la modulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos sobre el modelo animal de obesidad inducida por dieta rica en grasa. La acumulación de grasa en la línea celular de hepatocitos humanos presentó una disminución con el OBE100 y sus fracciones individuales, lo cual indica que el tratamiento posee actividades antiobesidad, antidiabéticas e hipolipidémicas prometedoras.

Referencias

- Adam, L. Bujak, Justin D. Crane, James S. Lally, Rebecca J. Ford, Sally J. Kang, Irena A. Rebalka, Alex E. Green, Bruce E. Kemp, Thomas J. Hawke, Jonathan D. Schertzer, Gregory R. Steinberg. (2015). AMPK Activation of Muscle Autophagy Prevents Fasting-Induced Hypoglycemia and Myopathy during Aging. *Cell Metabolism* DOI: 10.1016/j.cmet.2015.05.016.
- Acín S, Muñoz, LD., Guillen, A., Soscue, D., Castaño, A., Echeverri, F & Balcazar, N. (2021). Triterpene enriched fractions from *Eucalyptus tereticornis* ameliorate metabolic alterations in a mouse model of diet-induced obesity. *Journal of Ethnopharmacology*. 10.1016/j.jep.2020.113298
- Aguilar, V., Inoue, W., Rummel, C., & Luheshi, G. N. (2015). Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology*, 96, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.023>
- Alfred JB, Reilly KE. Short-term regulation of acetyl-CoA carboxylase in tissues of higher animals. *Prog Lipid Res* 2012, 35:371-385
- Araya, V. (2003). Insulin resistance, obesity, and steatohepatitis. *Revista biomédica*. doi: 10.5867/medwave.2003.01.3195
- Bering, O. (2021). AICAR (ribonucleótido AICA) Péptido. Recuperado de: <https://beringomega.org/es/producto/aicar/>
- Betancur Ocampo, L. I. (2019). *Evaluación de mezclas de triterpenos presentes en Eucalyptus tereticornis para el tratamiento de complicaciones asociadas a la obesidad*. [tesis de maestría, Universidad de Antioquia]. Biblioteca Digital Universidad de Antioquia.
- Ceballos, S., Guillen, A., Muñoz, DL., Castaño, A., Echeverri, LF., Acin, S., Balcazar, N., (2018). Immunometabolic regulation by triterpenes of *Eucalyptus tereticornis* in adipose tissue cell line models. *Phytomedicine*. doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.059
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2022. From: <https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/diabetes.html#:~:text=Existen%20tres%20tipos%20principales%20de,que%20el%20cuerpo%20produzca%20insulina.>
- Czech, MP. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature medicine*, 23(7):804.
- de Melo, C. L., M. G. R. Queiroz, S. G. Fonseca, A. M. Bizerra, T. L. Lemos, T. S. Melo, F. A. Santos, and V. S. Rao. (2010). Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chemico biological interactions*, 185 (1):59–65.

-
- Donath MY. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4275>
- Guillén, A., Granados, S., Rivas KE., Estrada, O., Echeverri, F, Balcázar, N. (2015). Antihyperglycemic activity of *Eucalyptus tereticornis* in insulin resistant cells and a nutritional model of diabetic mice. *Adv. Pharm. Sci.* 2015:1-10. Article ID 418673
- G. Musso, R. Gambino, M. Cassader, and G. Pagano. (2011). Metaanalysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (naflD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of medicine*, 43(8):617–649.
- Instituto Nacional de Diabetes [NIH]. (2022). *Resistencia a la insulina y la prediabetes*. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-lasalud/diabetes/informacion-general/que-es/resistencia-insulina-prediabetes>
- International Diabetes Federation [IDF]. (2013). *Diabetes atlas* (6th ed.), International Diabetes Federation, Brussels, Belgium.
- Lian, C.-Y., Zhai, Z.-Z., Li, Z.-F., & Wang, L. (2020). High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 109199. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109199
- Li, G., Liu, X., Zhu, H., Huang, L., Liu, Y., Ma, C. y Qin, C. (2009). La resistencia a la insulina en hámsteres resistentes a la insulina y diabéticos (*Mesocricetus auratus*) se asocia con una expresión hepática anormal de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa. *Medicina comparada*, 59 (5), 449–458.
- Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* 2013; 8: 1149–1154
- Ministerio de Salud (2021). Obesidad, un factor de riesgo en covid 19. Boletín de Prensa No 324 de 2021. <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Obesidad-un-factor-de-riesgo-en-el-covid-19.aspx>
- Miranda, N., Armando R. Tovar, Palacios, B., Torres, N. (2007). La AMPK como un sensor de energía celular y su función en el organismo. Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2007/nn076h.pdf>
- Moscato, Stefania; et al. (2015). "Poli (alcohol vínlico) / hidrogeles de gelatina cultivados con células Hep G2 como modelo 3D de carcinoma hepatocelular: un estudio morfológico". *Revista de biomateriales funcionales*.
- Muñoz, Sebastián. (2006). *Resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en células de músculo esquelético I6e9: papel de la carnitina palmitoiltransferasa i (CPT1)*. [Tesis de

doctorado, Universidad de Barcelona].
https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1045/DSM_TESIS.pdf

Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 114:232-239

Organización mundial de la salud [OMS]. (2022). Retrieved 18 February 2022, from https://www.who.int/es/health-topics/obesity#tab=tab_1

Ormerod, M.G. (1990) Analysis of DNA. General methods. En: *Flow Cytometry. A Practica Approach.*, editado por Ormerod, M.G. Oxford, Oxford University Press: pp. 69-87.

Pagidipati NJ, Deedwania P. A Comprehensive Cardiovascular-Renal-Metabolic Risk Reduction Approach to Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med.* 2021 Sep;134(9):1076-1084. doi: 10.1016/j.amjmed.2021.04.024. Epub 2021 May 23. PMID: 34029524.

Pérez, M., Gómez, M. (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición.* 58(7), 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.05.008>

Quintero, S. (2021). *Study of metabolic regulation by triterpenes of Eucalyptus tereticornis in human HepG2 cell line.*

Ramírez, P. (2018). Obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 en adolescentes. *An. Fac. med.* [online]. 2018, vol.79, n.3, pp.200-205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v79i3.15311>.

Sheth S, et al (2017). Epidemiology, clinical features, and diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in adults. <https://www.uptodate.com/contents/search>.

Song, S., Attia, R.R., Connaughton, S., Niesen, M.I., Ness, G.C., Elam, M.B., Hori, R.T., Cook, G.A., Park, E.A., (2010). Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α)

Sun, Y., Connors, KE & Yang, DQ. AICAR induce la fosforilación de AMPK de una manera dependiente de ATM, independiente de LKB1. *Mol Cell Biochem* 306, 239–245 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9575-6>

Takikawa, M. et al., (2010). Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice 1 – 3., pp.527–533.

Vargas, J. A. (2019). Revista indexada en scielo. Revista de la Facultad de Medicina Humana, 19(4), 7–8. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v19i4.2332>

Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>

W. Pendergrass, N. Wolf, and M. Poot. (2004). Efficacy of mitotracker greenTM and cmxrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 61(2):162–169

Yun, C.L., Zierath, J.R., (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI29044>.