

Evaluación de la actividad de fracciones de *Eucalyptus tereticornis*, ricas en triterpenos, sobre marcadores inmunometabólicos asociados a tejido adiposo de ratón: Contribución a la búsqueda de fármacos para el tratamiento de *Diabetes Mellitus Tipo 2*

Susana María Ceballos Duque, Bioingeniera

Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Bioquímica, Farmacología y Fisiología

Tutor

Norman Balcázar Morales. PhD

Genética Molecular/Grupo de Endocrinología y Metabolismo

Facultad de Medicina

Comité Tutorial

Ángela Patricia Cadavid. MD, MSc, Dr.Sci.

Sergio Acín Martínez. PhD

Andrés A. Arias Sierra, MSc, PhD.

Universidad De Antioquia

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Medellín

2017

Tabla de contenido

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 GENERAL | 18 |
| 2.2 ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 3.1 QUÍMICOS Y REACTIVOS | 18 |
| 3.2 EXTRACTOS VEGETALES | 19 |
| 3.3 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES..... | 19 |
| 3.4 DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS 3T3-L1 A ADIPOCITOS MADUROS..... | 20 |
| 3.5 ACTIVACIÓN DE CÉLULAS J774 A SU PERFIL PROINFLAMATORIO..... | 20 |
| 3.6 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD | 20 |
| 3.7 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TRIACILGLICEROL EN CÉLULAS 3T3-L1 | 21 |
| 3.8 AISLAMIENTO DE RNA, PREPARACIÓN DE CDNA Y ENSAYOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL QRT-PCR | 22 |
| 3.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LEPTINA, ADIPONECTINA Y RESISTINA EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS 3T3-L1..... | 23 |
| 3.10 CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS J774 . | 24 |
| 3.11 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES (OBE100 Y OBE104) | 24 |
| 3.12 DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS 3T3-L1 Y J774..... | 25 |
| 3.13 MODELO ANIMAL DE PRE-DIABETES..... | 25 |
| 3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| 4. RESULTADOS..... | 26 |
| 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FRACCIONES RICAS EN TRITERPENOS | 26 |
| 4.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD..... | 28 |
| 4.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LAS FRACCIONES EN LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN PREADIPOCITOS Y ADIPOCITOS 3T3-L1 | 29 |
| 4.4 EFECTO DE LAS FRACCIONES EN LA EXPRESIÓN DE GENES FUNCIONALES EN CÉLULAS 3T3-L1 | 32 |
| 4.4.1 <i>Expresión transcripcional</i> | 32 |
| 4.4.2 <i>Expresión proteica</i> | 33 |
| 4.5 EFECTO DE LAS FRACCIONES EN LA EXPRESIÓN DE GENES PROINFLAMATORIOS EN CÉLULAS J774 | 34 |
| 4.5.1 <i>Efecto de las fracciones en la activación del perfil proinflamatorio de las células J774</i> | 34 |
| 4.5.2 <i>Expresión transcripcional</i> | 35 |
| 4.5.3 <i>Expresión proteica</i> | 36 |
| 4.6 EFECTO DE LAS FRACCIONES EN EL ESTADO OXIDATIVO DE LAS CÉLULAS 3T3-L1 Y J774 | 37 |
| 4.6.1 <i>Capacidad antioxidante de las fracciones</i> | 37 |
| 4.6.2 <i>Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células 3T3-L1</i> | 38 |
| 4.6.3 <i>Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células J774</i> | 38 |
| 4.7 EFECTO DE LAS FRACCIONES EN LA EXPRESIÓN DE GENES FUNCIONALES TEJIDO ADIPOSO DE RATÓN | 39 |
| 4.7.1 <i>Expresión transcripcional</i> | 39 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 40 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 54 |

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es considerada una emergencia a nivel mundial. En la actualidad, 415 millones de adultos padecen la enfermedad (el 8,8% de adultos entre las edades de 20-79 años). Además, 318 millones de personas tienen alterada la tolerancia a la glucosa, lo que está asociado con un alto riesgo de desarrollar diabetes. Si esta tendencia continúa, se estima que para el año 2040, 642 millones de personas (uno entre diez adultos) tendrá diabetes(1). Estas cifras podrían duplicarse, dado que uno de cada dos adultos con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) no ha sido diagnosticado, porque con frecuencia, hay pocos síntomas en los primeros años de la enfermedad o los síntomas que ocurren no están comúnmente ligados a ésta(2). Se estima que entre el 87% y 91% de las personas con diabetes a nivel mundial, tienen DM2, del 7% al 12% tienen diabetes tipo 1 y del 1% al 3% tienen otros tipos de diabetes(3,4).

La diabetes representa una carga económica tanto para los individuos afectados, debido al costo de la insulina y otros medicamentos relacionados, como para los sistemas de salud de cada país. En promedio, un país gasta entre el 5% y el 20% del total de su presupuesto sanitario en costos relacionados con la diabetes(1) tales como el mayor uso de los servicios de salud, pérdida de productividad por incapacidades, apoyo a largo plazo para superar complicaciones relacionadas como la ceguera, amputaciones y problemas cardíacos, entre otros(5).

La DM2 es una enfermedad crónica que se desarrolla cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina producida(6), lo que conduce a niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). Entre los factores de riesgo más comunes para el desarrollo DM2 se encuentra el índice de masa corporal (IMC)>25, particularmente la obesidad central (radio cintura-cadera)(7). La obesidad está relacionada con el Síndrome Metabólico, que es un conjunto de alteraciones que incluye resistencia a la insulina, disminución de las concentraciones de colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), elevación de las concentraciones de triacilgliceroles, aumento de la presión arterial (PA) e hiperglucemia(7,8). Este síndrome está asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia DM2 y de 2-3 veces en la de enfermedad cardiovascular(9).

En 2010, se estimó que el sobrepeso y la obesidad causaron 3.4 millones de muertes alrededor del mundo(10). En la **Tabla 1** se puede apreciar que la prevalencia de obesidad es levemente mayor en mujeres que en hombres y lo realmente alarmante es el incremento de dicha prevalencia entre los años 1980 y 2013, especialmente en niños y adolescentes.

Tabla 1. Comparación de la Prevalencia Global de obesidad y sobrepeso entre los años 1980 y 2013, discriminada por edad y género(11).

| Población con obesidad o sobrepeso | Prevalencia 1980 | Prevalencia 2013 | Diferencia puntos porcentuales | Aumento de prevalencia en 33 años |
|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|
| Hombres adultos | 28.8% | 36.9% | 8.1 | 21.9% |
| Mujeres adultas | 29.8% | 38.0% | 8.2 | 21,8% |
| Niños y adolescentes en países desarrollados | 16.9% | 23.8% | 6.9 | 28.9% |
| Niñas y adolescentes en países desarrollados | 16.2% | 22.6% | 6.4 | 28.3% |
| Niños y adolescentes en países en desarrollo | 8.1% | 12.9% | 4.8 | 37.2% |
| Niñas y adolescentes en países en desarrollo | 8.4% | 13.4% | 5.0 | 37.3% |

En Colombia, el exceso de peso aumenta de manera proporcional con la edad y está asociado positivamente con indicadores de estatus socioeconómico. Se estima que en el país, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres entre 18 y 60 años es de 47,4% y 57.1% respectivamente(12).

Dado todo lo anterior, además de que la obesidad está asociada con el incremento del riesgo de muerte, envejecimiento acelerado, cáncer, aterosclerosis, hipertensión, dislipidemia y enfermedades en las rodillas, este padecimiento es calificado como una pandemia(13).

La obesidad es considerada un estado inflamatorio crónico de bajo grado(14) que está relacionado directamente con el aumento del volumen del tejido adiposo, como consecuencia del balance energético positivo mantenido en el tiempo, proveniente de la diferencia entre la energía que ingresa al sistema y la energía utilizada por el organismo.

Además de sus funciones clásicas de almacenamiento de lípidos, hoy se sabe que el tejido adiposo es un órgano endocrino que produce y secreta una gran variedad de adipocinas, que sirven como moléculas señal, para mantener la comunicación entre el tejido adiposo y otros órganos(11)

Se han identificado dos tipos principales de tejido adiposo; el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). El TAB principalmente almacena la

energía del organismo y sirve de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales. Los adipocitos maduros del TAB manifiestan el perfil de expresión necesario para la captación de glucosa, síntesis de triacilgliceroles, lipogénesis, y lipólisis(15). Por otro lado, el TAM metaboliza los ácidos grasos para producir calor(16).

Los adipocitos del TAB tienen una forma variable, generalmente esférica y con un tamaño que oscila entre 25 y 200 μm ; tienen un núcleo periférico y plano y un citoplasma delgado que contiene una gota lipídica que ocupa el 90% del volumen; presenta pocas mitocondrias y un retículo endoplasmático pequeño(17).

Los factores de riesgo asociados con la obesidad, están íntimamente ligados a un exceso de tejido adiposo blanco (TAB), a cambios en sus funciones y a su distribución corporal. Los cambios funcionales del TAB se dan en la medida en que éste aumenta de tamaño, debido principalmente a la sobrealimentación. El aumento de tamaño del tejido adiposo puede deberse tanto al aumento de tamaño de los adipocitos existentes (hipertrofia)(18), como a la generación de nuevos adipocitos (hiperplasia)(19); Estudios indican que individuos con hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo en la parte central o visceral de su cuerpo, presentan mayor riesgo de mortalidad y de padecer enfermedades metabólicas, comparados con aquellos que presentan acumulación de grasa a nivel subcutáneo(20).

Como consecuencia de las modificaciones en el espaciamiento de la fracción vascular-estromal del tejido adiposo visceral, causadas por la hipertrofia y la hiperplasia de los adipocitos, algunas de las células de dicho tejido, ubicadas lejos de los vasos sanguíneos, desarrollan hipoxia y luego necrosis; posteriormente, son rodeadas por células fagocíticas que comienzan procesos inflamatorios que conducen a la remoción de dichas células(21).

Por otra parte, el incremento metabólico asociado al sobre-almacenamiento de ácidos grasos en los adipocitos hipertrofiados, promueve procesos de lipoperoxidación (oxidación de moléculas lipídicas al interior del adipocito), que conducen a un escenario de estrés oxidativo caracterizado por el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (como el ión superóxido, O_2^-) y de nitrógeno (como el óxido nítrico, NO). Consecuentemente, células inmunológicas son reclutadas desde la periferia hacia el tejido adiposo, exacerbando el proceso inflamatorio a nivel local(21)

Como resultado de la hipoxia y la hiperoxidación de ácidos grasos, los adipocitos presentan alteraciones funcionales caracterizadas por estrés reticular asociado al aumento metabólico, procesos de plegamiento incorrecto de proteínas y autofagia, lo cual es capaz de desencadenar apoptosis en estas células(22). Al igual que los procesos celulares descritos, la apoptosis aporta a la inflamación sistémica de grado bajo.

Es importante resaltar que el tejido adiposo por sí mismo, no altera la función metabólica; se necesita una combinación de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos del tejido adiposo ubicado en el área visceral/central de un individuo.

La importancia de las modificaciones del TAB, varía dependiendo de las etapas del desarrollo en el ser humano. Los adultos, tanto con peso normal como obesos, mantienen una población adipocitaria, sobre la base de unas tasas proporcionadas de adipogénesis y apoptosis, mientras que los niños y adolescentes incrementan el número de adipocitos de su TAB, con una tasa de proliferación superior cuando son obesos en comparación con los sujetos delgados(23). Se puede concluir entonces que la obesidad de establecimiento temprano genera un incremento de la población celular adipocitaria que, de cierta forma, actuaría como un factor protector minimizando el grado de hipertrofia adipocitaria; esto atenuaría el cambio del patrón de secreción de adipoquinas durante la infancia pero incrementaría el riesgo de obesidad severa en la adultez(24).

La adiposidad, definida como la fracción total de la masa corporal compuesta por el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, no solo está relacionada con parámetros fisiológicos como la presión sanguínea, la sensibilidad a la insulina y los niveles de triacilgliceroles, sino también con las concentraciones leptina.

La vía de señalización de la leptina se considera la fuente principal de información utilizada por el Sistema Nervioso Central (SNC) respecto a los depósitos energéticos del TAB en forma de triacilgliceroles. La leptina, esencial para la regulación del crecimiento, el metabolismo y la reproducción, es un polipéptido producido principalmente por los adipocitos maduros, aunque también, en menor proporción, por otros tejidos(25). La leptina actúa como una señal de adiposidad más que como una señal de saciedad, en la medida en que sus niveles séricos se relacionan con el contenido graso corporal y fluctúan en relación con los cambios en el mismo, aunque con una gran variabilidad entre individuos con un mismo índice de masa corporal (IMC)(26). La leptina circula a nivel vascular, tanto libre como unida a proteínas, con mayores niveles nocturnos(25) y regula la actividad de varias poblaciones neuronales en el SNC, específicamente en el hipotálamo y en el tronco encefálico(27).

La expresión génica de la leptina es negativamente regulada por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma ($PPAR\gamma$) y positivamente por $C/EBP\alpha$. Ambos actúan como factores de transcripción que se encargan del control de la diferenciación del adipocito(28). La expresión de la leptina en el tejido adiposo es estimulada principalmente con el consumo de alimentos y disminuye durante el ayuno, así como en la diabetes. La síntesis de leptina es estimulada por la insulina, los estrógenos y los glucocorticoides, e inhibida por los andrógenos. Se han observado niveles elevados de leptina en niños obesos y reducidos en

situaciones de malnutrición, como la anorexia nerviosa(24). Además, la hiperinsulinemia aumenta la producción de leptina, al tiempo que el incremento del índice de leptina libre fomenta la resistencia periférica a la acción de la insulina(29).

La importancia de la leptina en el balance energético se evidenció en humanos con deficiencia congénita de leptina(30) y de R-LEP (Receptor de Leptina)(31). Estos sujetos presentan una obesidad muy grave, de inicio temprano y ausencia de desarrollo puberal, que puede resolverse tras la administración de leptina biosintética (32).

La implicación de otras adipoquinas en el control de la homeostasia energética es menos evidente, pero no puede ser descartada; por ejemplo, que uno de los mayores determinantes del desarrollo de RI asociada a obesidad, es la disminución en la producción de adiponectina en el TA de los pacientes obesos. La deficiencia genética de adiponectina se asocia al desarrollo de RI, mientras que su administración a modelos experimentales aumenta la sensibilidad a la acción de la insulina que parece, además, regular negativamente la expresión de adiponectina(33).

La resistina es otro factor esencial en el desarrollo de resistencia a la insulina asociada a obesidad en modelos murinos; en el ser humano esta adipoquina, perteneciente a la familia FIZZ (found in inflammatory zone), ejerce un efecto fundamentalmente proinflamatorio. Esta diferencia responde a la limitada homología estructural entre especies (en torno al 60%) y a la diferencia en su fuente de producción principal: adipocitos en el ratón, células mononucleares en el ser humano(34). Estudios recientes de casos y controles en humanos, han demostrado la existencia de un riesgo incrementado de desarrollo de DM2 en pacientes con niveles elevados de resistina(35)

Otro factor determinado por la inflamación crónica leve desencadenada por obesidad, es la capacidad del TAB para producir proteínas de quimioatracción (quimioquinas), que determinan un incremento de los subtipos proinflamatorios de monocitos y macrófagos(36). Este hecho modifica el componente estromal de secreción de citoquinas(37), que supone un cambio en el patrón de secreción de adipoquinas de los adipocitos hipertróficos, en comparación con el de aquellos más pequeños.

Las quimoquinas son un tipo de adipoquinas, que favorecen la interacción de los leucocitos circulantes con el endotelio de los vasos sanguíneos del tejido, induciendo su migración al lugar de la inflamación. El principal quimoatrayente secretado por los adipocitos en condiciones de obesidad, es la proteína quimoatrayente de monocitos 1 (MCP1, por su sigla en inglés)(38), que contribuye

a la infiltración de macrófagos al tejido adiposo en procesos inflamatorios relacionados con obesidad(39).

Los macrófagos se han clasificado en dos tipos, de acuerdo al perfil de citocinas que secretan; los macrófagos M1 (macrófagos activados clásicamente) que producen citocinas proinflamatorias y los macrófagos M2 (macrófagos activados alternativamente) que secretan citocinas antiinflamatorias como interleuquina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante b (TGF-b).

Los compuestos que activan el perfil M1 de los macrófagos *in vitro*, son el interferón gamma (IFN- γ) y el lipopolisacárido (LPS), que ejerce un efecto similar a los ácidos grasos libres en el organismo (FFA, por sus siglas en inglés), mientras que el perfil M2 es activado por interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13)(40).

En pacientes obesos, se ha encontrado un incremento importante de los macrófagos M1 en el TAB(41). Dichos macrófagos producen y secretan citoquinas proinflamatorias como el factor necrótico tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 6 (IL-6) y la interleuquina 1 β (IL-1 β)(42).

El TNF α es una citoquina proinflamatoria producida por numerosas células, pero principalmente por los macrófagos y los linfocitos. Se ha encontrado que los adipocitos de roedores producen esta citoquina en mayor cantidad que los adipocitos de humanos. En roedores, el TNF α está involucrado con la fisiopatología de la resistencia a la insulina(43). Uno de los posibles mecanismos mediante los cuales esta citoquina interfiere con la sensibilidad a la insulina es a través de la fosforilación anormal de sustrato del receptor de la insulina (IRS-1), que trae como consecuencia la inhibición de la producción y translocación de GLUT4 en 3T3-L1(44). El TNF α inhibe la adipogénesis, bloqueando la absorción y almacenamiento de ácidos grasos por medio de la disminución de la expresión y actividad de la lipoproteína lipasa (LPL)(45). De igual modo, aumenta la expresión de leptina, disminuye la de adiponectina en adipocitos(46) y aumenta la producción de resistina en leucocitos de sangre periférica(47). La expresión TNF α en adipocitos y macrófagos es regulada negativamente por la adiponectina, a través de la inhibición del factor de transcripción NF-kB (factor nuclear kB) por medio de PPAR γ (48).

La IL-6 es una citoquina producida por muchos tipos celulares incluidas las células del tejido adiposo; durante la obesidad, la cantidad de IL-6 se ve aumentada en dicho tejido(49). En ausencia de procesos inflamatorios agudos, aproximadamente entre el 15% y el 30% de la IL-6 en sangre proviene del tejido adiposo(50). El tejido adiposo visceral secreta tres veces más IL-6 que el subcutáneo(51), lo que podría explicar el rol deletéreo de la obesidad central en las enfermedades metabólicas. La mayor parte de la secreción de IL-6 por parte del tejido adiposo proviene de la fracción estromal-vascular, compuesta por células endoteliales y

macrófagos(52). La IL-6 es una citoquina multifuncional que tiene receptores en varios tipos celulares. Una de sus mayores acciones es regular positivamente la producción hepática de proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva (CRP). Hay una posible relación directa entre los niveles de IL-6 del tejido adiposo y los niveles de CRP en sangre(53), lo que implica un riesgo cardiovascular importante(54). Estudios sugieren que la IL-6 podría estar implicada en la resistencia a la insulina y sus complicaciones(55–57). El receptor de IL-6 pertenece a la familia de receptores de citoquinas de clase I, los cuales utilizan las vías de señalización de las Janus quinasas (JAKs). Estudios han demostrado que la interacción entre las citoquinas y la vía de señalización de la insulina, conduce a una disminución en la señal de la insulina en presencia de citoquinas. El mecanismo involucrado en este proceso no es del todo claro, pero hay evidencia que sugiere la participación de proteínas quinasas en la activación de la tirosina fosfatasa(58) o la interacción de proteínas supresoras de señalización de citoquinas SOCS con el receptor de la insulina.

En pacientes con obesidad central, la reducción en los niveles de citocinas antiinflamatorias y un consecuente incremento de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo, da como resultado el desarrollo de resistencia a la insulina a nivel de los adipocitos. Este fenómeno, estimula la liberación de FFAs y la posterior acumulación de los mismos en órganos que no están facultados para esto, generándose una lipotoxicidad que desencadena en resistencia a la insulina a nivel sistémico. Como respuesta, el organismo activa sistemas compensatorios para regular los niveles de glucosa en sangre, aumentando la producción de insulina lo que, eventualmente, ocasiona el daño de las células pancreáticas, produciendo DM2. En este proceso natural de desarrollo de DM2 (Figura 1), juega un papel importante la predisposición genética.

Historia natural de la Diabetes Mellitus tipo 2



Figura 1. Historia natural de la Diabetes Mellitus tipo 2(59).

La insulina es una hormona peptídica de 5.8KDa, que es secretada por las células β de páncreas. Una de sus principales funciones es mantener los niveles de glucosa en sangre en un rango entre 80 y 105 mg/dl, favoreciendo la entrada y el almacenamiento de dicho nutriente en músculo y tejido adiposo e inhibiendo la producción de nueva glucosa en hígado (gluconeogénesis). Además, la insulina regula el metabolismo de los lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular(60).

La acción biológica de la insulina comienza cuando ésta se une a los receptores de la insulina (IR), que al ser estimulados por su ligando, se autofosforilan en residuos de tirosinas (Tyr). El IR está conformado por dos subunidades α y dos β , unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α están por fuera de la membrana plasmática y contienen los sitios de unión a la insulina. Las subunidades β tienen una parte transmembrana y otra que se ubica en el interior de la célula, en donde se localiza el dominio con actividad quinasa de Tyr.

En ausencia de estímulo, las subunidades α regulan a las β , impidiéndole al receptor autofosforilarse. Cuando la insulina se une al receptor, las subunidades α cambian de forma para permitir que las subunidades β se activen y se puedan autofosforilar en los residuos de tyr. En este punto se considera que el IR está activado y se encienden cascadas de señalización que dependen de un diverso y sincronizado número de interacciones proteicas.

La vía de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) es el principal mecanismo por medio del cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (**Figura 2**). El sustrato del receptor de la insulina (IRS) fosforila al IR en uno de sus sitios de fosforilación, y este sitio fosforilado se convierte en un sitio de unión y activación de proteínas que contienen el dominio SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), que en su mayoría son proteínas adaptadoras, como el caso de PI3K. Las PI3K son heterodímeros que poseen una subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ó p55PIK) y una subunidad catalítica (p110 α , p110 β ó p110 δ 9). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen el dominio SH2, que permiten su unión a los IRS (sustratos del receptor de la insulina).

La unión entre PI3K e IRS produce cambios en la subunidad reguladora de PI3K dando como resultado la activación de la subunidad catalítica de esta proteína. Como consecuencia, p110 se localiza cerca de la membrana plasmática, fosforila los sustratos PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI4,5-P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), generando los productos PIP2 (PI3,4-bisfosfato) y PIP3 (PI3,4,5-trisfosfato), respectivamente. Al PIP3 se unen quinasas de serina (Ser) como PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositidos-1), y Akt o proteína quinasa B (PKB)(61)

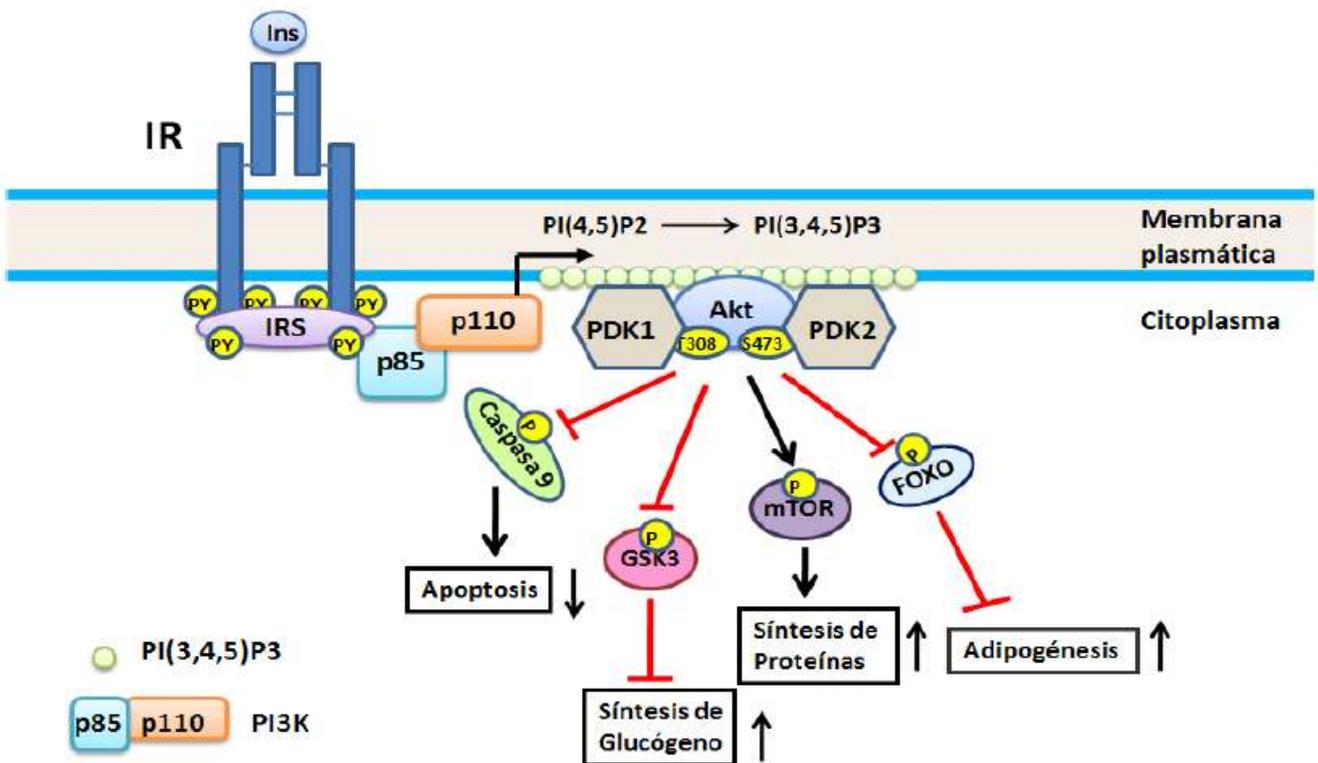


Figura 2. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina(62).

Cuando Akt es reclutada a la membrana, debe ser fosforilada en dos residuos (Ser473 y Thr308) para que se active completamente. Para que estas fosforilaciones ocurran, AKT debe interactuar con PDK1 y PDK2(63). Akt regula varios efectos metabólicos de la insulina, por medio de la fosforilación directa e indirecta de varios sustratos, que incluyen la enzima glucógeno sintasa (GS), la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la fosfofructoquinasa 2 (PFK2), la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), la caspasa 9 y la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD).

Adicional a todo lo anterior, la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática, por una vía que depende de PI3K y de Akt. EL mecanismo se muestra en la **Figura 3**. Diferentes evidencias indican que el transporte de GLUT4 a la membrana plasmática, depende de mecanismos en los que participa la proteína AS160 (sustrato de Akt de 160KDa), que cuando no está fosforilada, regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas

(Rab), que participan en el tráfico vesicular de GLUT4. Así es que cuando AS160 es fosforilada por Akt, la primera se inhibe y se incrementa el tráfico del transportador de GLUT4 a la membrana dependiente de Rab(63). Recientemente se describió en adipocitos, una vía de transporte de glucosa independiente de PI3K, que involucra a las proteínas Cbl, APS y CAP.

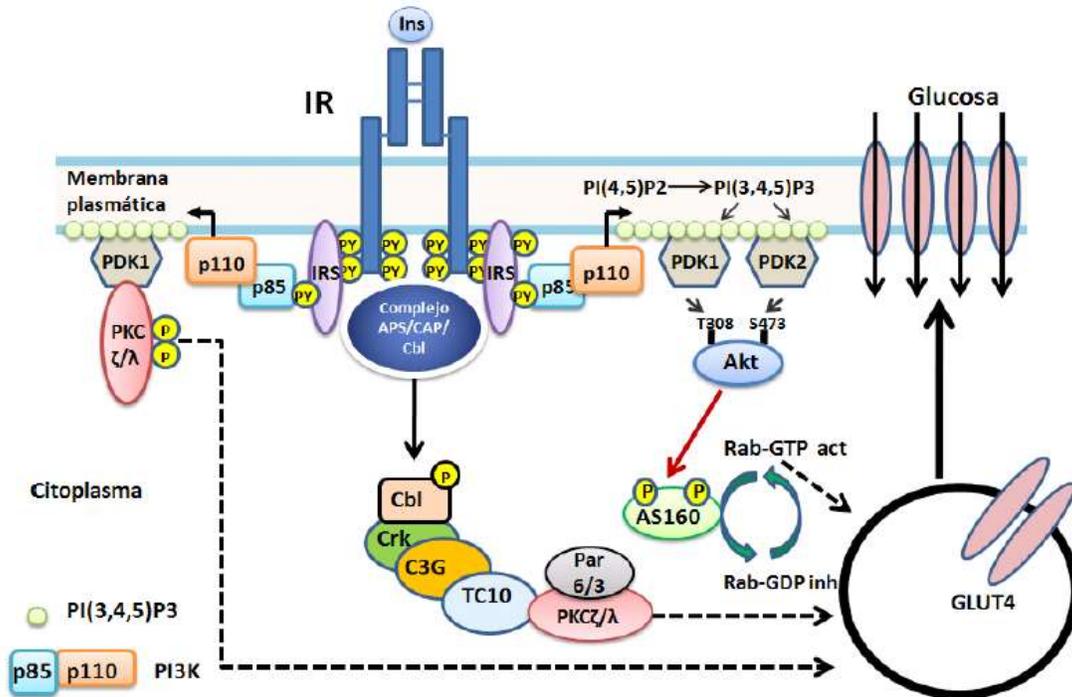


Figura 3. Regulación del transporte de glucosa por la insulina(62).

Cuando hay resistencia a la insulina (RI), las células que normalmente responden a la insulina dejan de hacerlo; se genera una disminución en el transporte de glucosa inducido por insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento en la producción de glucosa hepática y se altera el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo e hígado(64). Molecularmente, los mecanismos por los que se genera dicha resistencia pueden variar de un individuo a otro, pero en términos generales, la RI es la consecuencia de una deficiencia en la señalización de la insulina, causada por mutaciones o por modificaciones post-traduccionales del receptor de la insulina (IR) o de moléculas efectoras en la cascada de la señalización. En algunos casos la RI se debe a defectos en la unión de la insulina a su receptor, pero es más frecuente que existan alteraciones después de la unión de la insulina, que alteren la funcionalidad del receptor o la actividad de las proteínas localizadas en la ruta de señalización(65). Dentro de las alteraciones se encuentran la disminución de la cantidad de receptores, la disminución de la

obesidad y las limitaciones de los tratamientos convencionales, se ha empezado a considerar la medicina natural como una alternativa viable.

Algunos compuestos naturales con actividad inmunometabólica son los polifenoles (resveratrol), flavonoides (quercetina), fenoles (curcumina) y triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico, lactonas). Las estructuras químicas de dichos compuestos se pueden observar en la **Figura 5**.

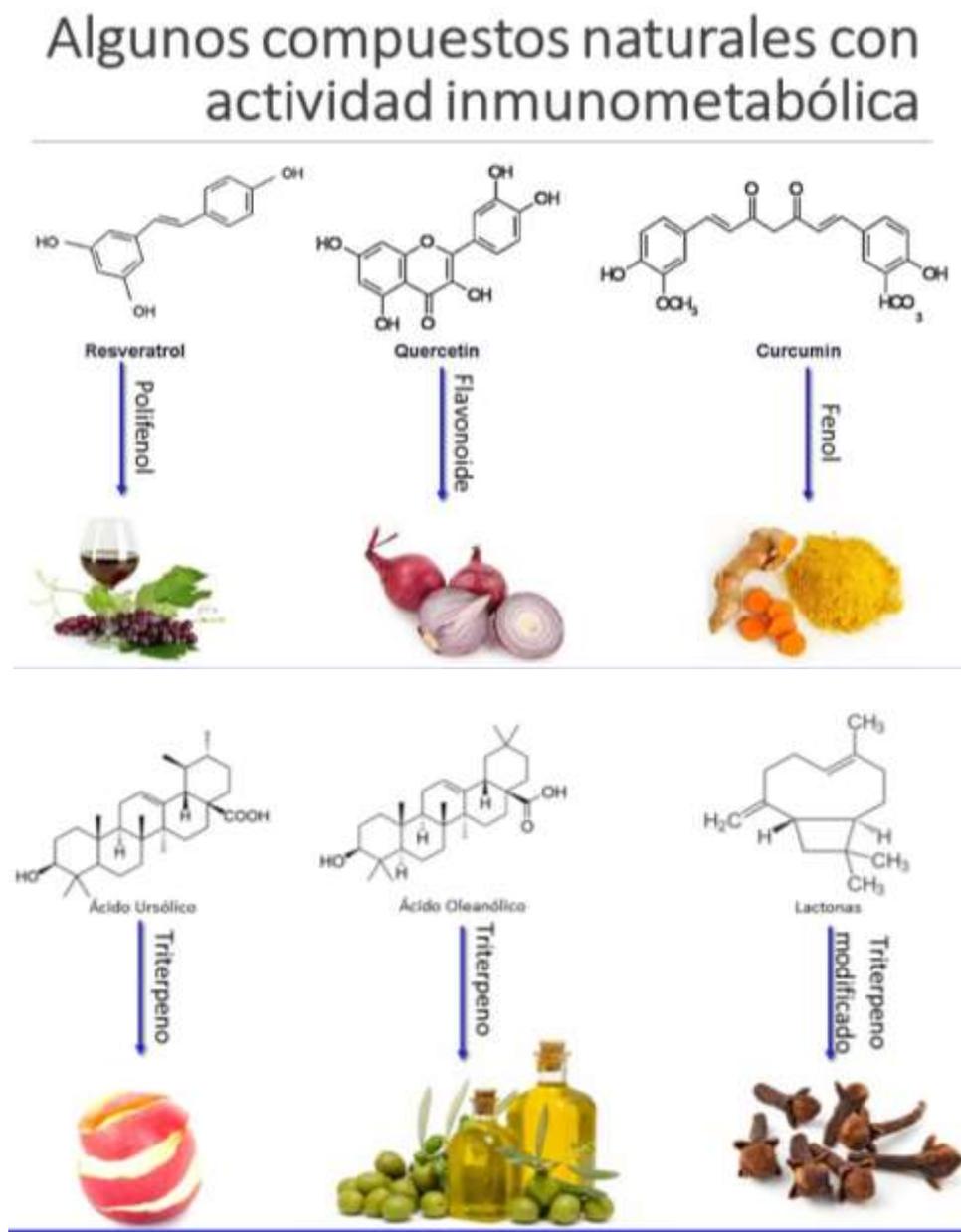


Figura 5. Estructura química de algunos compuestos naturales con actividad inmunometabólica.

En la Tabla 2 se pueden apreciar los efectos inmunometabólicos de algunos compuestos naturales.

Tabla 2. Efectos inmunometabólicos de algunos compuestos naturales.

| Resveratrol (RSV) | | Ref |
|--|--|------------|
| Fuente: RSV comprado en Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA y disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) | | (66) |
| Efecto | Modelo de estudio | |
| Disminución de la expresión transcripcional de MCP-1, IL-6, IL-1 β , PAL-1 | Tejido adiposo humano incubado en presencia y ausencia de IL-1 β y tratado con RSV. Medición por qRT-PCR | |
| Aumento en la expresión transcripcional de Adiponectina | | |
| Disminución de la expresión proteica de IL-6 | Tejido adiposo humano incubado en presencia y ausencia de IL-1 β y tratado con RSV. Medición por Elisa. | |
| Mecanismo de acción | | |
| Hallazgo | Modelo de estudio | |
| El efecto antiinflamatorio del RSV está mediado, al menos en parte, por la enzima Sirt1. Se midió la expresión transcripcional de MCP-1 y se encontró que el sirtinol contrarresta, en gran medida, el efecto del RSV. | Preadipocitos de cultivo primario humano totalmente diferenciados e incubados con IL-1 β , en presencia y ausencia de RSV y sirtinol (inhibidor de la actividad de Sirt1) por 24h. | |
| Fuente: RSV comprado en Calbiochem (San Diego, CA) | | (67) |
| Efecto | Modelo de estudio | |
| Aumenta la fosforilación de AMPK de forma dosis-dependiente | Células HepG2 tratadas con resveratrol durante 1h. Medición por Western Blot. | |
| Aumenta la fosforilación de ACC | | |
| Mecanismo de acción: RSV se une y activa a Sirt1 mediante el incremento de la afinidad de esta proteína a sus sustratos. Dado que el RSV no tiene un efecto en el estado energético de la célula (no varía el ratio ATP/AMP), se considera que este actúa creando un estado ficticio de restricción calórica, en el cuál, mediante la activación de Sirt1, se potencia la fosforilación de AMPK y ACC | | |

| QUERCETINA (QU) | | |
|---|--|------------|
| Fuente: QU comprado en Zelang Pharmaceutical Co., Ltd. (Nanjing, China) | | Ref |
| Efecto | Modelo de estudio | (68) |
| QU inhibe la diferenciación adipocitaria en células 3T3-L1. Diminuye la expresión transcripcional de AP2, C/EBP α y PPAR γ . | Modelo celular 3T3-L1 diferenciadas con hormonas y expuestas, en diferentes días de la diferenciación, a QU | |
| QU Revierte la resistencia a la insulina y normaliza los niveles de glucosa de los ratones obesos. | Ratones C57/BL6. Modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa, tratados 4 sem con QU | |
| QU disminuye los niveles de leptina en suero de ratones obesos | | |
| QU disminuye el peso de ratones obesos | | |
| Mecanismo de acción: QU inhibe la actividad transcripcional de PPAR γ inducida por rosiglitazona, indicando que QU actúa como antagonista de PPAR γ . Se confirmó la unión entre QU y PPAR γ y que QU compite con rosiglitazona por el sitio de unión de PPAR γ y logra desplazarla. | | |
| CURCUMINA (C) | | |
| Fuente: Comprado en Sigma | | Ref |
| Revierte la resistencia a la insulina y normaliza los niveles de glucosa de las ratas diabéticas | Ratas Wistar. Modelo DM2 (dieta alta en grasa + STZ 30 mg/kg de peso) Tratadas con 3 dosis de C | (69) |
| Aumenta la fosforilación de ACC y AMPK de forma dosis dependiente | Modelo celular L6 (mioblastos de músculo esquelético de rata) diferenciadas a miotubos con suero de caballo. Medio suplementados con diferentes concentraciones de C | |
| Disminuye la cantidad de ácidos grasos libres de forma dosis dependiente | | |
| Mecanismo de acción: C activa AMPK tanto en modelos in vitro como in vivo. | | |

| ÁCIDO URSÓLICO (AU) | | |
|---|---|------------|
| Fuente: El AU fue comprado en Sigma (St. Louis, MO, USA) | | Ref |
| Efecto | Modelo de estudio | (70) |
| Incrementa la captación de glucosa | Modelo celular 3T3-L1 diferenciadas con hormonas y expuesta a diferentes concentraciones de AU | |
| Potencia la expresión de GLUT4 y su translocación | | |
| Mecanismo de acción: AU incrementa la captación de glucosa a través de la regulación de la actividad de proteínas claves de la vía de señalización de PI3K (Akt, A160 y PDK) | | |
| Fuente: El AU fue obtenido de Enzo Life Sciences | | Ref |
| Efecto | Modelo de estudio | (70) |
| Reduce la obesidad inducida por dieta, la intolerancia a la glucosa y las enfermedades de hígado graso | Ratones C57/BL6. Modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa, suplementada con AU durante 6 semanas | |
| Incrementa el tejido adiposo marrón | | |
| Incrementa el gasto de energía | | |
| Mecanismo de acción: AU Incrementa la actividad de Akt en músculo esquelético e induce su hipertrofia | | |

Partiendo del hecho de que Colombia posee una gran biodiversidad y una amplia tradición en el uso de plantas medicinales, los grupos de Genética Molecular (GENMOL), y Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia, han estudiado los efectos metabólicos de plantas catalogadas como antidiabéticas en el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales, editado por el Ministerio de Protección Social de Colombia. Se evaluó el efecto de los extractos de Casco de vaca (Cv) y Eucalipto (Eu) sobre miotubos (C2C12) y células hepáticas (HepG2) resistentes a la insulina y se determinaron las fracciones responsables de la actividad; además se evaluó el efecto de los extractos en un modelo nutricional de DM2. La conclusión de dicho trabajo fue que tanto Cv como Eu, tienen potencial como hipoglicemiantes/antidiabéticos cuando se prueban en células C2C12 y HepG2 resistentes a la insulina. Además, la fracción con polaridad intermedia (rica en triterpenos) de Eu mejora la tolerancia a la glucosa y a la insulina en un modelo nutricional de DM2, efecto que se asocia, probablemente, con una disminución en la inflamación del tejido adiposo visceral. Dicha disminución se puede observar en la disminución de la expresión transcripcional de genes proinflamatorios (MCP-1, TNF α , IL-1 e IL-6). Se encontró además que la fracción con polaridad intermedia reduce la expresión de mRNA de glucosa 6 fosfatasa, lo que regularía negativamente la gluconeogénesis(71).

En el proyecto “Evaluación de la actividad de fracciones ricas en triterpenos de *Eucalyptus tereticornis*, sobre marcadores inmunometabólicos asociados a tejido adiposo de ratón: Contribución a la búsqueda de fármacos para el tratamiento de *Diabetes Mellitus Tipo 2*”, se pretende avanzar en la identificación de los posibles blancos farmacológicos para limitar la obesidad y/o sus consecuencias metabólicas, por medio de una mayor comprensión, a nivel celular, de los efectos del tratamiento con Fracciones ricas en triterpenos de *Eucalyptus tereticornis*, en líneas celulares de adipocitos y macrófagos de ratón.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar efectos de fracciones ricas en triterpenos de *Eucalyptus tereticornis* (Eu) sobre marcadores inmunometabólicos, en modelos in vitro e in vivo de tejido adiposo de ratón.

2.2 Específicos

- Determinar los efectos de fracciones ricas en triterpenos de *Eu*, sobre el contenido de ácidos grasos y la expresión de genes funcionales en la línea celular 3T3-L1.
- Determinar los efectos de fracciones ricas en triterpenos de *Eu*, sobre la expresión de genes pro-inflamatorios en la línea celular J774.
- Evaluar los efectos de fracciones ricas en triterpenos de *Eu*, sobre el estado oxidativo, en líneas celulares 3T3-L1 y J774.
- Evaluar los efectos de las fracciones ricas en triterpenos de *Eu*, sobre la expresión de genes funcionales de tejido adiposo en un modelo de pre-diabético de ratón.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Químicos y reactivos

Todos los solventes que se utilizan para la extracción y fraccionamiento: n-hexano, metanol, diclorometano y acetato de etilo, han sido previamente destilados a partir de fuentes comerciales, en el laboratorio de química orgánica de productos naturales. La cromatografía de capa delgada (CCD) se corre en cromatoplatos de gel de sílica previamente tratados con aluminio F254 (Merck, Darmstadt, Germany). La cromatografía de columna se realiza con Sephadex LH-20 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) y columnas de vidrio (60x7cm) rellenas de sílica gel 60H (Merck, Darmstadt, Germany). Las resonancias magnéticas nucleares RMN ¹H y RMN ¹³C y el espectro bidimensional se obtienen mediante un

espectrofotómetro AMX300 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) que opera a 300MHz para ^1H y a 75MHz para ^{13}C .

Phosphate buffered saline (PBS, 1x Gibco, Carlsbad, CA, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, bajo en glucosa), Suero fetal bobino, P/S penicilina/estreptomicina (P/S) a 10000 U/mL, glutamina e insulina a 100U/mL.

3.2 Extractos vegetales

Las hojas se recolectan de árboles de *Eu* en etapa de no florecimiento, en el corregimiento de Mariangola, Cesar, Valledupar - Colombia, a una temperatura promedio de 30°C.

El extracto crudo se extrae mediante una separación líquido-líquido con hexano:metanol:agua en proporciones 4:3:1; posteriormente se recoge la fase orgánica para reducir su volumen y luego se filtra al vacío. El precipitado que se forma se recolecta, almacena, y se denomina OBE100. Los compuestos presentes en OBE100 se siembran en una columna de sephadex LH -20 y son eluidos con la mezcla diclorometano:hexano:metanol en proporción 2:1:1. De este modo se obtienen 25 fracciones aproximadamente, que se agrupan en 10 fracciones, de acuerdo a la composición observada en la Cromatografía de capa fina (CCF). Las fracciones con mayor cantidad de compuestos violeta en un $R_f \approx 0.35$, luego de revelar con vainillina, se siembran en una columna de sílica 60 y son eluidas con la mezcla hexano:acetato de etilo en proporción 4:1, obteniéndose la fracción denominada OBE104.

Los compuestos mayoritarios de OBE100 y la composición química de OBE104 se identifican mediante RMN ^1H y RMN ^{13}C .

Cuando se habla de *las fracciones*, se hace referencia a OBE100 y OBE104 a las diferentes concentraciones de trabajo utilizadas para cada línea celular: 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ para células 3T3-L1, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ para células J774.

3.3 Mantenimiento de líneas celulares

La línea de fibroblastos 3T3-L1, es una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos y derivada de células de embrión de ratón (72), se adquiere de la ATCC (American Type Culture Collection) y se mantiene en frascos de cultivo de 75 cm^3 a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% CO_2 con medio de crecimiento (MC1): DMEM + Glucosa(25mM) + SFB(10%) + S/P(1%) + glutamina(2mM).

La línea celular J774, derivada de sarcoma reticular murino y con características de macrófagos peritoneales de ratón(73) se adquiere de la ATCC (American Type Culture Collection) y se mantiene en frascos de cultivo de 75 cm^3 a 37°C en una

atmósfera de 95% de aire y 5% CO₂ con medio de crecimiento (MC2): DMEM + Glucosa(5.5mM) + SFB(10%) + S/P(1%) + glutamina(2mM).

Tanto el MC1 como el MC2 se reemplazan cada dos días hasta que los cultivos alcanzan un máximo de confluencia del 80%.

3.4 Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros

Una vez las células 3T3-L1 alcanzan el 80% de confluencia en los frascos de 75 cm³, se siembran en platos de 24 pozos. Para despegarlas se tratan con tripsina-EDTA al 0,25% por 10 min a 37°C. La reacción de la tripsina se inactiva con MC1. Después de 48h de confluencia total, el MC1 se reemplaza por Medio de Diferenciación 1 (MD1): MC1 + Insulina (1µg/mL) + FBS (10%) + IBMX (0.5µM) + Dexametasona (0,25µM) + Rosiglitasona (2µM). Después de 48h con MD1, éste se sustituye con Medio de Diferenciación 2 (MD2): MC1 + Insulina (1µg/mL). Luego de 48h con MD2, las células se incuban con MC1 (con o sin las fracciones), el cual se refresca cada dos días hasta ajustar un total de 7 días. En este punto, se colecta el sobrenadante para la cuantificación de proteínas y/o lisados celulares para los análisis de expresión de RNAm, de acuerdo al experimento a realizar.

3.5 Activación de células J774 a su perfil proinflamatorio

Una vez las células J774 alcanzan el 80% de confluencia en los frascos de 75 cm³, se siembran en platos de 24 pozos. Para despegarlas se tratan con tripsina-EDTA al 0,25% por 10 min a 37°C. La reacción de la tripsina se inactiva con MC2. Cuando éstas células alcanzan el 80% de confluencia, el MC2 se sustituye con Medio de Activación (MA): MC2 + LPS (1µg/mL) + INF-γ (20ng/mL). Luego de 18 ó 24 horas el MA es cambiado por más MA con o sin las fracciones. En este punto, se colecta el sobrenadante para la cuantificación de proteínas y/o lisados celulares para los análisis de expresión de RNAm, de acuerdo al experimento a realizar

3.6 Ensayos de citotoxicidad

La actividad citotóxica de los extractos de Eu se evalúa sobre las células J774 y 3T3-L1. Para esto se realiza un ensayo colorimétrico que emplea la sal de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-Proteína Cebadores 2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). En este ensayo la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales reduce la sal, de color amarillo, a azul de formazán. El azul de formazán se puede solubilizar y cuantificar utilizando un espectrofotómetro y el resultado indica la proliferación celular.

Ambas líneas se siembran a una densidad de 25.000 células por pozo en placas de 24 pozos con MC1 o MC2 según el caso. Durante el protocolo de

Diferenciación o Activación, dependiendo del tipo celular, las células se exponen a diferentes concentraciones de las fracciones (25µg/mL y 50µg/mL para células 3T3-L1 y 50µg/mL y 100 µg/mL para células J774). Una vez transcurrido el tiempo de cada protocolo, se adicionan 20 µL de MTT y, al cabo de 3-4 h en atmosfera de 5 % CO₂ a 37°C, se descarta el medio y se adicionan 200 µL/pozo de DMSO para disolver los cristales de formazán. Una vez disueltos, se mide la densidad óptica a 570nm en el multilector de microplatos Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). Como control de viabilidad se usan células cultivadas en ausencia de las fracciones. Todas las condiciones se realizan por triplicado y los resultados se expresaron como concentración letal media (CL50), a partir de curvas de concentración–efecto (porcentaje de proliferación celular) mediante el análisis de regresión lineal, calculada por el método *Probit*.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de viabilidad por citometría de flujo, utilizando la solución de tinción 7AAD (7-Aminoactinomycin D), que es un compuesto químico fluorescente que se intercala en las regiones ricas en GC (guanina-citosina) del DNA. El 7AAD no es capaz de atravesar la membrana citoplasmática de células intactas; solo es difundido a través de las membranas rotas o que tengan alguna disrupción. Por este motivo, se utiliza como un marcador de viabilidad.

Cuando las células culminan el protocolo de diferenciación o activación según el tipo celular, se les adiciona 5µl de 7AAD por cada millón de células y se incuba 5 minutos. Se procede a realizar la lectura de fluorescencia en el Citómetro BD LSRFortessa™ (BD) a 650nm de absorvancia.

3.7 Análisis del contenido de triacilglicerol en células 3T3-L1

Para observar si el tratamiento afecta el proceso de lipólisis, las fracciones son adicionadas en el día 11 del protocolo de diferenciación descrito en el numeral 3.4 y se dejan durante 24h. La cantidad de triacilglicerol se cuantifica tiñendo las células 3T3-L1 por medio de la técnica de Oil Red. Para corroborar el resultado, se mide la concentración de ácidos grasos libres en sobrenadante de células 3T3-L1 utilizando el Free Fatty Acid Quantitation Kit (SIGMA-ALDRICH, St Louis, USA)

Para observar si el tratamiento afecta el proceso de lipogénesis, las fracciones son adicionadas en el día 4 del protocolo de diferenciación descrito en el numeral 3.4 y se dejan durante 7 días, refrescando el medio cada 2 o 3 días. El día 11, la cantidad de triacilglicerol se cuantifica tiñendo las células 3T3-L1 por medio de la técnica de Oil Red

EL Oil Red es un colorante que tiñe lípidos neutros (en este caso triacilgliceroles) de color rojo intenso con absorbancia de 518nm. Se prepara la solución stock mezclando 0.35g de Oil Red en 100ml de Isopropanol, agitando, filtrando y almacenando a 4°C. La solución de trabajo se realiza mezclando 6 partes de solución stock de Oil Red con 4 partes de H₂O. Se mezcla y se deja reposar

durante 20min. Cuando las células culminan el protocolo de diferenciación, se retira el medio y se agrega formalina incubando durante 15min; se retira la formalina y se pone más formalina fresca durante 1h; se lavan las placas con isopropanol al 60%; se dejan secar completamente las placas; se añade la solución de trabajo de Oil Red de manera que cubra la superficie de cada pozo y se incuba durante 30min; se elimina el Oil Red y se lavan las placas con H₂O. El residuo de cada pozo se diluye con isopropanol al 100% y se lee en el multilector de microplatos Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific), a una absorbancia de 500nm

3.8 Aislamiento de RNA, preparación de cDNA y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real qRT-PCR

Para observar si existe variación en la expresión de genes con actividad inmunometabólica en presencia de los tratamientos con las fracciones, se realizaron análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

Después de aplicar el protocolo de diferenciación a las células 3T3-L1 (numeral 3.4) tratando las células con las fracciones desde el día 4, durante 7 días, y el protocolo de activación a las células J774 (numeral 3.5) tratando las células con las fracciones desde la hora 18, durante 6 horas, el RNA total se aísla de las células usando un kit comercial (Qiagen Reasy MiniKit Cat.74104) y se cuantifica en un NanoDROP 2000 (Spectrophotometer Thermo Scientific).

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realiza con el sistema de síntesis para RT-PCR SuperScriptIII de Invitrogen (Cat. 18080-051) en un termociclador de BioRad (T100™ Thermal Cycler) utilizando 500ng de ARN total y un volumen final de la reacción de 20µl. El ARN se mezcla con una solución 1 que contiene: 50ng/µl de random hexamers y 10mM de mezcla de desoxinucleótidos (dNTP mix), agua tratada con DEPC y se incuba a 60°C por 5min. Transcurrido el tiempo, la solución 1 se mezcla con la solución 2, que contiene los siguientes reactivos: solución RT (10X, 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500nM KCl), 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, RNasa OUT 40U/µl y la transcriptasa reversa Super Script III RT 200U/µl, en un ciclo de 10min a 25°C seguido por 50min a 50°C y por último a 85°C por 5min.

La RT-PCR se realiza en un CFX96 Real Time System (BioRad), utilizando los cebadores descritos en la **Tabla 3**. La amplificación se realiza según las recomendaciones de la casa comercial (Thermo Scientific Cat. K0221). El volumen final de la reacción es de 25µl, compuesto para cada cebador por 12,5µl de SYBR Green/ROXqPCR Master Mix (2X), 1µl de cada uno de los cebadores (Solución stock de 100uM), 2µl de ADNc (500ng) y 8,5ul de agua libre de nucleasas. Se realiza un protocolo de cuatro pasos, que incluye la desnaturalización inicial de un ciclo a 95°C por 10min, desnaturalización a 95°C por 15s, la alineación a 60°C (50°C para Glut4) por 30s y la extensión a 72°C por 30s (estas tres últimas a 40

ciclos cada una). La fluorescencia se mide al final de cada paso de extensión. Después de la amplificación, las curvas alineamiento (Melting) se adquieren y usan para determinar los productos específicos de la PCR.

Por último, los datos obtenidos para cada gen se normalizan con respecto a los datos obtenidos para el gen constitutivo (Ciclofilina).

TABLA 3. Cebadores utilizados en qRT-PCR.

| Gen | Tipo celular | | Secuencia | T.M |
|----------------|--------------------|---|-----------------------------------|------|
| PPAR- γ | 3T3-L1/TAR | F | 5'-CACTCGCATTCTTTGAC-3' | 53°C |
| | | R | 5'-ACTTTGATCGCACTTTGG-3' | |
| C/EBP α | 3T3-L1/TAR | F | 5'-TGGACAAGAAGCAACAGCAACGAG-3' | 59°C |
| | | R | 5'-CCATGGCCTTGACCAAGGAG-3' | |
| aP2 | 3T3-L1/TAR | F | 5'-CATGGCCAAGCCCAACAT-3' | 58°C |
| | | R | 5'-CGCCCAGTTTGAAGGAAATC-3' | |
| Adiponectina | 3T3-L1/TAR | F | 5'-CCCAAGGGAAGTTGTGCAGGTTGGATG-3' | 64°C |
| | | R | 5'-GTTGGTATCATGGTAGAGAAGAAAGCC-3' | |
| Leptina | 3T3-L1/TAR | F | 5'-GCCAGGCTGCCAGAATTG-3' | 58°C |
| | | R | 5'-CTGCCCCAGTTTGATG-3' | |
| GLUT4 | 3T3-L1/TAR | F | 5'-CAGCTCTCAGGCATCAAT-3' | 53°C |
| | | R | 5'-TCTACTAAGAGCACCGAG-3' | |
| Ciclofilina | 3T3-L1/TAR J774 | F | 5'-GGAGATGGCACAGGAGGAA-3' | 60°C |
| | | R | 5'-GTAGTGCTCAGCTTGAAGTTCTCAT-3' | |
| TNF- α | J774 | F | 5'-CCCACACCGTCAGCCGATTT-3' | 62°C |
| | | R | 5'-GTCTAAGTACTTGGGCAGATTGACC-3' | |
| IL-6 | J774 | F | 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' | 62°C |
| | | R | 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3' | |
| MCP1 | J774 | F | 5'-TCAGCCAGATGCAGTTAACGC-3' | 62°C |
| | | R | 5'-TGATCCTCTTGTAGCTCTCCAGC-3' | |
| IL-1 β | J774 | F | 5'-AGAGCTTCAGGCAGGCAGTAT-3' | 60°C |
| | | R | 5'-GAAGGTGCTCATGTCTCATC-3' | |

Forward (F); Reverse (R); Temperatura de alineamiento (T.M)

3.9 Determinación de la concentración de leptina, adiponectina y resistina en sobrenadante de células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se sembraron y se les aplicó el protocolo de diferenciación del numeral 3.4, adicionando las fracciones en el día 4 durante 7 días. Una vez culminado el protocolo, se retiró y almacenó el sobrenadante. Las concentraciones de leptina, adiponectina y resistina en el sobrenadante de células 3T3-L1, se midieron usando kits comerciales de ELISA para cada adipoquina: Adiponectin Mouse Elisa kit, ab108785; Leptin Mouse ELISA Kit, ab100718; Resistin (RETN) Mouse ELISA Kit, ab108900. (Abcam, Cambridge, Reino Unido)

Los Kits cuentan con platos de 96 pozos pre-tratados con anticuerpos específicos para leptina, adiponectina y resistina. EL sobrenadante de las células y las muestras estándar son adicionados a los pozos y luego se agregan anticuerpos biotinilados de detección, específicos para cada adipoquina. Después de lavar con el buffer correspondiente, se adiciona el conjugado de streptavidina-peroxidasa y se lava nuevamente. Se utiliza TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) para visualizar la reacción enzimática. TMB es catalizado por la streptavidina-peroxidasa para originar un producto de color azul que cambia a amarillo después de adicionar la solución de parada. La densidad de la coloración amarilla es directamente proporcional a la cantidad de adipoquina capturada en el plato. Se lee en el multilector de microplatos Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). Se normalizó utilizando la cantidad total de proteína celular, cuantificada por el método Bradford.

3.10 Concentración de citoquinas proinflamatorias en sobrenadante de células J774

Las células J774 se sembraron y se les aplicó el protocolo de activación del numeral 3.5, tratando las células con las fracciones desde la hora 18, durante 6 horas. Una vez culminado el protocolo, se retiró y almacenó el sobrenadante. Las concentraciones de citoquinas proinflamatorias en sobrenadante se midieron mediante la técnica de CBA (Cytometric Bead Array), un kit que mide cuantitativamente los niveles en sobrenadante de Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10), Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), Interferón- γ (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral (TNF), e Interleuquina-12p70 (IL-12p70), (MS Inflammation CBA Kit 50TST).

La técnica de CBA consiste en un método de captura de un set de analitos solubles, por medio de perlas de un tamaño y fluorescencia conocidos, haciendo posible detectar los analitos por medio de citometría de flujo. Cada perla de captura del kit ha sido conjugada con un anticuerpo específico para cada proteína y la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de analitos unidos a las perlas. Se procede a realizar la lectura de fluorescencia en el Citómetro BD LSRFortessa™ (BD). Los resultados se normalizan utilizando la cantidad total de proteína, cuantificada por el método Bradford.

3.11 Determinación de la capacidad antioxidante de las fracciones (OBE100 y OBE104)

La capacidad antioxidante de las fracciones OBE100 y OBE104 fue medida *in vitro* (en tubos de ensayo) por la empresa AOXLAB, que realizó análisis de fenoles totales (análisis de Folin Ciocalteu), TBARS (sustancias reactivas del ácido 2-

tiobarbitúrico), FRAPS (Ferric reducing/antioxidant power), ABTS (Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox) Y ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno).

3.12 Determinación del estrés oxidativo en células 3T3-L1 y J774

Se mide la cantidad de especies reactivas de oxígeno de las células con y sin tratamiento, utilizando dihidrorodamina (DHR), que detecta la actividad peroxidasa (peroxinitritos) de la célula. DHR es un cromógeno no fluorescente, permeable a la membrana plasmática, que al ingresar a la célula, es oxidado por el H₂O₂ producido durante el estadió respiratorio. Dicha reacción conduce a la formación de 1,2,3 rodamina, que es una molécula fluorescente.

Después de aplicar el protocolo de diferenciación a las células 3T3-L1 (numeral 3.4) tratando las células con las fracciones desde el día 4, durante 7 días, y el protocolo de activación a las células J774 (numeral 3.5) tratando las células con las fracciones desde la hora 18, durante 6 horas, se suspenden las células en 500ml de PBS con 0.001mM de DHR, se incuba durante 15min y se realiza la lectura con el Citómetro BD LSRFortessa™ (BD), a una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 530nm.

3.13 Modelo animal de pre-diabetes

En este estudio se utilizan ratones machos C57BL/6J (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA, USA) con cuatro semanas de nacidos. Los ratones se mantienen a 22±2°C, con ciclos de 12h de luz y 12h de oscuridad, con acceso libre a alimento y agua durante 10 semanas. Los ratones son aleatoriamente distribuidos en 5 grupos. El grupo 1 (control) (n=10) es alimentado con una dieta normal (ND: 14%grasa - 54%carbohidratos - 32%proteínas). EL grupo 2 (n=13) es alimentado con una dieta rica en grasa (HFD: 42%grasa - 42%carbohidratos - 15%proteínas). El grupo 3 es alimentado con una dieta rica en grasa (HDF) y tratado con 200mg/Kg Metformina vía oral (3 dosis semanales durante 4 semanas). El grupo 4 es alimentado con una dieta rica en grasa (HDF) y tratado con 300mg/Kg de OBE100 vía intraperitoneal. (3 dosis semanales durante 4 semanas). El grupo 5 es alimentado con una dieta rica en grasa (HDF) y tratado con 300mg/Kg de OBE104 vía intraperitoneal. (3 dosis semanales durante 4 semanas). Todos los estudios animales han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Universidad de Antioquia (Protocolo número 65). Antes de tratar a los ratones con OBE100, OBE104 y Metformina, se les realiza un test de tolerancia a la glucosa (IPGTT)

donde se les administra una carga de glucosa de 2g/kg de peso corporal tras ayuno de 6 horas. Se les realiza un test de tolerancia a la insulina (ITT) después de 6 horas de ayuno. El nivel de glucosa en sangre se determina luego de inyectarles vía intraperitoneal, 0.75U/kg de insulina humana. La sangre para realizar la medición de glucosa se obtiene de la vena de la cola de los ratones, 0min, 15min, 30min y 60min después de inyectarlos, utilizando glucómetro GlucoQuick (Procaps, Barranquilla, Colombia. Después de los estudios metabólicos, los ratones son sacrificados. La sangre e hígado han sido colectados para futuros análisis; el tejido adiposo e hígado se utilizan para cuantificar la expresión de genes funcionales, según el numeral 3.8; de la sangre se obtiene el suero que se utiliza para medir niveles de insulina, glucosa y medir niveles circulantes de leptina, adiponectina y resistina.

3.14 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm ESM (error estándar de la media). Todos los análisis estadísticos se realizan utilizando el software Prism 4 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA). Para comparar los niveles de proteína en sobrenadante y de expresión de mRNA entre las diferentes condiciones, inicialmente se aplica un test de normalidad y posteriormente se realiza una ANOVA utilizando una prueba post hoc de Dunnett para comparar entre grupos. El valor máximo de significación es de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de la estructura química de las fracciones ricas en triterpenos

La extracción e identificación de las fracciones (OBE100 Y OBE104) fue realizada por el grupo de Química Orgánica de Productos Naturales de la Universidad de Antioquia, bajo la supervisión del profesor Fernando Echeverri. Una vez obtenidas las fracciones (OBE100 y OBE104) con el procedimiento del numeral 3.2, se corrieron en una Cromatografía de Capa Fina (CCF), con el fin de comprobar la presencia de triterpenos. Posteriormente se realizaron cromatografías líquidas de alta eficacia (HPLC) para separar los componentes de cada fracción, basándose en los diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias que las componen y la columna cromatográfica. Finalmente, se realizaron espectroscopias de resonancia magnética nuclear (RMN) con núcleos de ^1H y ^{13}C para elucidar las estructuras moleculares de los compuestos de las fracciones. En la **Figura 6** se puede observar el perfil cromatográfico de ambas fracciones. Además se aprecia que OBE104 contiene principalmente triterpenos (ácido ursólico y ácido

oleanólico) y OBE100 contiene principalmente triterpenos (ácido ursólico y ácido oleanólico) y además una lactona (3b-hidroxi-urs-11-en-28,13 b-ólido).

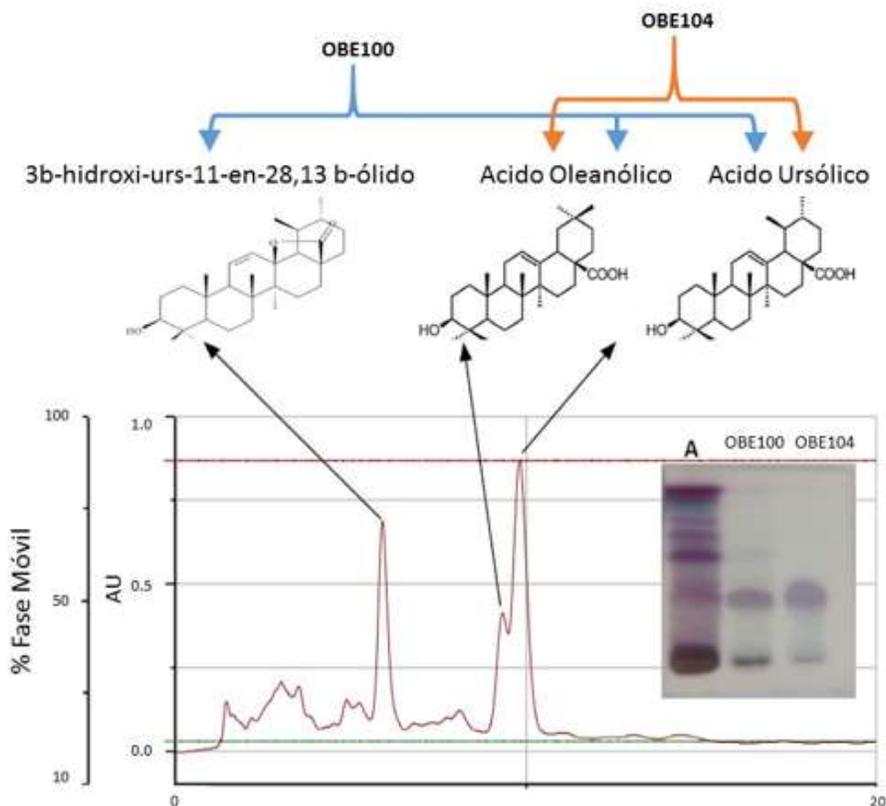


Figura 6. Estructura química de los componentes mayoritarios presentes en las fracciones de Eu. Después de obtener las fracciones (OBE100 y OBE104), se realizó CPF para identificar la presencia de triterpenos. Posteriormente se corrió HPLC para cada fracción y así identificar los tipos de moléculas que las componen. Finalmente se realizaron RMN para identificar la estructura molecular de los compuestos de las fracciones.

Dado que el ácido ursólico y el ácido oleanólico están eluyendo juntos, se obtuvo el dato de que el OBE100 está conformado por un 61% de la mezcla AU+AO aproximadamente y el OBE104 está conformado por un 93% de la mezcla AU+AO aproximadamente. Se estimó que 100 μ g/mL de OBE100 contienen aproximadamente 118,4 μ M de AU y 15,33 μ M de AO, 50 μ g/mL de OBE100 contienen aproximadamente 59,12 μ M de AU y 7,67 μ M de AO y 25 μ g/mL de OBE100 contienen aproximadamente 29,56 μ M de AU y 3,83 μ M de AO. Además se estimó que 100 μ g/mL de OBE104 contienen aproximadamente 197 μ M de AU y 6,57 μ M de AO, 50 μ g/mL de OBE104 contienen aproximadamente 98,5 μ M de AU y

3,28 μ M de AO y 25 μ g/mL de OBE100 contiene aproximadamente 49,5 μ M de AU y 1,64 μ M de AO.

4.2 Ensayos de citotoxicidad

En los diferentes experimentos del presente proyecto se aplicó el protocolo de diferenciación a las células 3T3-L1 (numeral 3.4), tratando las células con las fracciones desde el día 4, durante 7 días como se observa en la **Figura 7a**, y el protocolo de activación a las células J774 (numeral 3.5) tratando las células con las fracciones desde la hora 18, durante 6 horas, como se observa en la **Figura 7b**. En primer lugar se evaluó si las fracciones tienen un efecto tóxico sobre las células usadas como modelo; 3T3-L1 y J774 en los tiempos respectivos de tratamiento. Para éste fin, se realizaron experimentos con MTT y citometría utilizando 7AAD, como se describe en el numeral 3.6.

El resultado del MTT para células 3T3-L1 y J774 se presenta en las Figuras 7c y 7d respectivamente. Se puede observar que, según los resultados de esta técnica, los extractos no presentan citotoxicidad, sobre ninguna de las dos líneas celulares, en las concentraciones establecidas.

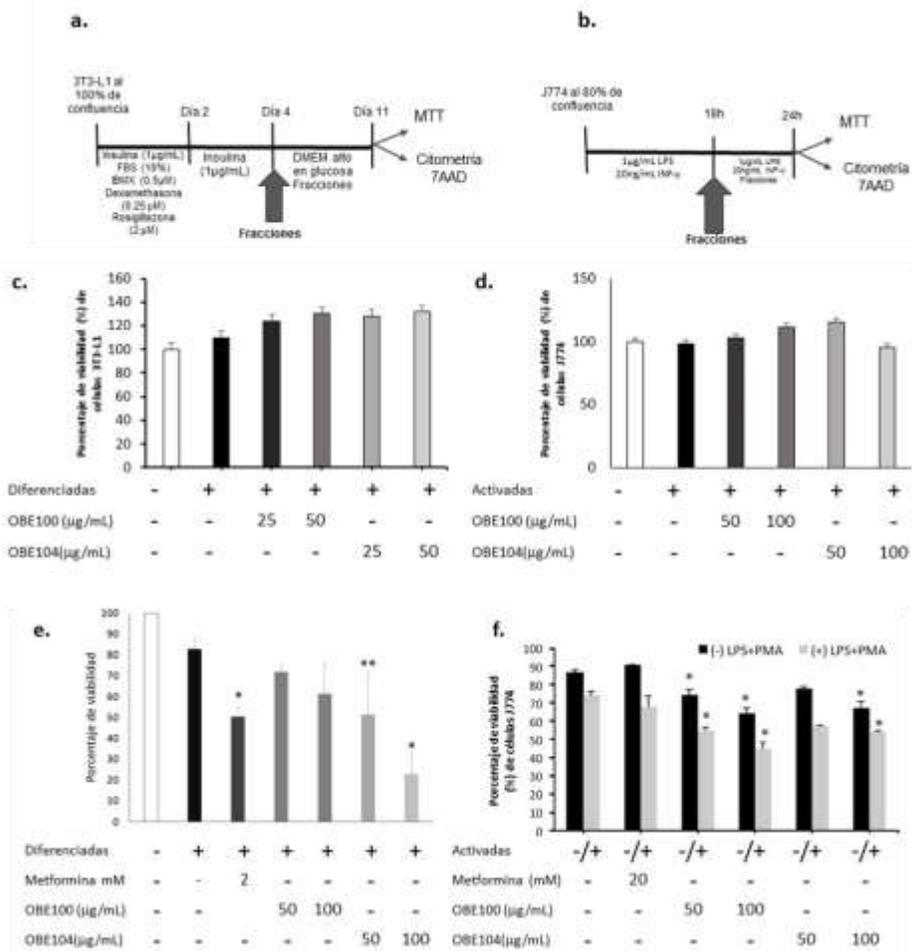


Figura 7. Ensayos de citotoxicidad. Se aplicó el protocolo de diferenciación a las células 3T3-L1 y se trataron con las fracciones durante 7 días **(a)**. Se aplicó el protocolo de activación a las células J774 y se trataron con las fracciones durante 6h **(b)**. Posteriormente, se realizó la técnica MTT a las células 3T3-L1 **(c)** y a las células J774 **(d)** y se cuantificó la viabilidad celular utilizando un lector de microplatos. Además, utilizando la técnica de citometría con 7AAD, se cuantificó también la viabilidad de las células 3T3-L1. **(e)** y de las células J774 **(f)**. El resultado expresa la media±ES de tres experimentos independientes. *p<0.01 vsControl, **p<0.05vsControl

El resultado de la citometría utilizando 7AAD se puede observar en las **Figuras 7e** y **7f**, para células 3T3-L1 y J774 respectivamente. Utilizando esta técnica, se encuentra que OBE100 a ambas concentraciones (50µg/mL y a 100µg/mL) y OBE104 a 100µg/mL disminuyen significativamente la viabilidad celular tanto en células J774 activadas (+LPS,PMA) como no activadas (-LPS,PMA). Sin embargo la fracción OBE104 a 50µg/mL no afecta significativamente la viabilidad celular de J774. También se puede observar que las células 3T3-L1 diferenciadas y tratadas con OBE100 no presentan una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad respecto al control. Por el contrario, las células 3T3-L1 diferenciadas presentan una disminución significativa respecto al control al ser tratadas con OBE104 a ambas concentraciones

4.3 Efecto del tratamiento con las fracciones en la acumulación lipídica en preadipocitos y adipocitos 3T3-L1

Inicialmente se observó el efecto de las fracciones en la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3-L1. Para esto, se trataron los preadipocitos con las fracciones y se comparó con preadipocitos tratados con las hormonas, como se explica en el numeral 3.4. En la **Figura 8**, se puede observar que las fracciones no tienen ningún efecto significativo en la diferenciación de células 3T3-L1.

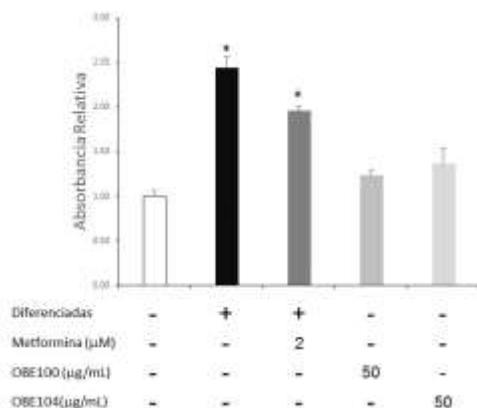


Figura 8. Efecto de tratamiento con las fracciones, en la diferenciación de células 3T3-L1. Preadipocitos 3T3-L1 fueron tratados con las fracciones OBE100 y OBE104 a 50µg/mL desde el día 1 y durante los 11 días del protocolo de diferenciación y comparados con preadipocitos 3T3-L1 a los que se les aplicó el protocolo descrito en la **Figura 9a**. Se utilizó la Metformina como control para comparar el tratamiento con las fracciones y el medicamento más utilizado en el tratamiento de *Diabetes Mellitus* tipo 2. Posteriormente las células fueron teñidas con Oil Red. La acumulación lipídica se cuantificó utilizando un lector de microplatos. La información mostrada representa la media±ES de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos individuales. *p<0.01 vs Control

El efecto del tratamiento con las fracciones sobre la acumulación lipídica se evaluó a nivel de lipogénesis, aplicando el protocolo descrito en la **Figura 9a**. Se realizó la cuantificación de triacilgliceroles utilizando la tinción con Oil Red descrita en el numeral 3.7.

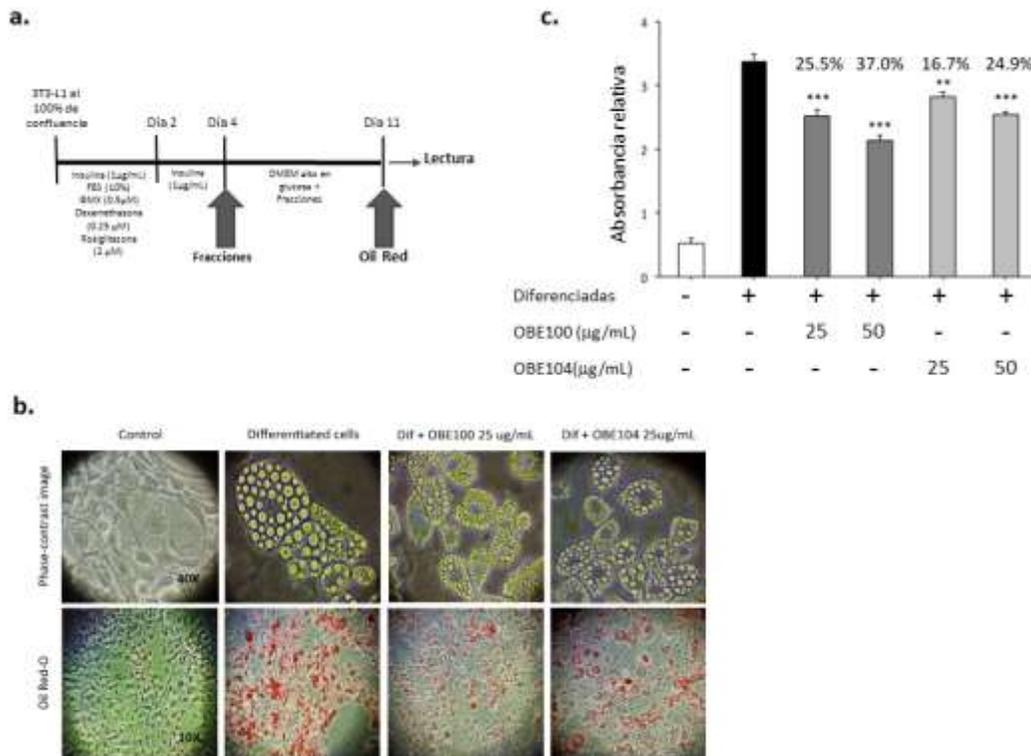


Figura 9. Efecto de 7 días de tratamiento con las fracciones, en la acumulación lipídica de células 3T3-L1. Los preadipocitos 3T3-L1, fueron tratados con las fracciones OBE100 y OBE104 a 25µg/mL y 50µg/mL durante los 7 días de carga lipídica **(a)**. Posteriormente las células fueron teñidas con Oil Red **(b)**. La acumulación lipídica se cuantificó utilizando un lector de microplatos **(c)**. La información mostrada representa la media±SE de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos individuales. **p<0.01 vs. (Células diferenciadas), ***p<0.001 vs. (Células diferenciadas)

En la **Figura 9b**, se observa que hay una disminución tanto en el tamaño celular como el tamaño de las gotas lipídicas de las células 3T3-L1 tratadas con las fracciones; se observa también cómo la intensidad del colorante rojo es mayor en las células que no están tratadas con las fracciones. Dicho resultado se corrobora con la cuantificación observada en la **Figura 9c**, donde la absorbancia relativa de las células tratadas con las fracciones es significativamente menor comparada con las células no tratadas con las fracciones. De acuerdo con esto, se puede concluir que el contenido intracelular de triacilgliceroles, se reduce en células 3T3-L1 tratadas con las fracciones de Eu durante la fase de carga lipídica (7 días), lo que indica que las fracciones están afectando la lipogénesis.

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento con las fracciones a nivel de lipólisis, aplicando el protocolo descrito en la **Figura 10a**. Se realizó la cuantificación de triacilgliceroles utilizando la tinción con Oil Red descrita en el numeral 3.7.

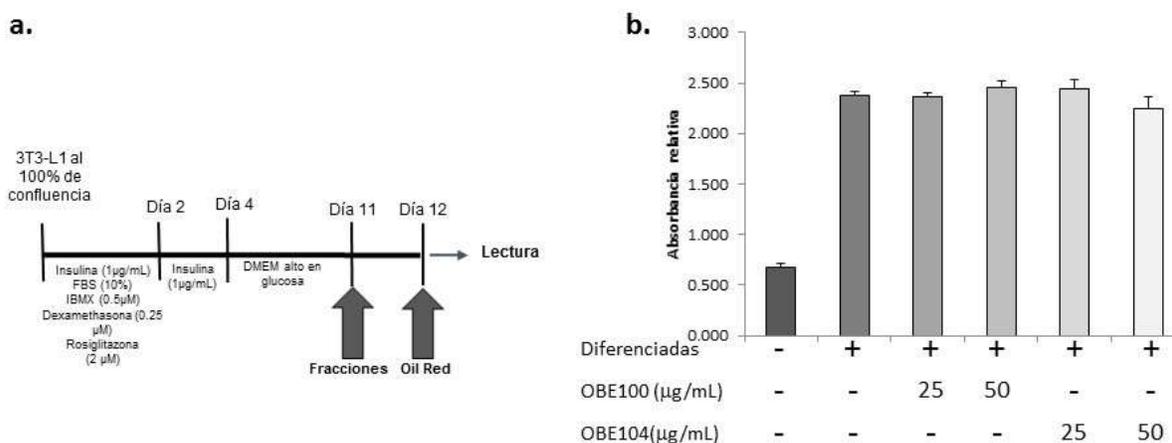


Figura 10. Efecto de 24h de tratamiento con las fracciones, en la acumulación lipídica en células 3T3-L1. Los preadipocitos 3T3-L1, fueron tratados con las fracciones OBE100 y OBE104 a 25µg/mL y 50µg/mL durante 24h después de los 7 días de la carga lipídica **(a)**. Posteriormente las células fueron teñidas con Oil Red **(b)**. La acumulación lipídica se cuantificó utilizando un lector de microplatos. La información mostrada representa la media±SE de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos individuales.

En la **Figura 10b** se puede observar que no hay cambios significativos en la absorbancia relativa de las células tratadas con las fracciones, comparada con las células no tratadas con ellas. De acuerdo con esto, se puede concluir que el contenido intracelular de triacilgliceroles, no se reduce en células 3T3-L1 tratadas con las fracciones 24h después la fase de carga lipídica, lo que indica que las fracciones no están promoviendo la lipólisis en los tiempos establecidos. Esto se

corroboró cuando no se encontraron ácidos grasos libres en sobrenadantes, aplicando el protocolo del numeral 3.7.

4.4 Efecto de las fracciones en la expresión de Genes funcionales en células 3T3-L1

4.4.1 Expresión transcripcional

Para cuantificar la transcripción de genes funcionales en células 3T3-L1, se aplicó inicialmente el protocolo de la **Figura 11a**. posteriormente, se realizó la extracción de mRNA de las células, se retrotranscribió a cDNA y se realizó una RT-PCR siguiendo el protocolo del numeral 3.8.

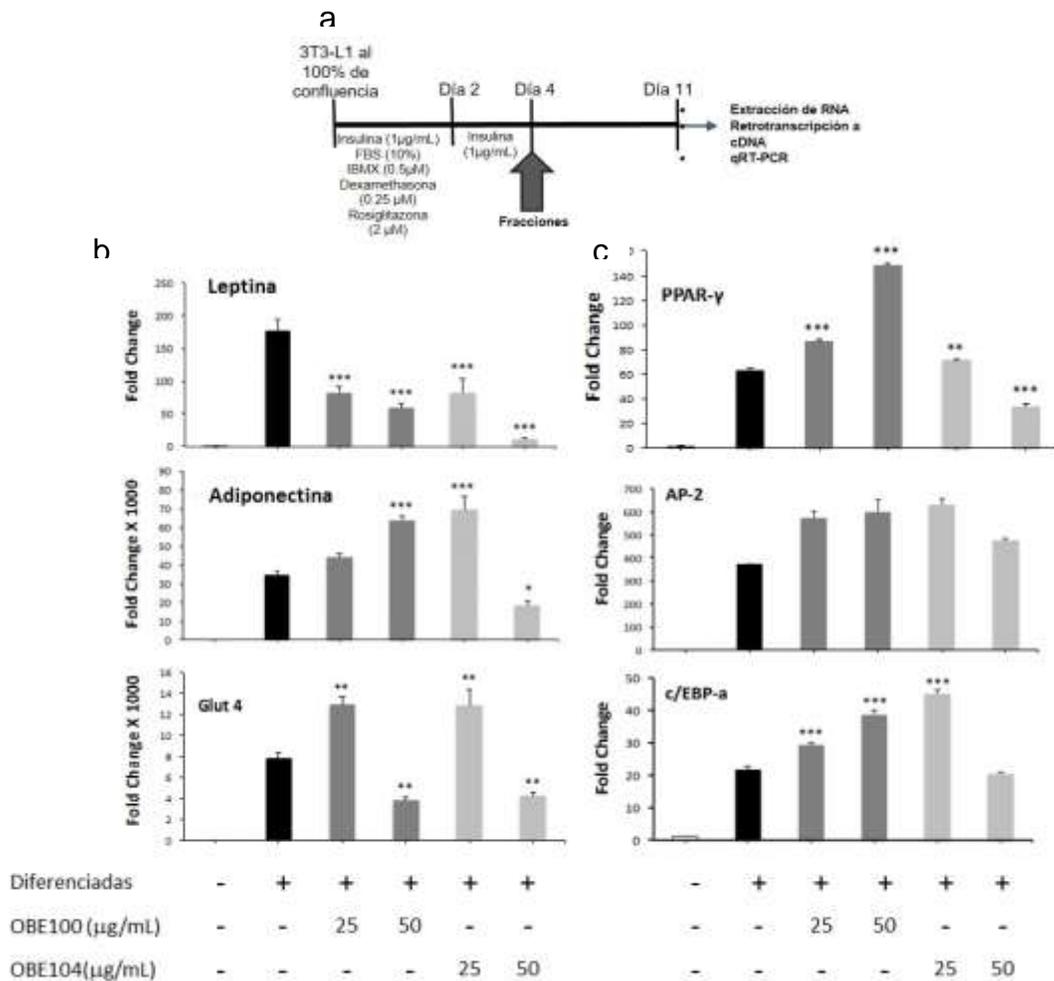


Figura 11. Efecto de las fracciones en la transcripción de genes funcionales en células 3T3-L1. Los preadipocitos 3T3-L1 fueron tratados con las fracciones OBE100 y OBE104 a 25µg/mL y 50µg/mL durante los 7 días de carga lipídica **(a)**. Expresión relativa (Fold change) de los transcritos

de mRNA de un experimento representativo para genes funcionales (Leptina y Adiponectina y Glut4) **(b)** y para genes adipogénicos (PPAR γ , aP2 y C/EBP) **(c)**; La información mostrada representa la media \pm SE, normalizada con la expresión del gen *Ciclofilina*. Se realizaron tres experimentos individuales.*p<0.05 vs. (Células diferenciadas) **p<0.01 vs. (Células diferenciadas), ***p<0.001 vs. (Células diferenciadas)

En la **Figura 11b**, se puede apreciar que el tratamiento de las células 3T3-L1 con las fracciones disminuye significativamente la expresión transcripcional de Leptina de forma dosis dependiente. Por otro lado, el tratamiento con OBE100 a 50 μ g/mL y OBE104 a 25 μ g/mL aumenta significativamente la expresión transcripcional de Adiponectina y, por el contrario, OBE104 a 50 μ g/mL la disminuye significativamente. También se observa que las fracciones a 25 μ g/mL, aumentan la expresión transcripcional de Glut4 mientras que ambas fracciones a 50 μ g/mL disminuyen dicha expresión; En la **Figura 11c** se observa que OBE100 a ambas concentraciones y OBE104 a 25 μ g/mL aumentan la expresión de PPAR γ mientras que OBE104 a 50 μ g/mL disminuye dicha expresión. se aprecia también que las fracciones no modifican significativamente la expresión de AP2 aunque hay una tendencia a aumentar, mientras que OBE100 a ambas concentraciones y OBE104 a 25 μ g/mL aumentan de manera significativa la expresión de C/EBP.

4.4.2 Expresión proteica

Se evaluó la cantidad de leptina, adiponectina y resistina en el sobrenadante de las células 3T3-L1. Se aplicó el protocolo de la **Figura 12a**. Posteriormente, se realizó la cuantificación de la dichas proteínas en el sobrenadante de las células, siguiendo el protocolo del numeral 3.9.

En la **Figura 12b** se puede apreciar que las fracciones, en las concentraciones utilizadas, disminuyen significativamente la cantidad de Leptina en el sobrenadante de las células 3T3-L1 de forma dosis dependiente. OBE104 a 25 μ g/mL aumenta significativamente la expresión proteica de adiponectina y resistina, como se observa en las **Figuras 12c y 12d**, mientras que OBE100a 50 μ g/mL disminuye significativamente la expresión de resistina, como se observa en la **Figura 12d**.

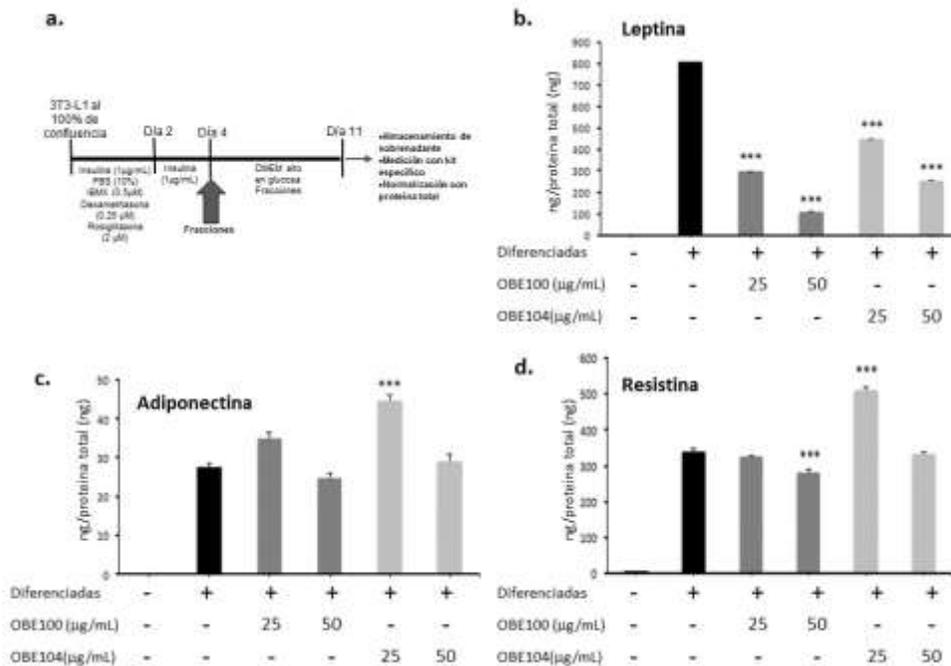


Figura 12. Efecto de las fracciones en la expresión proteica de Leptina, Adiponectina y Resistina en células 3T3-L1. Los preadipocitos 3T3-L1 fueron tratados con las fracciones OBE100 y OBE104 a 25 μg/mL y 50 μg/mL durante los 7 días de carga lipídica (a). ng de Leptina por ng de proteína total (b), ng de Adiponectina por ng de proteína total (c) ng de Resistina por ng de proteína total (d); La información mostrada representa la media ± SE, normalizada con la cantidad de proteína total, de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes. ***p < 0.001 vs. (Células diferenciadas)

4.5 Efecto de las fracciones en la expresión de Genes proinflamatorios en células J774

4.5.1 Efecto de las fracciones en la activación del perfil proinflamatorio de las células J774

En primer lugar se estudió el efecto de las fracciones en la activación del perfil proinflamatorio de células J774. Para esto, se trataron con las fracciones las células sin activar y se compararon con células activadas como se explica en el numeral 3.5. Tras el tratamiento, se realizó la extracción de mRNA de las células, se retrotranscribió a cDNA y se realizó una RT-PCR siguiendo el protocolo del numeral 3.8. En la **Figura 13**, se puede observar que las fracciones no tienen ningún efecto significativo en la activación del perfil proinflamatorio de las células J774, ya que no hay un aumento significativo en la expresión transcripcional de IL-6 e IL-1β en las células tratadas con las fracciones.

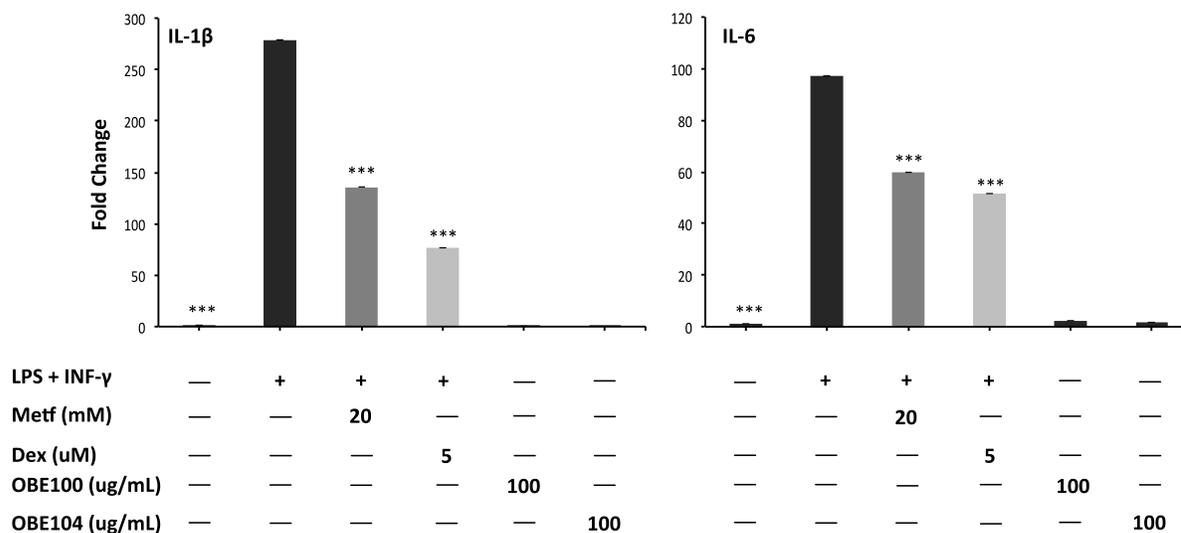


Figura 13. Efecto de tratamiento con las fracciones en la activación del perfil proinflamatorio en células J774. Células J774 sin activar fueron tratadas con las fracciones OBE100 y OBE104 a 100μg/mL durante 24h y comparadas con células J774. Debido a que la Metformina es el medicamento más utilizado en el tratamiento de *Diabetes Mellitus* tipo 2, se usó como control para comparar su efecto antiinflamatorio con el efecto del tratamiento con las fracciones. Debido a que la Dexametasona es un medicamento utilizado para el manejo de la inflamación, se usó como control para comparar su efecto antiinflamatorio con el efecto del tratamiento con las fracciones. Expresión relativa (Fold change) de los transcritos de mRNA de un experimento representativo para IL-6 e IL-1β. La información mostrada representa la media±SE. Se realizaron tres experimentos independientes. ***p<0.001 vs. (Células J774 sin activar y sin ningún tratamiento)

4.5.2 Expresión transcripcional

Para cuantificar la transcripción de genes proinflamatorios en células J774, se aplicó el protocolo de la **Figura 14a**. posteriormente, se realizó la extracción de mRNA de las células, se retrotranscribió a cDNA y se realizó una RT-PCR siguiendo el protocolo del numeral 3.8.

En las **Figuras 14b, 14c y 14d**, se puede apreciar que el tratamiento de las células J774 con las fracciones a las concentraciones utilizadas, disminuye significativamente la expresión transcripcional de IL-6, TNFα e IL-1β, y esta de forma dosis dependiente.

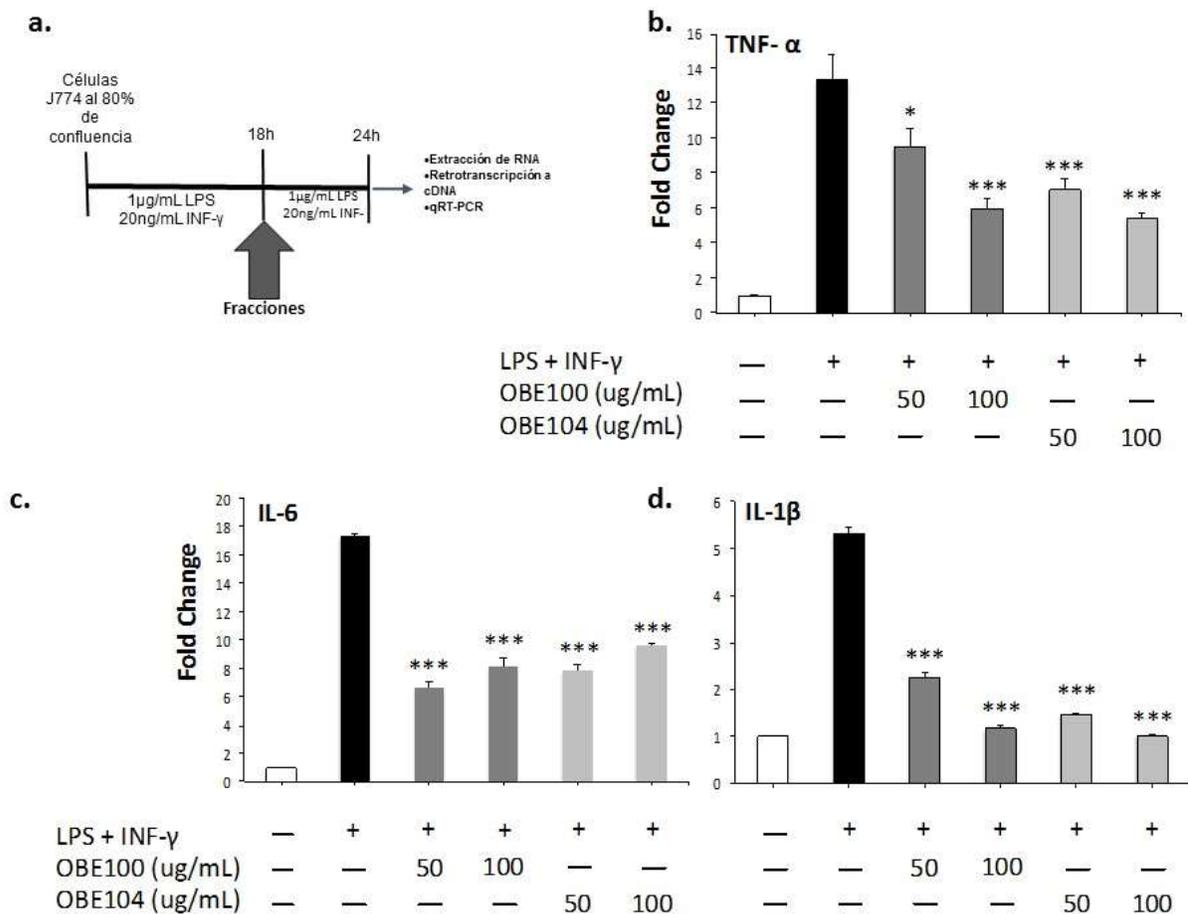


Figura 14. Efecto de las fracciones en la transcripción de genes proinflamatorios en células J774. Las células fueron tratadas con las fracciones OBE100 y OBE104 a 50µg/mL y 100µg/mL durante 6h (a). Expresión relativa (Fold change) de los transcritos de mRNA de un experimento representativo para TNF α (b), IL-6 γ (c) y IL-1 β (d); La información mostrada representa la media \pm SE, normalizada con la expresión del gen *Ciclofilina*. Se realizaron tres experimentos individuales. *p<0.05 vs. (Células activadas), ***p<0.001 vs. (Células activadas)

4.5.3 Expresión proteica

Para evaluar la cantidad de TNF α , IL-6 e IL-1 β en el sobrenadante de células J774, se aplicó el protocolo de la **Figura 15a**. Posteriormente, se realizó la cuantificación de dichas proteínas en el sobrenadante de las células, siguiendo el protocolo del numeral 3.10.

En la **Figura 15b** se puede apreciar que las fracciones, en las concentraciones utilizadas, disminuyen significativamente la cantidad de TNF α e IL-6 y hay una tendencia a disminuir MCP-1 en el sobrenadante de células J774.

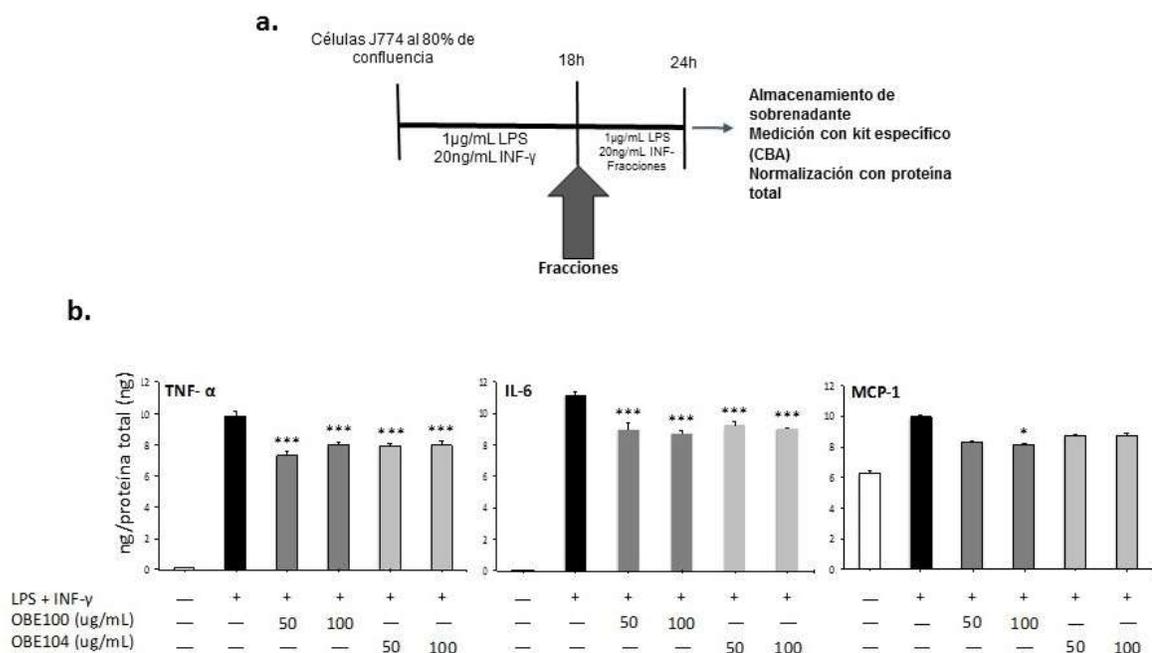


Figura 15. Efecto de las fracciones en la expresión de proteínas proinflamatorias en células J774. Las células J774 fueron tratadas con las fracciones OBE100 y OBE104 a 50µg/mL y 100µg/mL durante 6h (a). ng de citoquina proinflamatoria por ng de proteína total (b). La información mostrada representa la media±SE, normalizada con la cantidad de proteína total, de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes. *p<0.05 vs. (Células activadas), ***p<0.001 vs. (Células activadas)

4.6 Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células 3T3-L1 y J774

4.6.1 Capacidad antioxidante de las fracciones.

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos, se realizaron las pruebas descritas en el numeral 3.11. En la **Tabla 3**, se observan los valores para cada parámetro medido. Se puede apreciar que OBE104 tienen más fenoles totales que OBE100, aunque se observa significativamente menos cantidad de TEP (proteínas que contienen Tioester)

Tabla 3. Capacidad antioxidante de las fracciones

| Muestras | Fenoles Totales | | TBARS | | FRAP | | ABTS | | ORAC | |
|----------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | mg ac gálico/g extracto | mg ac gálico/100 g extracto | mg TEP/g extracto | mg TEP/100g extracto | mg AA /g extracto | mg AA /100g extracto | μmol trolox/mg extracto | μmol trolox/100m g extracto | μmoles Trolox/mg extracto | μmoles Trolox/mg extracto |
| OBE104 | 322,92 | 32291,67 | 0,96 | 96,20 | 17,23 | 1723,48 | 9,25 | 925,04 | 0,69 | 69,36 |
| OBE100 | 175,53 | 17553,19 | 0,16 | 16,20 | 8,26 | 826,28 | 6,30 | 629,86 | 0,98 | 98,47 |

4.6.2 Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células 3T3-L1

Para cuantificar el estallido oxidativo en células 3T3-L1, se aplicó el protocolo de la **Figura 16a**. Posteriormente, se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.12. Como se puede observar en la **Figura 16b**, se encontró que las células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas con los extractos y sin tratar, no muestran una diferencia estadísticamente significativa en el estallido oxidativo respecto a las células 3T3-L1 sin diferenciar.

4.6.3 Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células J774

Para cuantificar el estallido oxidativo en células J774, se aplicó el protocolo de la **Figura 16c**. Posteriormente, se realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.12. Como se puede observar en la **Figura 16d**, las fracciones aumentan significativamente el estallido oxidativo en células J774 sin activar con LPS y PMA (barras oscuras). En contraste, las fracciones no tienen ningún efecto en el estado oxidativo de las células J774 activadas (barras claras). En las células 3T3-L1 diferenciadas tratadas y sin tratar no se evidenciaron diferencias en el estallido oxidativo respecto a las células 3T3-L1 sin diferenciar, como se observa en la figura 16b.

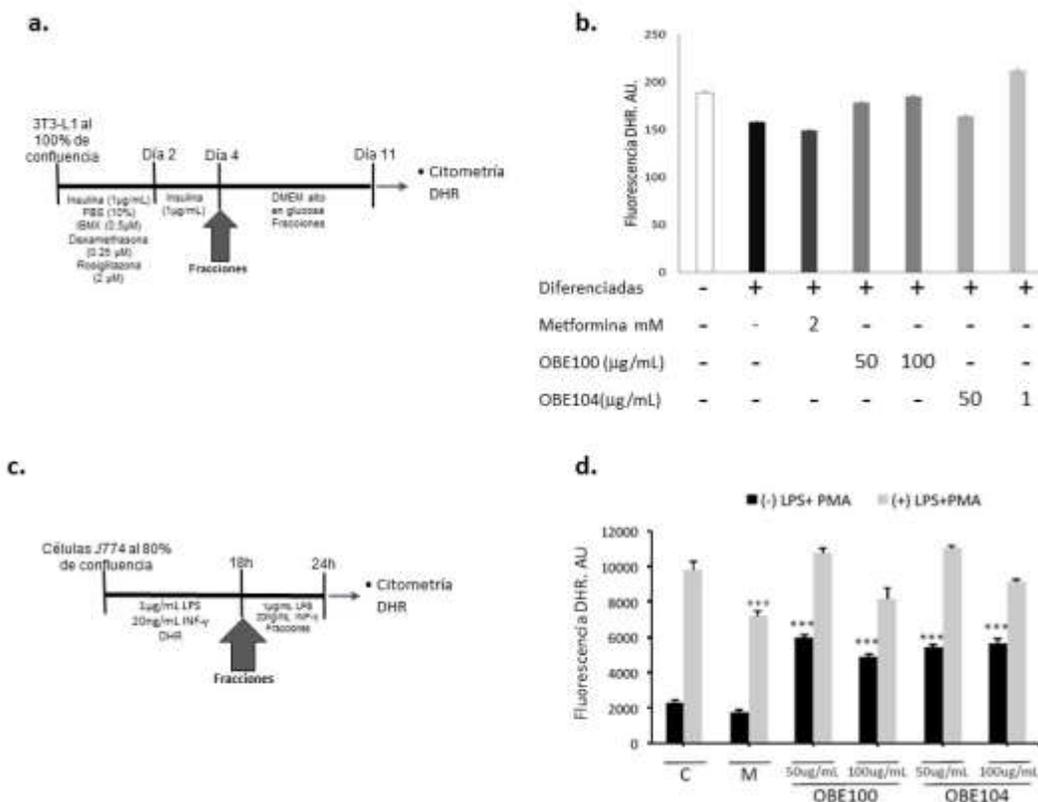


Figura 16. Efecto de las fracciones en el estado oxidativo de las células J774. Las células 3T3-L1 fueron tratadas con las fracciones OBE100 y OBE104 a 25µg/mL y 50µg/mL durante los 7 días de carga lipídica **(a)**. Las células J774 fueron tratadas con las fracciones OBE100 y OBE104 a 50µg/mL y 100µg/mL durante 6h **(c)**. Fluorescencia del DHR. C: Control. M: Metformina a 20µM **(d)** y M: Metformina a 2 µM. La información mostrada representa la media±SE de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes. ***p<0.001vs.(C (+)LPS+PMA), ***p<0.001vs.(C (-)LPS+PMA)

4.7 Efecto de las fracciones en la expresión de Genes funcionales tejido adiposo de ratón

4.7.1 Expresión transcripcional

Para cuantificar la transcripción de genes funcionales en tejido adiposo de ratón, se realizó la extracción de mRNA del tejido, se retrotranscribió a cDNA y se realizó una RT-PCR siguiendo el protocolo del numeral 3.8.

En este modelo, la expresión transcripcional de Adiponecina y de PPAR γ no se ve alterada significativamente por las fracciones, como se puede observar en las **Figuras 17a y 17c**. Por el contrario, como se aprecia en las **Figuras 17b y 17d**, las fracciones disminuyen significativamente la expresión de leptina y AP2

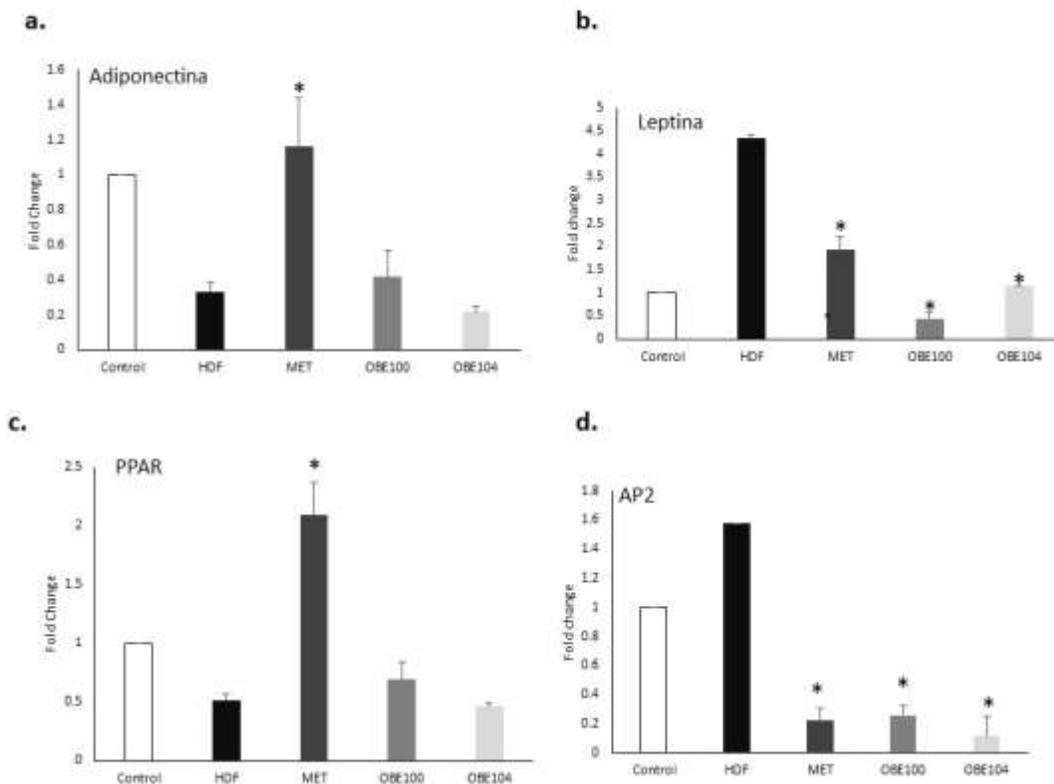


Figura 17. Efecto de las fracciones en la transcripción de genes funcionales en tejido adiposo de ratón. Expresión relativa (Fold change) de los transcritos de mRNA para Adiponectina (a). Leptina (b), PPAR γ (c) y AP2 (d); La información mostrada representa la Media \pm SE, normalizada con la expresión del gen *Ciclofilina*. N=5. *p<0.05 vs. (HDF).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron los efectos inmunometabólicos de dos fracciones de eucalipto ricas en triterpenos, denominadas OBE100 y OBE104. En un estudio realizado anteriormente en nuestro laboratorio por Guillén y colaboradores, utilizando un modelo murino de diabetes, se encontró que dichas fracciones tienen actividad hipoglucemiante y/o antidiabética. Observaron que en los ratones tratados con las fracciones, tanto la intolerancia a la glucosa como la intolerancia a la insulina se revertía a niveles comparable con los ratones del grupo control (1). Con el fin de proporcionar un acercamiento a los mecanismos celulares y moleculares, por medio de los cuales OBE100 y OBE104 actúan para modificar los procesos metabólicos asociados con la obesidad, en el presente estudio se propuso determinar los efectos de dichas fracciones sobre el contenido de ácidos grasos, la expresión de genes funcionales y el estado oxidativo en la

línea celular 3T3-L1 proveniente de ratón y en adipocitos humanos provenientes de cultivo primario. Además de evaluar los efectos de las fracciones sobre la expresión de genes pro-inflamatorios y el estado oxidativo en la línea celular murina de macrófagos J774 y en la línea de macrófagos humanos U-937.

Como se mencionó anteriormente, OBE104 contiene principalmente los triterpenos ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO) y OBE100 contiene principalmente AU, AO y adicionalmente una lactona del ácido ursólico (3b-hidroxi-urs-11-en-28,13 b-ólido), cuyas estructuras se pueden observar en la Figura 6. El AU es un triterpeno pentacíclico lipofílico presente en las ceras epicuticulares de las manzanas y en las cáscaras de algunas frutas, así como en muchas hierbas y especias como lavanda, orégano, tomillo y romero(2). El AU posee propiedades antiinflamatorias(3), antitumorales(4) y anti- HIV(5), además se ha descrito que previene la agregación plaquetaria(6) y los efectos causados por *Mycobacterium tuberculosis*(7). Por otro lado, el AO es un triterpeno pentacíclico presente en una gran variedad de plantas. Es uno de los componentes del aceite de oliva, las aceitunas y las uvas(8). Exhibe un rango muy amplio de propiedades farmacológicas y bioquímicas, incluyendo efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, anti-hiperlipidémicos e hipoglucemiantes(9). Adicionalmente, reduce la resistencia a la insulina asociada a la obesidad y la hiperlipidemia(10) y protege contra la disfunción endotelial(11). En cuanto a la Lactona del Ácido Ursólico (3b-hidroxi-urs-11-en-28,13 b-ólido), no se encontró información registrada relacionada con el tema, sin embargo, J.Lee y colaboradores desarrollaron un trabajo en 2016 donde evaluaron la actividad antidiabética y sensibilizadora de la leptina de una lactona (Withaferin) con estructura química similar a la encontrada en el presente proyecto(12).

Es importante resaltar que en este estudio se utilizaron iguales concentraciones para ambas fracciones. Sin embargo las concentraciones de AU y AO son diferentes; en la fracción OBE100 encontramos un aproximado de 54% de AU y 7% de AO, mientras que en OBE104 hay aproximadamente 90% de AU y 3% de AO. Por lo tanto, al tratar las células con OBE104 utilizamos una mayor concentración de AU y una menor concentración de AO que al tratarlas con OBE100. Esto podría explicar en parte las diferencias en los resultados cuando las células son tratadas con estas fracciones. Otra posible explicación es la presencia de la lactona en OBE100. Es importante resaltar que hasta la fecha, los estudios realizados se han centrado en el efecto de AU y AO independientemente. Este es el primer estudio donde se evalúan los triterpenos en conjunto, tal como se obtienen del material vegetal de partida.

Uno de los aspectos más relevantes del presente estudio, fue observar el efecto de OBE100 y OBE104, en la capacidad de almacenamiento de lípidos de las células 3T3-L1. Para poder dilucidar dicho efecto, se validó si las fracciones promovían la carga lipídica en preadipocitos 3T3-L1, en ausencia de las hormonas utilizadas para diferenciarlos a adipocitos maduros. Se observó que las fracciones no tienen efecto en la acumulación lipídica de preadipocitos 3T3-L1 (datos no mostrados). Es importante resaltar que aunque se asocia a un adipocito cargado de lípidos con un adipocito diferenciado, el hecho de que no haya carga lipídica no necesariamente implica que no se haya iniciado el programa de diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros. El proceso de diferenciación consta 4 estados. Primero, se detiene la proliferación mediante inhibición por contacto, indicando que se ha llegado a la confluencia. A partir de este momento el preadipocito está comprometido a diferenciarse en adipocito. A continuación se da una expansión clonal inducida por señales hormonales, representada por algunas divisiones mitóticas para sincronizar el ciclo celular. Posteriormente se presenta un estado de diferenciación temprana, la división celular se detiene y se expresan genes característicos del adipocito, iniciándose de esta manera la acumulación de lípidos. Por último, el adipocito alcanza su morfología definitiva con la fase de diferenciación terminal e induce transcripción de genes típicos de adipocitos maduros. La coordinación y regulación de estos procesos se encuentra bajo el control de una compleja cascada transcripcional de factores reguladores, en la que son fundamentales el receptor nuclear PPAR γ y diversos miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (13).

Una vez comprobado que los tratamientos con OBE100 y OBE104 no promueven la acumulación de lípidos en preadipocitos 3T3-L1, se procedió a evaluar el efecto de dichas fracciones, a las concentraciones establecidas, sobre los adipocitos 3T3-L1 una vez activado su programa de diferenciación adipogénica mediante hormonas y justo durante el proceso de carga lipídica. Se observaron cambios morfológicos, como reducción en el tamaño celular con respecto al control. Sin embargo, el hallazgo más importante fue la disminución del contenido intracelular de triacilgliceroles en las células tratadas en comparación con el control; dicho efecto fue mayor con OBE100. Es importante resaltar que en estudios realizados por el grupo de investigación, y que aún no han sido publicados, se encontró que el efecto antihiper glucemiante/antidiabético y antiinflamatorio del tratamiento con OBE100 en ratones pre diabéticos, es mayor que el de OBE104. Teniendo presente que OBE100 es una fracción pura del extracto de hojas de *Eucalyptus tereticornis*, requiere menos procesos de purificación que el OBE104, lo convierte en un mejor prototipo para su empleo farmacológico, debido a que es más fácil de extraer y más económico.

He y colaboradores en 2013, encontraron, que cuando los adipocitos maduros 3T3-L1 se trataban con 10 μ M de AU se disminuía en un 30% la acumulación lipídica comparando con los adipocitos maduros sin tratar(14). Con respecto al AO, Wan y colaboradores en 2014, encontraron una disminución en la acumulación lipídica en adipocitos maduros 3T3-L1 después del tratamiento con AO a una concentración de 3 μ M, comparado con el control(15). Esta concentración es la misma utilizada en el presente estudio.

Sumando los resultados discutidos anteriormente, podemos concluir que la disminución en el contenido de triacilgliceroles en los adipocitos 3T3-L1, no es debida a una muerte celular y que el efecto es dosis dependiente, ya que a una mayor concentración de las fracciones, se observa una mayor disminución en el contenido intracelular de lípidos. Este efecto se podría presentar por dos vías: porque se inhibe parcialmente la lipogénesis o porque se promueve la lipólisis. Teniendo en cuenta que se descartó que las fracciones promuevan el proceso de lipólisis (resultados no mostrados), se puede concluir que tanto OBE100 como OBE104, a las concentraciones utilizadas, inhiben parcialmente la lipogénesis en adipocitos 3T3-L1. Es interesante notar que He y colaboradores en el 2013, midieron por medio de un kit ELISA la liberación de glicerol en adipocitos maduros 3T3-L1 tratados con AU a 10 μ M y sin tratamiento, encontrando un aumento en la liberación de glicerol(14). Concluyeron, entonces, que el AU promueve el proceso de lipólisis, hallazgo contrario a nuestros resultados. Esto se puede explicar con el hecho de que nosotros utilizamos una mezcla de compuestos en estas fracciones a diferencia de estos estudios en donde solamente avalúan el AU o el AO independientemente.

El efecto parcial inhibitorio que ejercen OBE100 y OBE104 sobre la acumulación de triacilgliceroles en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, puede explicarse, en parte, con el hecho de que el AU promueve la fosforilación de AMPK (de inglés *AMP-activated protein kinase*)(16–18,14). AMPK funciona como un sensor del estado de energía celular, que cuando es activado (fosforilado), enciende las vías catabólicas y simultáneamente apaga las vías anabólicas que consumen ATP. En el tejido adiposo, el ayuno y el ejercicio activan AMPK(19,20). Muchos argumentos sugieren que LKB1 (del inglés *liver kinase B1*) está involucrado en la activación de AMPK en el tejido adiposo. LKB1 es una kinasa constitutivamente activa y fosforila AMPK cuando las concentraciones de AMP se elevan en la célula (21–23). Evidencias sugieren que la activación de AMPK puede inhibir la diferenciación de los adipocitos. El tratamiento con AICAR (activador de AMPK) de adipocitos 3T3-L1 y F442A, inhibe la diferenciación adipocitaria y bloquea la expresión de factores de transcripción adipogénicos como PPAR γ y C/EBP α (24,25). Una de las principales proteínas identificadas como blanco de AMPK es la acetil-CoA

carboxilasa (ACC), la cual sintetiza malonil-CoA a partir de acetil-CoA y es una enzima clave en la vía lipogénica(26). La fosforilación y consiguiente inactivación de ACC mediante AMPK ha sido demostrada en varios estudios tanto en modelos vivos como celulares(27,28). He y colaboradores en 2014, encontraron por medio de Western Blot y utilizando un modelo de adipocitos maduros 3T3L1, que el AU a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M incrementa la fosforilación de LKB1 y AMPK y disminuyen la fosforilación de ACC. Teniendo presente que durante los experimentos realizados en el presente estudio se utilizaron concentraciones de AU superiores a las mencionadas en la literatura, es posible que OBE100 y OBE104 disminuyan la cantidad de triacilgliceroles en adipocitos maduros 3T3-L1 por medio de la activación de la vía LKB1/AMPK/ACC.

Adicionalmente a la activación de AMPK, otro mecanismo que conduce a la disminución de la acumulación lipídica es el aumento en la expresión de SIRT1 (sirtuina 1), que es activada en respuesta a una restricción calórica y por tanto censa la disponibilidad de nutrientes del tejido adiposo. Esta proteína reducen la acumulación de grasa por medio de la represión de la actividad de PPAR γ (29). Por otro lado, SIRT1 promueve la fosforilación de AMPK por medio de la fosforiación de LKB1(30,31), al igual que el AU. Varios estudios coinciden en que el AU potencia la expresión de SIRT1 en diferentes modelos celulares(14,32–34). Bakhtiari y colaboradores en 2016 encontraron, utilizando PCR en tiempo real, que el tratamiento con AU a una concentración de 10 μ M en células aisladas de músculo de ratón, promueve la expresión transcripcional de SIRT1.

Como se mencionó anteriormente, existen evidencias de que AMPK y SIRT1 regulan negativamente la actividad de PPAR γ (regulación postranscripcional) en diferentes modelos celulares(35,36). Aunque en el presente estudio no se evaluó la cantidad ni la actividad de PPAR γ , He y colaboradores en el 2013, demostraron por medio de Western Blot, que adipocitos 3T3-L1 tratados con AU a una concentración de 10 μ M, tienen menos cantidad de PPAR γ comparados con adipocitos 3T3-L1 sin tratar.

PPAR γ es un factor de transcripción pro-adipogénico, considerado principal regulador de la expresión génica relacionada con la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros. PPAR γ potencia la expresión de genes como aP2 (*del inglés* adipocyte protein 2) y C/EBP (*del inglés* CCAAT/Enhancer Binding Protein), que promueven la acumulación de triacilgliceroles en el adipocito. Es importante mencionar que en el presente estudio se encontró que OBE100 y OBE104 aumentan la expresión transcripcional de aP2 y C/EBP α . Esto podría ser evidencia de que la expresión proteica de PPAR γ aumenta con los tratamientos, debido a que este factor de transcripción potencia la expresión tanto de aP2 como

de C/EBP. La proteína de unión a ácidos grasos aP2 (también conocida como FABP, del inglés *fatty acid binding protein*) es una molécula crítica en la integración de la biología del adipocito y la regulación metabólica sistémica. Esta proteína es regulada positivamente durante la diferenciación de los adipocitos y la activación de los macrófagos. Estudios en humanos han demostrado que altos niveles de aP2 en la circulación, están relacionados con obesidad, patologías metabólicas y enfermedades cardiovasculares(37). Por otro lado, C/EBP α (del inglés *CCAAT/enhancer binding protein α*) es una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción C/EBPs. Estos factores de transcripción están involucrados en la regulación de una serie de procesos biológicos entre los que se encuentra el control del metabolismo energético(38–40). C/EBP α es inducido relativamente tarde durante el proceso de adipogénesis en cultivo, después de la inducción de PPAR γ , pero precede la síntesis de muchas de las enzimas características de la diferenciación celular(41). Los sitios de unión a C/EBP se encuentran en promotores de genes que se activan en los adipocitos como PEPCK(42), aP2(43) y GLUT4(44). Altos niveles en la expresión de C/EBP α en líneas celulares de fibroblastos son suficientes para inducir su diferenciación a adipocitos(45) y menos cantidad de C/EBP α puede cooperar con PPAR γ para promover la diferenciación. Adicionalmente, la inhibición de C/EBP α en preadipocitos 3T3-L1 bloquea la expresión de genes adipogénicos y reviene la acumulación de lípidos(46). Finalmente, Ratones knockout para C/EBP α presentan una reducción de su tejido adiposo(47).

Para concluir acerca de los efectos biológicos del aumento en la expresión de mRNA de aP2 y C/EBP, debería medirse la expresión proteica y la actividad de ambas proteínas en los adipocitos.

Por otra parte, PPAR γ reprime la expresión génica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR), los cuales están implicados en lipólisis y la liberación de ácidos grasos (48). Es importante destacar que la expresión y actividad de PPAR γ puede ser modulada por varias vías, como ubiquitinación, SUMOilación y/o fosforilación, esto demuestra la gran importancia de la regulación postranscripcional de este regulador maestro en la adipogénesis (49).

En contraste con los efectos del AU sobre la cantidad de PPAR γ , el tratamiento de adipocitos maduros con OBE100 y OBE104, aumenta significativamente la expresión transcripcional de PPAR γ en las células 3T3-L1 maduras, en comparación con las mismas células sin tratamiento, lo que podría indicar que las fracciones utilizadas en el presente proyecto podrían estar actuando como agonistas de PPAR γ . Las tiazolidinedionas (TZD) fueron los primeros compuestos sintéticos identificados como ligandos de PPAR γ ; dentro de este grupo varios

autores han demostrado que la Rosiglitazona (RGZ) es el agonista más potente y selectivo que haya sido identificado para este receptor(50). Las TZDs tienen una variedad de efectos benéficos en el tejido adiposo como el aumento de la sensibilidad a la insulina(13), la reducción en el número de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo(51) y el aumento de la síntesis de adiponectina(51). Kim y colaboradores en 2013, encontraron, por medio de PCR en tiempo real y utilizando modelos de células T EL4 y macrófagos RAW264.7, que las células tratadas con AU presentan una disminución en la cantidad de mRNA de PPAR γ respecto a las células sin tratar(52). Este resultado coincide con el resultado reportado por He y colaboradores en el 2013, utilizando la misma técnica sobre adipocitos 3T3-L1(14). Debido a su capacidad para inducir adipogénesis, las TZD inducen un aumento de peso en los pacientes que las utilizan. Troglitazona, la primera TZD disponible comercialmente, fue retirada de la práctica médica por ocasionar hepatotoxicidad(51). De igual forma, Rosiglitazona, que fue ampliamente utilizada en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II, ha sido asociada con un incremento significativo del riesgo de sufrir infarto de miocardio y otras enfermedades cardiovasculares, por lo que en la actualidad su uso es restringido (51).

Hay que resaltar que el interés en PPAR γ como un blanco terapéutico, revivió con la búsqueda de agonistas parciales que, sin promover la adipogénesis, puedan seguir actuando como sensibilizadores de la insulina(53). Esta cuestión se resolvió cuando se demostró que PPAR γ es fosforilada en la Ser273 (serina273) por Cdk5, en ratones y humanos obesos. Esta fosforilación no suprime la actividad transcripcional general de PPAR γ , pero genera cambios en la expresión de genes específicos como el de la adiponectina. Muchos antidiabéticos con o sin las propiedades clásicas de los agonistas de PPAR γ , inhiben directamente la acción de Cdk5, restaurando en parte su patrón de expresión de genes antidiabéticos. Adicionalmente, el efecto antidiabético de la Rosiglitazona está íntimamente asociado con la inhibición de la fosforilación de PPAR γ mediante Cdk5(54). En el presente estudio, se pudo observar que, aunque OBE100 y OBE104 aumentan la expresión transcripcional de PPAR γ , disminuyen la acumulación lipídica y, teniendo presente que, en un estudio anterior se demostró que actúan revirtiendo los efectos de la resistencia a la insulina(1), se puede concluir que dichas fracciones pueden estar actuando como potenciales agonistas parciales de PPAR γ .

Entre las múltiples funciones de PPAR γ está el estimular la síntesis de Acrp30 (o adiponectina) (55), la cual es una adipoquina que se expresa en el tejido adiposo y su concentración plasmática se reducen en individuos con sobrepeso y obesidad (56–58). Con base a esto, se evaluó el efecto de las fracciones en la síntesis de

esta adipoquina, encontrando, un aumento tanto a nivel de mRNA como de proteína (Figura 11b y Figura 12c). Dado que la adiponectina es estimulada por la insulina e inhibida con $TNF\alpha$, la resistencia a la insulina y el incremento en la expresión de $TNF\alpha$ podrían contribuir a que dicha proteína esté disminuida en sujetos obesos. En contraste, la reducción del peso corporal mediante dietas hipocalóricas o el tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida ocasionan una elevación de la adiponectina en el plasma (57,58). Por lo tanto, un incremento en la expresión de adiponectina es benéfico, no solo por lo descrito anteriormente, sino porque además, interfiere con la función de los macrófagos inhibiendo su actividad fagocítica y su adherencia al endotelio vascular. Además, impide la producción de IL-6 y $TNF\alpha$ por medio de la inhibición de NF- κ B e induce la producción de factores antiinflamatorios potentes como IL-10 (59).

De manera contraria a la adiponectina, PPAR γ regula negativamente la expresión de la leptina (60,61). Concordando con nuestro resultado en las células 3T3-L1 diferenciadas y tratadas con las fracciones. Esta disminución se evidenció tanto a nivel de expresión transcripcional como proteica (Figuras 11b y 12b) y se validó cuando se determinó la cantidad de RNAm de leptina en tejido adiposo de ratones pre diabéticos (Figura 17b). La leptina es una hormona producida en su mayoría por los adipocitos aunque también se expresa en el hipotálamo, el ovario y la placenta. Esta hormona regula el peso corporal por medio de su unión a receptores que se expresan en las neuronas de varios núcleos hipotalámicos y que están relacionados con la regulación de la ingesta de alimento y el balance energético(62), por lo que en condiciones de obesidad y resistencia a insulina se encuentra sobre expresada(63,64).

Estudios demuestran que el efecto final de la leptina es la disminución de los niveles de insulina, glucosa y lípidos, aumento de la saciedad, de la termogénesis y de algunas hormonas como las tiroideas y las reproductivas(62). En individuos obesos coexisten estados de resistencia a la insulina y resistencia a la leptina y se ha hecho evidente la asociación entre estas hormonas, la obesidad y el desarrollo potencial de la DM2, postulando de esta forma a la leptina como una de las responsables de las relación entre la obesidad y resistencia a la insulina, así como entre obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (62). Asimismo, se sabe que la leptina y la insulina se regulan mutuamente (65,66); la leptina inhibe la producción de insulina en las células β del páncreas (67) y la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito. Estudios demuestran que en el tejido adiposo de ratones y de humanos el $TNF\alpha$ estimula la expresión de la leptina y ésta a su vez retroalimenta la producción de $TNF\alpha$, que también estimula la producción de IL6 y la inhibición de PPAR γ (68).

La leptina funciona como una hormona y como una citoquina. Como hormona regula el apetito y el metabolismo basal, y como citoquina juega un importante

papel en la hematopoyesis, angiogénesis y las respuestas inmunes innata y adaptativa(69–73). Incrementos en la secreción de leptina, están asociados con condiciones de inflamación crónica(73). El rol de la leptina en la inflamación está soportada por estudios en ratones ob/ob (deficientes en leptina), los cuales tienen disminuida la secreción de $TNF\alpha$ e $INF\gamma$ y elevada la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10. Agrawal y colaboradores en 2011, demostraron que la leptina activa células B humanas e inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y $TNF\alpha$) mediante la vía JAK2/STAT3(74)

Está bien establecido que los cambios en los niveles de leptina en plasma están asociados con cambios en la cantidad de mRNA de leptina en los adipocitos, y estos niveles están a su vez relacionados con la cantidad intracelular de lípidos(75,76). Sin embargo, los elementos cis y los factores trans que regulan la expresión génica tejido-específica de leptina *in vivo* y los mecanismos que permiten el incremento o disminución de su concentración dependiendo de los cambios en la masa del tejido adiposo son desconocidos(77). Lu y colaboradores en 2015, plantearon la posibilidad de que un promotor de la leptina podría ser el mecanismo de detección de lípidos que regulara la expresión de leptina en respuesta a los cambios en la cantidad de lípidos intracelulares. Para elucidar dicho mecanismo, se basaron en el procedimiento realizado por Brown y Goldstein para identificar la vía de detección del colesterol(78–80). De esta forma, identificaron una caja CCAAT que sirve como sitio de unión al Factor Nuclear Y (NF-Y, del inglés *Nuclear Factor Y*), localizada a 16.5kb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de la leptina. Posteriormente realizaron una delección de un fragmento de ADN que contenía el sitio de unión a NF-Y, encontrando que se suprimía la expresión de la leptina, *in vivo*. Estos hallazgos los llevaron a evaluar el papel de NF-Y en el desarrollo de células grasas y la expresión de la leptina(77). NF-Y (también conocido como CBP, del inglés CCAAT-box Binding Protein), es un factor de transcripción que ha sido implicado en enfermedades humanas como la miodistrofia, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y enfermedades cardiovasculares(81–83). Estudios *in vitro* demuestran que NF-Y se une a promotores de genes que controlan la síntesis de colesterol y ácidos grasos así como la expresión de adiponectina, aunque su función en la regulación de la adipogénesis *in vivo* no ha sido evaluada(84,85). Lu y colaboradores encontraron que reduciendo la expresión genética (knockdown) de NF-Y en preadipocitos 3T3-L1, se disminuye la adipogénesis. Adicionalmente, *in vivo*, utilizando un modelo de ratones knockdown para NF-Y, demostraron por medio de ChiP, que NF-Y se une a secuencias pertenecientes al gen de la leptina. Además, dichos ratones fueron resistentes a una dieta alta en grasa, sugiriendo que NF-Y regula la masa del tejido adiposo bajo condiciones normales y la expansión de dicho tejido en obesidad inducida por dieta. En términos generales, estos estudios identificaron a NF-Y como un factor

de transcripción que se requiere para la expresión de leptina y que una pérdida de su función en los adipocitos resulta en lipodistrofia e hipoleptinemia, remediable con la sustitución de leptina(77).

Por otro lado, Wrann y colaboradores en 2012, utilizando ratones transgénicos, localizaron un elemento cis corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de la leptina e identificaron que el factor de transcripción FOSL2 (del inglés *FOS-like antigen 2*) se vinculaba específicamente a dicha región. Además, reportaron que realizando Knockdown de FOSL2 en adipocitos humanos, disminuía la expresión de leptina y que dicha expresión aumentaba en ratones cuando se sobre expresaban FOSL2. Estos datos confirman que FOSL2 actúa como un regulador crítico en la expresión de leptina en los adipocitos(86).

Adicionalmente, J. Lee y colaboradores en 2016, utilizando un modelo de ratones con obesidad inducida por la dieta, encontraron por medio de procedimientos biofarmáticos, que el Withaferin (Lactona de estructura similar a la encontrada en OBE100) aumenta la sensibilidad a la leptina. Dicho resultado se corroboró cuando, por medio de escaneo DEXA (del inglés *dual-energy X-ray*), los autores encontraron que el Withaferin disminuye el peso corporal de los ratones obesos tratados, por medio de la disminución en la ingesta de alimentos ocasionada por la sensibilización a la leptina(12)

Dado que uno de los resultados más consistentes del presente proyecto, es la disminución de leptina producida por el tratamiento con OBE100 y OBE104, como se mencionó anteriormente, se plantea que NF- κ B y FOSL2 pueden ser un blanco directo o indirecto de dichas fracciones y podrían ser objeto de posteriores estudios.

Teniendo presente que los macrófagos son unas de las células más relevantes en el perfil secretor y la función del tejido adiposo inflamado, característico de la obesidad y las enfermedades relacionadas como la *Diabetes Mellitus* tipo 2, se evaluó el efecto de OBE100 y OBE104 en la expresión de genes marcadores de inflamación en macrófagos J774 con perfil proinflamatorio. Se encontró en que en las células tratadas se disminuye significativamente la expresión IL-6, TNF α e IL-1 β tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico. TNF α e IL-1 β activan, por la vía canónica a NF- κ B, que es una vía de señalización proinflamatoria que posee un importante papel en la expresión genética de otras citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión proinflamatorias. Por esto, al obtener una disminución en la producción de TNF α e IL-1 β , posiblemente hay una disminución en la activación de NF- κ B y, por lo tanto, una disminución de genes activados por este complejo como IL-6 y a su vez TNF α (87). Adicionalmente, varios estudios como el de Patil y colaboradores en el 2015, evaluaron el efecto de triterpenos pentacíclicos en la activación de NF- κ B. Por medio de un ensayo de quinasa hotspot en macrófagos

RAW 264.7 activados con LPS, demostraron que, en especial el AU, es un potente inhibidor de IKK β , atenuando de esta manera la expresión de la cascada de proteínas de NF- κ B, previniendo la fosforilación de IKK α/β y bloqueando la activación de INF γ (88).

Por lo anterior, se puede plantear la hipótesis de que las OBE100 y OBE104, disminuyen la producción de IL-6, TNF α e IL-1 β por inhibición NF- κ B. Además, es posible que la disminución de IL-6 y TNF α se deba, en parte, a la disminución de la expresión de leptina en 3T3-L1. Por este motivo, se propone hacer un análisis de la expresión y actividad de NF- κ B así como de las diferencias en la activación de la vía JAK/STAT en macrófagos.

Otro fenómeno celular altamente relacionado con la inflamación es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un estado en el que se genera un desequilibrio entre la formación excesiva y la eliminación insuficiente de moléculas altamente reactivas, como las especies reactivas de oxígeno y las de nitrógeno. El estrés oxidativo desempeña un papel importante en el desarrollo de complicaciones de la diabetes. Por este motivo, se evaluó la capacidad antioxidante de las fracciones utilizadas mediante varios métodos (Tabla 3) y se encontró que el contenido de fenoles totales para ambas fracciones es bastante alto cuando se compara con los frutos de agraz o mortiño(89) y pulpa de mango, los cuales, según se ha reportado, poseen una muy buena capacidad antioxidante(90). Siguiendo con el orden de los hallazgos, al evaluar la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), se encontró que el valor de ORAC para OBE104 es similar al ORAC de fracción lipofílica de la Guayaba Manzana, mientras que el ORAC para OBE100 fue mayor al de la fracción lipofílica de la uva. Ambas frutas, la guayaba manzana y la uva, posee valores de ORAC significativamente mayores a muchas de las frutas analizadas en Colombia(91) y son frecuentemente utilizadas como valores de referencia en alimentos, frutas o suplementos por la industria.

Además de medir la capacidad antioxidante de las fracciones utilizadas, en términos de su cantidad de fenoles o su capacidad para absorber radicales libres de oxígeno en medios que no son biológicamente activos, se consideró relevante medir la capacidad que tienen para generar radicales libres en las células. Se encontró que ambas fracciones aumentan la generación de especies reactivas de oxígeno en macrófagos J774 activados y sin activar. Para explicar el hecho de que, aun generando dicho estallido oxidativo, OBE100 y OBE104 disminuyan la expresión de citoquinas proinflamatorias en la línea celular evaluada, es importante destacar que la inflamación es regulada, en gran medida, por el proceso de autofagia. La autofagia es un mecanismo de degradación lisosomal por el cual la célula destruye organelas dañadas como también microorganismos y

recicla macromoléculas. La autofagia puede regular la producción de proteínas inflamatorias como la IL-1 β . La IL-1 β es activada por un complejo multimérico conocido como inflamosoma(92). Saitoh y col demostraron que la actividad del inflamosoma, relacionado con NLRP-3, es regulada negativamente por la autofagia. Macrófagos derivados de ratones knockout para el gen ATG16L1 (por su nombre en inglés autophagy-related 16-like 1), los cuales presentan una carencia de autofagia, presentan una elevada producción de IL-1 β después de la estimulación con LPS(92). La autofagia puede regular la producción de dicha citoquina mediante dos vías: la primera es por eliminación de mitocondrias dañadas evitando de esta manera la acumulación de ROS(93,94). La otra vía por la cual la autofagia regula la producción de IL-1 β es por la degradación de pro-IL-1 β limitando el sustrato disponible para que el inflamosoma procese la IL-1 β (93,94). Varios autores han descrito que el AU promueve la autofagia en diferentes modelos celulares(17,95,96). Leng y colaboradores en 2016, por medio de microscopía electrónica y utilizando macrófagos extraídos del peritoneo de ratones y de la línea celular Raw264.7, encontraron que el AU a una concentración de 10 μ M promueve la autofagia. Dadas las evidencias encontradas al respecto, se puede plantear la hipótesis de que OBE100 y OBE104 promueven la autofagia en macrófagos J774 activados y de esta manera, revierten los efectos inflamatorios de las especies reactivas de oxígeno que promueven. Además del mecanismo descrito, es posible que la capacidad reductora de las células sea lo suficientemente potente como para equilibrar la cantidad de radicales de oxígeno producidos y los reducidos por su propia maquinaria. Valdría la pena evaluar en este sistema, la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, para comprobar esta última hipótesis.

En resumen, se propone que los triterpenos presentes en OBE100 y OBE104, a las concentraciones utilizadas, pueden disminuir la cantidad de lípidos almacenados en los adipocitos 3T3-L1. Este efecto puede llevarse a cabo por medio de la activación de la vía LKB1/AMPK/ACC y del aumento en la expresión de SIRT1, que a su vez y al igual que pAMPK, regula negativamente la actividad de PPAR γ . Por medio de la disminución en la actividad de PPAR γ , decrece la expresión de leptina y este efecto es potenciado por la disminución que ocasiona la reducción en la acumulación lipídica en la actividad de NF- κ B y, por un mecanismo desconocido inhibe FOSL2. La disminución de NF- κ B se suma a la actividad de AMPK y ambos conducen al aumento en la expresión de adiponectina. Adicionalmente, OBE100 y OBE104 disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias probablemente inhibiendo la actividad de NF- κ B, efecto que es potenciado por el aumento en SIRT1 y la promoción de la autofagia además del aumento de la adiponectina y la disminución de la leptina. Por último, el efecto de las especies reactivas de oxígeno, promovido por las fracciones sobre

la inflamación, es revertido por la autofagia provocada por las fracciones. En la Figura 18, se esquematiza el proceso descrito.

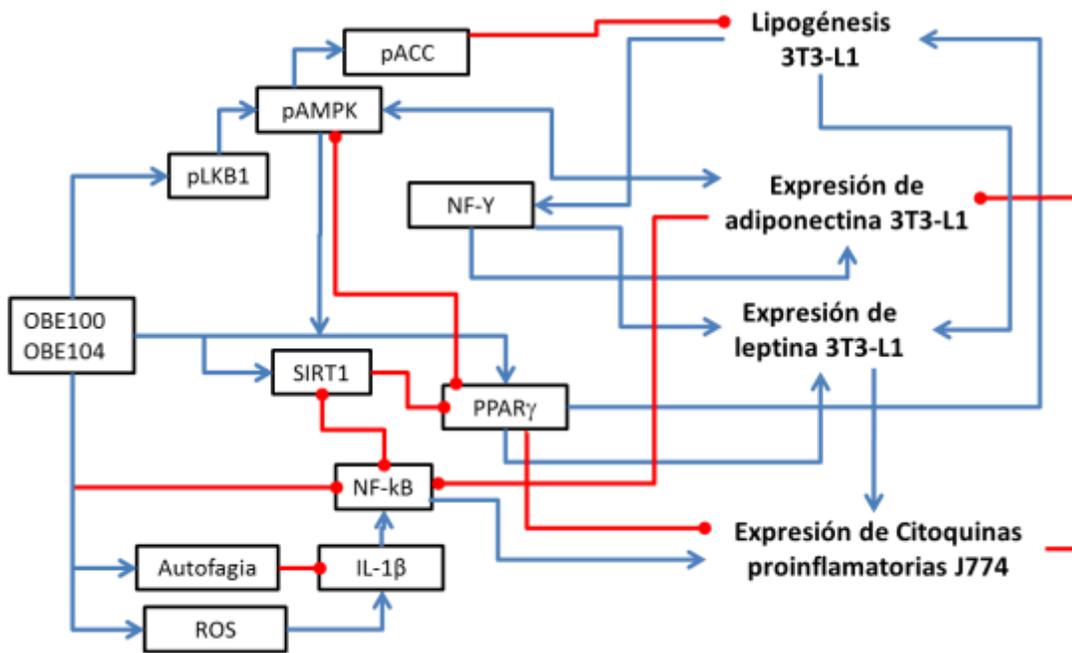


Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para OBE100 y OBE104. Líneas azules: activación. Líneas rojas: inhibición. pLKB1 (kinasa hepática B1, fosforilada), pAMPK (kinasa dependiente de AMP, fosforilada), pACC (acetil coA carboxilasa, fosforilada), SIRT1 (Sirtuina 1), NF- κ B (factor nuclear κ B), ROS (especies reactivas de oxígeno), IL-1 β (interleuquina 1 β).

En conclusión, adipocitos 3T3-L1 maduros y tratados con OBE100 y OBE104, presentaron una disminución en la cantidad de triacilgliceroles almacenados, por medio de la inhibición parcial de la lipogénesis y no por el aumento en la lipólisis. Adicionalmente, mostraron una disminución en la expresión de leptina y un aumento en la expresión de adiponectina que fueron reproducibles en los ensayos realizados en tejido adiposo de ratones pre-diabéticos. Además, se observó un incremento en la expresión transcripcional de PPAR γ , aP2 y C/EBP. Por otro lado, en macrófagos J774 activados y tratados con las fracciones, se evidenció una disminución en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF α . Extrapolando a un contexto biológico los efectos que OBE100 y OBE104 generaron en los modelos celulares, se podría esperar que las fracciones, acompañadas de una alimentación equilibrada y ejercicio, contribuyeran a una disminución en el peso corporal y logran interrumpir el circuito entre la inflamación crónica leve, desencadenada en el tejido adiposo durante la obesidad,

y la resistencia a la insulina, pudiendo ser de gran utilidad para el tratamiento y la prevención de las complicaciones metabólicas y cardiovasculares asociadas con la *Diabetes Mellitus* tipo 2.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uno de los aspectos a resaltar del presente estudio y de otros adelantados en el grupo, es el empleo de una mezcla de triterpenos obtenidos, directamente, a partir de material vegetal, que componen la fracción que se denomina OBE100. Se observó que adipocitos 3T3-L1 tratados con OBE100, presentan una mayor disminución en la acumulación de triacilgliceroles que las mismas células tratadas con OBE104. Además, en contraste con los resultados de estudios con ácido ursólico reportados en la literatura, el tratamiento con OBE100 y OBE104 no promueve lipólisis, lo que disminuiría la lipotoxicidad que precede el desarrollo de la resistencia a la insulina a nivel sistémico. En el modelo vivo, la mezcla de triterpenos ha demostrado tener un efecto más potente que sus componentes individuales, al revertir de una forma más notable las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad y sus complicaciones. Estos hechos, convierte al extracto crudo (OBE100), en un prototipo muy promisorio en el tratamiento en contra de la *Diabetes Mellitus* tipo 2. A partir de esto, se favorecería el desarrollo de modelos fitoterapéuticos que irían en contra del establecido, en la elaboración de medicamentos para tratar la enfermedad en cuestión y otras complicaciones metabólicas relacionadas con la obesidad, con la ventaja adicional de optimizar en los costos y con apoyo de la industria nacional.

Para darle continuidad al presente estudio, se pretende trabajar en la forma de presentar farmacológicamente el extracto, estandarizando y optimizando factores como su solubilidad y biodisponibilidad y de esta manera poder utilizarlo en estudios in vivo y posteriormente en estudios preclínicos y clínicos.

Por otro lado, teniendo presentes los resultados reportados en este estudio, se podrían analizar las vías metabólicas relacionadas con los mecanismos de acción de las fracciones utilizadas. Para ello, se podría evaluar, en los modelos celulares propuestos, la actividad y expresión tanto a nivel transcripcional como proteica, de proteínas como LKB1, AMPK, ACC, SIRT1, NF-Y, FOSL2, NF- κ B, JAK2, STAT3

Adicionalmente, podría evaluarse en este sistema, la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, para comprobar el mecanismo por medio del cual, las fracciones utilizadas, disminuyen el perfil proinflamatorio en macrófagos J774, aun promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno. También podría evaluarse el efecto de las fracciones en la capacidad reductora de dichas células.

Por otro lado, podrían realizarse ensayos para saber si OBE100 y OBE104 fornsforilan a PPAR γ y de qué manera lo hacen, y así poder concluir acerca del rol de las fracciones como agonistas parciales de dicho factor de transcripción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94(3):311–21.
2. Dall TM, Narayan KMV, Gillespie KB, Gallo PD, Blanchard TD, Solcan M, et al. Detecting type 2 diabetes and prediabetes among asymptomatic adults in the United States: modeling American Diabetes Association versus US Preventive Services Task Force diabetes screening guidelines. *Popul Health Metr* [Internet]. 2014;12(1):12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045861&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Hackett RA, Steptoe A. Psychosocial Factors in Diabetes and Cardiovascular Risk. *Curr Cardiol Rep* [Internet]. *Current Cardiology Reports*; 2016;18(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-016-0771-4>
4. Evans JM, Newton RW, Ruta D a, MacDonald TM, Morris a D. Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2000;17(6):478–80.
5. OECD. *Health at a glance 2013: OECD Indicators*. OECD Publishing. 2013. 210 p.
6. World Health Organization. *Global Report on Diabetes*. Isbn [Internet]. 2016;978:88. Available from: http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
7. Wannamethee SG, Shaper AG. Weight Change and Duration of. *Diabetes Care*. 1999;22(8):1266–72.
8. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation* [Internet]. 2009;120(16):1640–5. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/120/16/1640.abstract%5Cnhttp://circ.ahajournals.org/content/120/16/1640.full.pdf>
9. Zimmet PZ, Alberti KGMM, Shaw JE. Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition. *Med J Aust* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2017 Jan 14];183(4):175–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16097912>
10. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2014 Jul 10];380(9859):2224–60. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617668>

11. Festa A, D'Agostino R, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. 2014 Oct [cited 2015 Sep 6];25(10):1407–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673759>
12. Herrán OF, Patiño GA DCS. Transición alimentaria y exceso de peso en adultos. Encuesta de la Situación Nutricional en Colombia, 2010. *Biomédica*. 2013;33(4):24.
13. Roth J, Qiang X, Marbán SL, Redelt H, Lowell BC. The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obes Res* [Internet]. 2004 Nov [cited 2015 Oct 9];12 Suppl 2:88S–101S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601956>
14. Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Jan 13];96:124–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390814004742>
15. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* [Internet]. 2004;30(4):294–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525872>
16. RE S. Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. *Physiologist*. 1961;4:113–113.
17. Scherer PE. Adipose Tissue: From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes* [Internet]. 2006;55(6):1537–45. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db06-0263>
18. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54(6):945–55.
19. Bays HE, González-Campoy JM, Bray G a, Kitabchi AE, Bergman D a, Schorr AB, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6(3):343–68.
20. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu C-Y, et al. Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Compartments: Association With Metabolic Risk Factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* [Internet]. 2007;116(1):39–48. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675355>
21. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1562–8.
22. Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, Yasuda M, Kume S, Morino K, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012.
23. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453:783–7.
24. Martos-Moreno GA, Kopchick JJ, Argente J. Adipokines in healthy and obese

- children. *An Pediatr (Barc)* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Aug 8];78(3):189.e1-189.e15. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1695403312004675>
25. Meier U GA. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004;50:1511---25.
 26. Gautron L EJ. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest*. 2011;121:2087---93.
 27. Sone M OR. Leptin and the pituitary. *Pituitary*. 2001;4:15---23.
 28. Noon LA, Clark AJL, O'Shaughnessy PJ, King PJ. A CCAAT/enhancer-binding protein site at -87 is required for the activation of a novel murine melanocortin 2-receptor promoter at late stages during adipogenesis. *Endocrinology*. 2006;147(12):6019--26.
 29. Koutkia P, Canavan B, Johnson ML, DePaoli A GS. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:372---9.
 30. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903---8.
 31. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 2007;356:237---47.
 32. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110:1093---103.
 33. Martos-Moreno GA, Kopchick JJ, Argente J. [Adipokines in healthy and obese children]. *An Pediatr (Barc)* [Internet]. Elsevier; 2013 Mar 1 [cited 2015 Oct 11];78(3):189.e1-189.e15. Available from: <http://www.analesdepediatria.org/es/adipoquinas-el-nino-sano-con/articulo/S1695403312004675/>
 34. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: Found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(7):259--65.
 35. Chen, B. H., Song, Y., Ding, E. L., Roberts, C. K., Manson, J. E., Rifai, N., ... & Liu S. Circulating Levels of Resistin and Risk of Type 2 Diabetes in Men and Women : *Diabetes Care*. 2009;32(2):329--34.
 36. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL SA. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56:16---23.
 37. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*. 2006;74:443---77.
 38. Marcela RJ. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula

- endocrina. Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Aug 16];23(2):136–44. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864012702900>
39. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL FAJ. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796–808.
 40. Chawla A, Nguyen KD GY. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:738–49.
 41. Lumeng CN, Bodzin JL SA. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–84.
 42. Kwon H, Pessin JE. Adipokines Mediate Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013;4(June):1–13. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00071/abstract>
 43. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-)* [Internet]. 1993;259(5091):87–91. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183>
 44. Ito Y, Daitoku H, Fukamizu A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBP β in TNF- α -treated adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009.
 45. Li L, Renier G. Adipocyte-derived lipoprotein lipase induces macrophage activation and monocyte adhesion: role of fatty acids. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. 2007;15(11):2595–604. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070750>
 46. Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CPAA, Aerts JMFG, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: Evidence that tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine*. 2005;32(2):94–103.
 47. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. 2003;309:286–90.
 48. Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2005 May [cited 2017 Feb 2];288(5):R1220-5. Available from:
<http://ajpregu.physiology.org/content/288/5/R1220.abstract>
 49. Bastard PJ, Maachi M, Lagathu C, Kim JM, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(March):4–12.
 50. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz D, Miles J, Yudkin J, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4196–200.
 51. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues

of Obese Subjects Release Interleukin-6 : Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid *. 2016;83(3):30–3.

52. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273–82.
53. Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes*. 2004;28:993–7.
54. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003;107(3):363–9.
55. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2084–9.
56. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000;148(2):209–14.
57. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2000;85(9):3338–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10999830>
58. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, et al. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1471–7.
59. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Sep 15 [cited 2017 Jun 13];104(6):787–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491414>
60. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
61. Engelman J a, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606–19.
62. Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte A. BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA. *Rev*. 2008;27(1):9–18.
63. Mccarthy AM, Elmendorf JS. GLUT4 ' s itinerary in health & disease. *Indian J Med Res*. 2007;(March):373–88.
64. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(4):665–79.
65. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* [Internet]. 2010;1(3):68–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537430>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3083885>

66. Olholm J, Paulsen SK, Cullberg KB, Richelsen B, Pedersen SB. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(10):1546–53.
67. Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, et al. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;378(4):836–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.130>
68. Zhang Y, Gu M, Cai W, Yu L, Feng L, Zhang L, et al. Dietary component isorhamnetin is a PPAR γ antagonist and ameliorates metabolic disorders induced by diet or leptin deficiency. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6(January):19288. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep19288>
69. Na L-X, Zhang Y-L, Li Y, Liu L-Y, Li R, Kong T, et al. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011;21(7):526–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475309002877>
70. He Y, Li W, Li Y, Zhang S, Wang Y, Sun C. Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes. *PLoS One*. 2014;9(10).
71. Guillén A, Granados S, Rivas KE, Estrada O, Echeverri LF, Balcázar N. Antihyperglycemic activity of eucalyptus tereticornis in insulin-resistant cells and a nutritional model of diabetic mice. *Adv Pharmacol Sci*. 2015;2015.
72. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3(2):127–33.
73. Ralph P, Prichard J, Cohn M. Reticulum Cell Sarcoma : An Effector Cell in Antibody-Dependent Cell-Mediated Immunity Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : RETICULUM CELL SARCOMA : AN EFFECTOR CELL IN CELL-MEDIATED IMMUNITY 1. 2013;
74. Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2017 Jun 16];20(12):20614–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610440>
75. Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2001 May [cited 2017 Jun 16];75(2–3):125–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297842>
76. Baglin I, Mitaine-Offer AC, Nour M, Tan K, Cavé C, Lacaille-Dubois MA. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev Med Chem*. 2003;3(6):525–39.
77. Lee SY, Kim YJ, Chung SO, Park SU. Letter to the editor : RECENT STUDIES ON URSOLIC ACID AND ITS BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY Regional Innovation Center for Dental Science and Engineering , Chosun University , Department of Biosystems Machinery Engineering , Chungnam National Un. *Excli J*. 2016;15(March 2016):221–8.
78. Babalola IT, Shode FO, Adelakun E a, Opoku AR, Mosa R a. Platelet-aggregation inhibitory activity of oleanolic acid, ursolic acid, betulinic acid, and maslinic acid. *J*

- Pharmacogn Phytochem. 2013;1(6):54–60.
79. Cantrell C, Franzblau S, Fischer N. Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Med* [Internet]. 2001;67(8):685–94. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-18365>
 80. Pérez-Camino MC, Cert A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1999 Apr [cited 2017 Jun 15];47(4):1558–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564016>
 81. Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* [Internet]. 2012 May [cited 2017 Jun 15];77:10–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942212000027>
 82. Zhang Y-N, Zhang W, Hong D, Shi L, Shen Q, Li J-Y, et al. Oleanolic acid and its derivatives: New inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2008 [cited 2017 Jun 15];16(18):8697–705. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089608007062>
 83. Bachhav SS, Bhutada MS, Patil SP, Sharma KS, Patil SD. Oleanolic Acid Prevents Increase in Blood Pressure and Nephrotoxicity in Nitric Oxide Dependent Type of Hypertension in Rats. *Pharmacognosy Res* [Internet]. Medknow Publications; 2015 [cited 2017 Jun 15];7(4):385–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26692754>
 84. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man* [Internet]. 2004;740:33–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468966><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
 85. Zhang W, Hong D, Zhou Y, Zhang Y, Shen Q, Li J, et al. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2006;1760(10):1505–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416506001607>
 86. He Y, Li Y, Zhao T, Wang Y, Sun C. Ursolic Acid Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes through LKB1/AMPK Pathway. *PLoS One*. 2013;8(7).
 87. Sung H-Y, Kang S-W, Kim J-L, Li J, Lee E-S, Gong J-H, et al. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;30(12):831–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531710002022>
 88. Yan S, Huang C, Wu S, Yin M. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicol Vitr* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;24(3):842–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233309003671>
 89. Huang D, Ding Y, Li Y, Zhang W, Fang W, Chen X. Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. *Cancer Lett*. 2006;233(2):289–96.
 90. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263–73.

91. Wan Q, Lu H, Liu X, Yie S, Xiang J, Yao Z. The study of oleanolic acid on the estradiol production and the fat production of mouse preadipocyte 3T3-L1 in vitro. *Hum Cell*. 2014;28(1):5–13.
92. Son H-S, Kwon HY, Sohn EJ, Lee J-H, Woo H-J, Yun M, et al. Activation of AMP-activated Protein Kinase and Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase3 ? Mediate Ursolic Acid Induced Apoptosis in HepG2 Liver Cancer Cells. *Phyther Res* [Internet]. 2013 Nov [cited 2017 Jun 18];27(11):1714–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.4925>
93. Meng F, Ning H, Sun Z, Huang F, Li Y, Chu X, et al. Ursolic acid protects hepatocytes against lipotoxicity through activating autophagy via an AMPK pathway. *J Funct Foods* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;17:172–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.029>
94. Zheng Q, Jin F, Yao C, Zhang T, Zhang G, Ai X. Ursolic acid-induced AMP-activated protein kinase (AMPK) activation contributes to growth inhibition and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Jun 18];419(4):741–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X12003439>
95. Sponarova J, Mustard KJ, Horakova O, Flachs P, Rossmeisl M, Brauner P, et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depot-specific metabolic changes during starvation. *FEBS Lett* [Internet]. 2005 Nov 7 [cited 2017 Jun 18];579(27):6105–10. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2005.09.078>
96. Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, et al. Coordinate Regulation of Malonyl-CoA Decarboxylase, sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase, and Acetyl-CoA Carboxylase by AMP-activated Protein Kinase in Rat Tissues in Response to Exercise. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Aug 30 [cited 2017 Jun 18];277(36):32571–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065578>
97. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Mar 9 [cited 2017 Jun 18];101(10):3329–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985505>
98. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* [Internet]. 2003 Nov 11 [cited 2017 Jun 18];13(22):2004–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614828>
99. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, M?kel? TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* [Internet]. 2003 [cited 2017 Jun 18];2(4):28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511394>
100. Dagon Y, Avraham Y, Berry EM. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2? in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Feb 3 [cited 2017 Jun 18];340(1):43–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377306>

101. Habinowski SA, Witters LA. The Effects of AICAR on Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001 Sep 7 [cited 2017 Jun 18];286(5):852–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527376>
102. Sim AT, Hardie DG. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* [Internet]. 1988 Jun 20 [cited 2017 Jun 18];233(2):294–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2898386>
103. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, et al. Anti-lipolytic Action of AMP-activated Protein Kinase in Rodent Adipocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 25 [cited 2017 Jun 18];280(26):25250–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878856>
104. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* [Internet]. 1994 Oct 10 [cited 2017 Jun 18];353(1):33–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926017>
105. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* [Internet]. 2004;429(6993):771–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02583>
106. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2008 Jul 18 [cited 2017 Jun 13];283(29):20015–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18482975>
107. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. American Physiological Society; 2010 Apr [cited 2017 Jun 13];298(4):E751-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103737>
108. Bahrami SA, Bakhtiari N. Ursolic acid regulates aging process through enhancing of metabolic sensor proteins level. *Biomed Pharmacother* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2016;82:8–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.047>
109. Jiang Q, Hao R, Wang W, Gao H, Wang C. SIRT1/Atg5/autophagy are involved in the antiatherosclerosis effects of ursolic acid. *Mol Cell Biochem*. Springer US; 2016;420(1–2):171–84.
110. Bakhtiari N, Hosseinkhani S, Soleimani M, Hemmati R, Noori-Zadeh A, Javan M, et al. Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation through enhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. *Biomed Pharmacother* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2016;78(2016):185–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.010>
111. Jiang S, Wang W, Miner J, Fromm M. Cross Regulation of Sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in Conjugated Linoleic Acid Treated Adipocytes. *PLoS One*. 2012;7(11):1–11.

112. Sozio MS, Lu C, Zeng Y, Liangpunsakul S, Crabb DW. Activated AMPK inhibits PPAR- and PPAR- transcriptional activity in hepatoma cells. *AJP Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(4):G739–47.
113. Ertunc ME, Sikkeland J, Fenaroli F, Griffiths G, Daniels MP, Cao H, et al. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *J Lipid Res* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2015 Feb 1 [cited 2017 Jun 13];56(2):423–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535287>
114. Birkenmeier EH, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon JI, Landschulz WH, et al. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev* [Internet]. 1989 Aug [cited 2017 Jun 21];3(8):1146–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2792758>
115. Mason RJ, Pan T, Edeen KE, Nielsen LD, Zhang F, Longphre M, et al. Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP α , C/EBP β , and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2017 Jun 21];112(2):244–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865412>
116. Tang Q-Q, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003 Jan 7 [cited 2017 Jun 21];100(1):44–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502791>
117. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPAR γ induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP α during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Jan 1 [cited 2017 Jun 21];101(1):22–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421462>
118. Park EA, Roesler WJ, Liu J, Klemm DJ, Gurney AL, Thatcher JD, et al. The role of the CCAAT/enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *Mol Cell Biol* [Internet]. American Society for Microbiology; 1990 Dec [cited 2017 Jun 21];10(12):6264–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147222>
119. Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, et al. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* [Internet]. 1989 Sep [cited 2017 Jun 21];3(9):1323–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606350>
120. Kaestner KH, Christy RJ, Lane MD. Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1990 Jan [cited 2017 Jun 21];87(1):251–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404278>
121. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* [Internet]. 1994 Jul 15 [cited 2017 Jun 21];8(14):1654–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7958846>

122. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Jun 2 [cited 2017 Jun 21];270(22):12953–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768881>
123. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed S V, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* [Internet]. 1995 Aug 25 [cited 2017 Jun 21];269(5227):1108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7652557>
124. Bakopanos E, Silva JE. Thiazolidinediones inhibit the expression of β 3-adrenergic receptors at a transcriptional level. *Diabetes*. 2000;49(12):2108–15.
125. Sanhueza C J, Valenzuela B A. RECEPTORES NUCLEARES Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS: ALGO MÁS QUE PRODUCCIÓN DE ENERGÍA Y ESENCIALIDAD. *Rev Chil Nutr* [Internet]. Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología; 2006 Aug [cited 2017 May 31];33(2):150–61. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182006000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en
126. Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 Jun 18];21(12):469–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121836>
127. Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2010 Apr 29 [cited 2017 Jun 18];318(1–2):61–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772894>
128. Kim SH, Hong JH, Lee YC. Ursolic acid, a potential PPAR?? agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma. *Eur J Pharmacol* [Internet]. Elsevier; 2013;701(1–3):131–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.033>
129. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;156(1–2):20–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
130. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Boström P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature* [Internet]. 2010;466(7305):451–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09291>
131. Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, et al. Mechanisms of early insulin sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(6):1621–9.
132. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999;257(1):79–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99902553>
133. Beltowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med*

Sci Monit. 2003;9(2):55–62.

134. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2003;14(6):561–6. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00041433-200312000-00003>
135. Reyes C a D. Adiponectina : El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Rev Endocrinol y Nutr*. 2007;15(3):149–55.
136. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes (obesity/nuclear receptor/peroxisome proliferator-activated receptor γ). *Cell Biol*. 1996;93(June):5793–6.
137. Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, et al. Thiazolidinediones Down-Regulate Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells: A Possible Role for PPAR γ in Endothelial Function. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 May [cited 2017 May 30];258(2):431–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99906484>
138. Faouzi M, Leshan R, Björnholm M, Hennessey T, Jones J, Münzberg H. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology*. 2007;148(11):5414–23.
139. A. Tjärnlund. H. Brogren. E. Lo. X. Wang. Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Thrombotic Cerebrovascular Diseases. *Changes*. 2012;29(10):997–1003.
140. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):47–60.
141. Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, et al. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin* [Internet]. 2007;117(10):2860–8. Available from: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/117/10/2860%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994606&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
142. Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, et al. The pancreatic δ cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2006;4(4):291–302.
143. Brabant G. Hepatic leptin signaling in obesity. *FASEB J* [Internet]. 2005;14:1–14. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.04-2846fje>
144. Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen B. Effects of Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines on Leptin Production in Human Adipose Tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;190(1–2):91–9.
145. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* [Internet]. 2005 Mar 15 [cited 2017 Jun 21];174(6):3137–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749839>
146. Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human Leptin Enhances Activation and Proliferation of Human Circulating T Lymphocytes. *Cell Immunol* [Internet]. 2000 Jan 10 [cited 2017 Jun 21];199(1):15–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675271>

147. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes. *Cell Immunol* [Internet]. 1999 May 25 [cited 2017 Jun 21];194(1):6–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357875>
148. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* [Internet]. 1998 Jan [cited 2017 Jun 21];12(1):57–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438411>
149. Cava A La, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 May [cited 2017 Jun 21];4(5):371–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122202>
150. Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Leptin Activates Human B Cells to Secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 Signaling Pathway. *J Clin Immunol* [Internet]. 2011 Jun 18 [cited 2017 Jun 21];31(3):472–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243519>
151. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* [Internet]. 1995 Nov [cited 2017 Jun 13];1(11):1155–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584987>
152. Couillard C, Mauriège P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, et al. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. 2000 Jun [cited 2017 Jun 13];24(6):782–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878687>
153. Lu YH, Dallner OS, Birsoy K, Fayzikhodjaeva G, Friedman JM. Nuclear Factor-Y is an adipogenic factor that regulates leptin gene expression. *Mol Metab. Elsevier GmbH*; 2015;4(5):392–405.
154. Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, Espenshade PJ. Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* [Internet]. 2000 Aug 4 [cited 2017 Jun 18];102(3):315–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975522>
155. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* [Internet]. 1994 Apr 8 [cited 2017 Jun 18];77(1):53–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8156598>
156. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1999 Sep 28 [cited 2017 Jun 18];96(20):11041–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500120>
157. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Matsumoto G, Koike M, Uchiyama Y, et al. NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;5:1–15. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms4354>
158. Ly LL, Yoshida H, Yamaguchi M. Nuclear transcription factor Y and its roles in

- cellular processes related to human disease. *Am J Cancer Res* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2013 [cited 2017 Jun 19];3(4):339–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23977444>
159. Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, et al. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2017 Jun 19];23(13):3552–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549037>
 160. Reed BD, Charos AE, Szekely AM, Weissman SM, Snyder M. Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes. *PLoS Genet* [Internet]. Public Library of Science; 2008 Jul 25 [cited 2017 Jun 19];4(7):e1000133. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654640>
 161. Park S-K, Oh S-Y, Lee M-Y, Yoon S, Kim K-S, Kim J-W. CCAAT/Enhancer Binding Protein and Nuclear Factor-Y Regulate Adiponectin Gene Expression in Adipose Tissue. *Diabetes* [Internet]. 2004 [cited 2017 Jun 19];53. Available from: <https://ir.ymlib.yonsei.ac.kr/bitstream/22282913/112787/1/T200401863.pdf>
 162. Wrann CCD, Eguchi J, Bozec A, Xu Z, Mikkelsen T, Gimble J, et al. FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 2012;122(3):1010–21. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/58431>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322535/>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322535&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 163. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009 Dec [cited 2017 Jun 19];1(6):a001651. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457564>
 164. Patil KR, Mohapatra P, Patel HM, Goyal SN, Ojha S, Kundu CN, et al. Pentacyclic Triterpenoids Inhibit IKK β Mediated Activation of NF- κ B Pathway: In Silico and In Vitro Evidences. Gautam S, editor. *PLoS One* [Internet]. University of Texas Medical Branch at Galveston; 2015 May 4 [cited 2017 Jun 19];10(5):e0125709. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0125709>
 165. Gaviria C, Ochoa C, Sánchez N. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Univ Nac Colomb Sede Medellín* [Internet]. 2009;(June 2016):93–112. Available from: <http://www.aoxlab.com/wp-content/uploads/2009-2010/Libro-Agraz-Art5-Propiedades-Antioxidantes-De-Los-Frutos-De-Agraz.pdf>
 166. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnol Aliment*. 2005;25(4):726–32.
 167. Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (orac) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect en Nutr Humana* [Internet]. 2014;16(1):25–36. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082014000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 168. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the

autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* [Internet]. 2008 Nov 13 [cited 2017 Jun 19];456(7219):264–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849965>

169. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 13 [cited 2017 Jun 19];469(7329):221–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124315>
170. Plantinga TS, Joosten LAB, Netea MG. ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. *Autophagy* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Jun 19];7(9):1074–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673517>
171. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, Deregowska A, Wnuk M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. *Apoptosis*. Springer US; 2017;22(6):800–15.
172. Leng S, Iwanowycz S, Saaoud F, Wang J, Wang Y, Sergin I, et al. Ursolic acid enhances macrophage autophagy and attenuates atherogenesis. *J Lipid Res* [Internet]. 2016 Jun [cited 2017 Jun 18];57(6):1006–16. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M065888>