



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**EUPATILINA Y 5,6,3'-TRIHIDROXI-7,4'-DIMETOXIFLAVONA
MODULAN DIFERENCIALMENTE LA ADIPOGÉNESIS EN
CÉLULAS DE MAMÍFERO**

Tesis que presenta

Eva Margarita Alvídrez Armendáriz

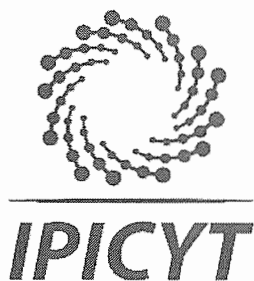
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Eupatilina y 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona modulan diferencialmente la adipogénesis en células de mamífero”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Eva Margarita Alvidrez Armendáriz** y aprobada el primero de agosto del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Codirector de la tesis

Dr. Francisco Elihu Bautista Redonda
Codirector de la tesis

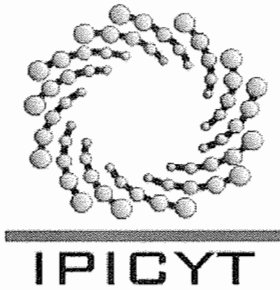
Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis se desarrolló en los Laboratorios de Química de Productos Naturales (CIIDZA) y Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Luis Antonio Salazar Olivo y Francisco Elihú Bautista Redonda.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (861403) y un apoyo especial del Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 197 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de agosto del año 2019, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda	Presidenta	IPICYT
Dr. Francisco Elihu Bautista Redonda	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Eva Margarita Alvidrez Armendáriz

sobre la Tesis intitulada:

Eupatilina y 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona modulan diferencialmente la adipogénesis en células de mamífero

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Francisco Elihu Bautista Redonda
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

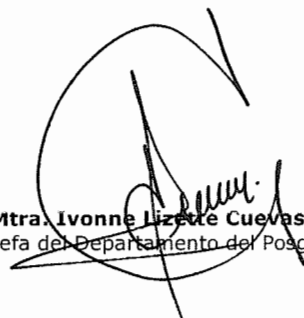
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:39 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de agosto de 2019.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A Dios, que él me permitió estar aquí y cumplir mis objetivos.

A mi tío Lacho QEPD, él siempre creyó en mí, y me dijo que la única persona que podía detenerme en todos mis sueños era yo misma.

Mi familia el pilar más importante de todos, los que me impulsan a seguir mis sueños y cuidan a mi bebé cuando no estoy.

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por la beca 861403 otorgada, así como al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT) por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de este trabajo y por todo el apoyo académico y administrativo.

Gracias al Dr. Luis Salazar Olivo que me dio la confianza para integrarme en su grupo de trabajo y brindarme de su tiempo y paciencia todo el tiempo. Así como al Dr. Elihú Bautista Redonda que me permitió trabajar con él hombro con hombro y me enseñó los principios de las extracciones.

Gracias a la Dr. Angélica Montoya Contreras por tener toda la paciencia del mundo para enseñarme las técnicas del cultivo celular y biología molecular y estar ahí cuando tenía cualquier duda o problema, además de aguantarme todos los días. Así como a la Dra. Viridiana Pérez Nájera por todos sus comentarios y observaciones en la redacción de la tesis, que aún sin conocerme me ayudó mucho.

Muchas a la Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por todas sus observaciones y comentarios sobre esta tesis y trabajos previos.

Biol. Mireya Sánchez por todos sus buenos ánimos y apoyo, así como al Dr. Rubén López Revilla por sus agradables charlas y consejos y por ese café tan rico que me brindaba. También a C. Gloria Alicia López Niño muchas gracias por tener siempre mi material listo, por no enojarte por todo lo que ensuciaba, sin olvidar tus largas charlas y consejos.

Compañeros Lab 3. Clara, tío Víctor, Argenis, Nataly, Dany, Billie, Mariana, Olmo, por todos los buenos momentos y consejos, por ser igual de gorditos que yo, alimentarme para mejorar mi humor y aguantar mis ataques de risa y locura que eran muy seguido.

Al team CIIDZA por la compañía y los gratos momentos que pasamos. En especial a los chicos de LPN (Lau, Sara, David, Jenny, el padrino, el jefe) que en un corto tiempo tuvimos excelentes momentos, en especial los jueves.

Agradezco de todo corazón a mis roomies (Sher, Dany, Jenny, Ana y Alex), que siempre se preocupan por mí, y me han hecho mil favores y me han enseñado a ser paciente y controlar mi carácter. En especial a Sher que siempre me lleva las cosas que olvido y me ha abierto las puertas de casa como si fuera de su familia.

A todas las personas que he conocido durante esta etapa, en especial a Facu, Pepe, Vale, Jackie, team Michoacán, Kiki, Karla, que me han dejado grandes enseñanzas y que en tan poco tiempo se han ganado un lugar en mi corazón y se han vuelto parte importante en mi vida.

En especial pero no menos importante a mi familia, mis papás, mis hermanos y mi pollo, que siempre han creído en mí y están siempre para mí. También mis primos en especial Maru y Lupita que saben cuándo mandarme el mensaje adecuado.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de material complementario	x
Resumen	xi
Abstract	Xii
Introducción	1
Materiales y métodos	4
Obtención, purificación y caracterización de los flavonoides	7
Cultivo celular	8
Ensayo de viabilidad celular	8
Diferenciación adiposa	8
Tinción con rojo oleoso O	9
Expresión génica mediante PCR punto final	10
Análisis estadístico	11
Resultados y discusión	12
Caracterización de los flavonoides	12
Ensayo de viabilidad celular utilizando DIM y EUP	13
Efecto de DIM y EUP sobre la diferenciación celular de preadipocitos 3T3-F442A	15
Acumulación lipídica en células 3T3-F442A sometidas a EUP y DIM	16
DIM y EUP afectan la expresión de PPAR γ y CEBP α en adipocitos 3T3-F442A y HAST	19
Conclusión	24
Referencias	25
Material suplementario	30

Lista de tablas

1. Secuencias de primers específicos utilizados	11
---	----

Lista de figuras

1. Esquema del aislamiento de los flavonoides de <i>S. amarissima</i>	5
2. Identificación de 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM), eupatilina (EUP) y apigenina (API) por RNM ¹ H	12
3. Efecto de DIM y EUP sobre la viabilidad celular de 3T3-F442A	13
4. Efecto de DIM y EUP sobre la viabilidad celular de HAST	14
5. Efecto de DIM y EUP sobre la diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A	15
6. Efecto de DIM y EUP sobre la acumulación lipídica en 3T3-F442A	17
7. Efecto de DIM y EUP sobre la acumulación lipídica en adipocitos 3T3-F442A	19
8. Efecto de DIM y EUP sobre la expresión de PPAR γ y CEBP α en 3T3-F442A	21
9. Efecto de DIM y EUP sobre la expresión de PPAR γ y CEBP α en HAST	22

Material suplementario

1. Tablas de los solventes utilizados como fases móviles en las diferentes columnas utilizadas	31
2. Espectros de ^1H obtenidos por RMN del compuesto DIM	33
3. Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto DIM	34
4. Espectros de correlación (COSY) del compuesto DIM	35
5. Espectros de ^1H obtenidos por RMN del compuesto EUP	36
6. Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto EUP	37
7. Espectros de correlación (COSY) del compuesto EUP	38
8. Espectros de ^1H obtenidos por RMN del compuesto API	39
9. Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto API	40
10. Espectros de correlación (COSY) del compuesto API	41

Resumen

Eupatilina y 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona modulan diferencialmente la adipogénesis células de mamíferos

La obesidad es un problema de salud mundial, y una condición que se caracteriza por la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, en la que la diferenciación adiposa juega un papel importante. La diferenciación adiposa es regulada por factores de transcripción, como PPAR γ y C/EBP α , que desencadenan una cascada de señales que activan la maquinaria de síntesis de lípidos. Estudios previos muestran que flavonoides como Eupatilina (EUP) inhiben la activación de PPAR γ y C/EBP α en preadipocitos 3T3-L1, pero se desconoce si tienen el mismo efecto sobre todos los linajes de preadipocitos. Los efectos de otros flavonoides como 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) sobre la adipogénesis se desconocen. Nosotros purificamos EUP y DIM de *Salvia amarissima* y analizamos su efecto sobre la adipogénesis en preadipocitos murinos 3T3-F442A y preadipocitos humanos subcutáneos primarios, mediante la acumulación lipídica y el análisis de la expresión de PPAR γ y C/EBP α . En preadipocitos 3T3-F442A se observó que EUP (10 μ M) tiene un efecto anti-adipogénico al bloquear la acumulación lipídica y la expresión de PPAR γ y CEBP α . Mientras que, DIM (10 μ M) bloqueó la adipogénesis sobre preadipocitos humanos al disminuir la expresión de PPAR γ y CEBP α . Los resultados sugieren que estos flavonoides son potenciales candidatos para estudios posteriores sobre adipogénesis.

PALABRAS CLAVE. Eupatilina (EUP), 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM), adipogénesis, PPAR γ y CEBP α

Abstract

Eupatilin and 5,6,3'-trihydroxy-7,4'-dimethoxy flavone differentially modulate mammalian cell adipogenesis

Obesity is a global health problem, which is characterized by hyperplasia and hypertrophy of adipocytes, where the additive difference plays an important role. Adipose differentiation is regulated by transcription factors, such as PPAR γ and C/EBP α , which trigger a cascade of signals that activate the lipid synthesis machinery. Previous studies show that flavonoids such as Eupatilin (EUP) inhibit PPAR γ activation and C/EBP α in 3T3-L1 preadipocytes, but it is unknown if they have the same effect on all preadipocyte lineages. The effects of other flavonoids such as 5,6,3'-trihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (DIM) on adipogenesis are unknown. We purified EUP and DIM of *Salvia amarissima* and analyzed its effect on adipogenesis in murine preadipocytes 3T3-F442A and primary subcutaneous human preadipocytes, through lipid accumulation and analysis of the expression of PPAR γ and C / EBP α . In preadipocytes 3T3-F442A it was observed that EUP (10 μ M) has an anti-adipogenic effect by blocking the lipid accumulation and the expression of PPAR γ and CEBP α . While, DIM (10 μ M) blocked adipogenesis on human preadipocytes by decreasing the expression of PPAR γ and CEBP α . The results suggest that these flavonoids are potential candidates for further studies on adipogenesis.

KEY WORDS. Eupatilin (EUP), 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavone (DIM), adipogenesis, PPAR γ and CEBP α

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad se han identificado como factores de riesgo para varias enfermedades, como problemas cardiovasculares, la diabetes y el cáncer [1-3]. En los últimos años, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a escala mundial, según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de esta enfermedad metabólica.

La obesidad se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa, asociada al incremento en número (hiperplasia) y tamaño (hipertrofia) de los adipocitos [5]. Los preadipocitos para convertirse en adipocitos llevan a cabo un proceso conocido como adipogénesis. En el que existe una serie de etapas que incluyen proliferación, detención del crecimiento, expansión clonal y diferenciación terminal [6]. Dando como resultado final la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos [6-7]. Todas las etapas se encuentran altamente reguladas, y aunque todavía no se conoce por completo todo el proceso de regulación de la adipogénesis, se han encontrado múltiples factores de transcripción involucrados que promueven o inhiben este proceso [6, 8, 9].

Dichos factores, se involucran de diferentes formas y en diferentes etapas de la adipogénesis [9]. Los primeros eventos incluyen la activación de miembros de la familia de factores de transcripción AP-1 (del inglés, Activator protein 1), con una posterior inducción de PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) [6,10]. Otros factores de transcripción que facilitan la maduración de los

adipocitos, son los miembros de la familia de proteínas KLF (Krüppel-like family), SREBP-1 (Sterol regulatory element-binding protein 1) y los miembros de la familia C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding protein) [11]. También existen factores anti-adipogénicos, que bloquean la diferenciación adiposa, como son Pref-1 (Preadipocyte factor 1), TGF β (Transforming growth factor β) y miembros de las familias GATA y Wnt [11-13].

Investigaciones recientes, como la de Hadrich y Sayadi en 2018 han encontrado que algunos flavonoides como apigetrina tienen efecto anti-adipogénico, al inhibir o estimular la expresión de algunos factores de transcripción. Los flavonoides, son metabolitos secundarios presentes en varias especies de plantas, que han demostrado su efecto sobre patologías crónicas como eventos coronarios, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, entre otros. Estos beneficios son asociado a alguna de sus propiedades, como su capacidad reductora (propiedades antioxidantes por donación de electrones o átomos de H) y su capacidad de interactuar con las proteínas [16-18].

Salvia amarissima o *Salvia circinata*, es una especie endémica de México [14] usada en la medicina tradicional para tratar principalmente úlceras, cáncer y diabetes [15]. Existen muy pocas investigaciones sobre esta planta, una de las más relevantes es la realizada por Mata y colaboradores (2017) donde se le atribuye un efecto inhibidor de α -glucosidasa como posible tratamiento contra diabetes, asociado a flavonoides como apigenin-7-O- β -D-glucósido, pedalitina y 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,6-dihidroxi-7-metoxi-4H-cromen-4-ona presentes en la planta.

Por lo que, el objetivo de este trabajo fue la extracción y purificación de flavonoides a partir de *Salvia amarissima*, y el análisis de su efecto sobre la adipogénesis en preadipocitos murinos 3T3-F442A y preadipocitos de tejido subcutáneo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación y caracterización de flavonoides de *S. amarissima*

Las hojas y flores de *Salvia amarissima* recolectadas en agosto de 2017 en Teotihuacán, Estado de México, se secaron a temperatura ambiente durante dos meses. El material vegetal seco pulverizado (3.5 kg) se extrajo por maceración con acetona (10 L, 3 veces), durante 48 horas. El extracto se filtró para eliminar los sólidos y se concentró en un rotaevaporador (Buchi R-100) a 60°C y 280 mbar. El extracto de acetona (190 g) se disolvió en Hexano (Hex) caliente (50°C) (0.5 L) y se extrajo con una mezcla de Metanol/agua (MeOH/H₂O 80:20) (300 mL, 4 veces). La fracción hexánica se descartó y la fracción acuosa se concentró a una quinta parte de su volumen. Al residuo se adicionaron 150 mL de agua y se sometió a partición con acetato de etilo (AcOEt) caliente (50°C) (300 mL, 4 veces). Después de evaporar los disolventes, se obtuvieron 4.2 g de la fracción acuosa y 11.6 g de la fracción de AcOEt. Esta última se fraccionó (Fig. 1) hasta obtener compuestos puros.

La fracción de AcOEt se adsorbió en sílica gel (Merck, 63-200 µm) y se sometió a cromatografía en columna (CC) por gravedad (4.5 cm diámetro (D), 10.0 cm altura (h), fracciones (frs) 500 mL) usando como sistema de elución los gradientes de solventes: Hex/AcOEt 8:2, Hex/AcOEt 7:3, Hex/AcOEt 6:4, Hex/AcOEt 5:5, Hex/AcOEt 4:6 y AcOEt, de los cuales se obtuvieron diferentes números de fracciones como se aprecia en el material suplementario 1.

Las fracciones se concentraron por destilación a presión reducida y se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las placas se revelaron con sulfato cérico en ácido sulfúrico 2N. Las fracciones se agruparon de la siguiente manera: frs 1-5 (F1), frs 6-7 (F2), frs 8-12 (F3), frs 13-19 (F4), frs 20-30 (F5), frs 31-35 (F6), frs 36-39 (F6), frs 40-47 (F7), frs 48-49 (F8), fr 50 (F9), fr 51 (F10), fr 52 (F11), fr 53 (F12), frs 54-55 (F13), frs 56-58 (F14).

El compuesto **1** se obtuvo por CC (2.8 cm D, 8 cm h, frs 50 mL) de la fracción **F8** (0.93 g), utilizando los gradientes de Hex/Diclorometano (CH_2Cl_2)/MeOH; 48:50:02, 45:50:05 y 40:50:10. De acuerdo al análisis por TLC, las fracciones se reunieron de la siguiente manera: frs 1-16 (F8.1), frs 17-21 (F8.2), frs 22-42 (F8.3), frs 43-44 (F8.4).

La fracción **F8.3** (0.7563 g) fue nuevamente fraccionada en CC de gel de sílice (2.8 cm D, 8 cm h, frs 25 mL), utilizando como eluyente Hexano/ CH_2Cl_2 /MeOH (45:50:05). Se obtuvieron 24 fracciones las cuales se analizaron por TLC y se agruparon en: frs 1-9 (F8.3a), frs 10-13 (F8.3b), frs 14-20 (F8.3c) y frs 21-24 (F8.3d). De la fracción **F8.3b** (161.40 mg) se obtuvo un sólido cristalino que se aisló lavando con volúmenes de 3 mL de acetona y CH_2Cl_2 hasta la formación de cristales (que indica la presencia de un compuesto puro).

Para obtener el compuesto **2**, de la fracción **F5** (4.80 g) se montó en CC de gel de sílice (4.5 cm D, 8 cm h, frs 125 mL) usando los siguientes gradientes de elución de Hex/AcOEt: 3:1, 7:3, 6:4, 5:5 y 3:7. Se agruparon por TLC de la siguiente

forma: frs 1-5 (F5.1), frs 6-8 (F5.2), frs 9-12 (F5.3), frs 13-20 (F5.4), frs 21-28 (F5.5), frs 29-30 (F5.6), frs 31-35 (F5.7) y frs 36-40 (F5.8).

La fracción **F5.5** (0.39 g) se sometió a CC de gel de sílice (2.8 cm D, 8 cm h, frs 50 mL), eluyendo con los siguientes gradientes de cloroformo (CHCl₃)/MeOH: 10:1, 99.5:0.5, 99:1, 98:2, 96:4 y 9:1. Las fracciones se analizaron por TLC y se agruparon de la siguiente manera: frs 1-15 (F5.5a), frs 16-21 (F5.5b), frs 22-32 (F5.5c), frs 33-35 (F5.5d), frs 36-38 (F5.5e), frs 39-43 (F5.5f), frs 44-46 (F5.5g). Donde fracción **F5.5b** (218.0 mg) se recristalizó con lavados de acetona y se analizó para determinar el compuesto obtenido.

El compuesto **3**, se obtuvo a partir de la fracción **F4** (2.14 g), la cual se sometió a CC de gel de sílice (2.25 cm D, 10 cm h, frs 125 mL), eluyendo con un gradiente de Hex/AcOEt 7:3, 6:4 y 5:5. Estas se analizaron por TLC si agruparon de la siguiente manera: frs 1-4 (F4.1), frs 5-7 (F4.2), frs 8-11 (F4.3), frs 12-16 (F4.4), frs 17-25 (F4.5), frs 25-28 (F4.6) y frs de 29-34 (F4.7). De las cuales la fracción **F4.4** (16.6 mg), se cristalizó y se analizó.

Los tres compuestos se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C e ¹H, así como de espectroscopía de correlación (COrrrelation Spectroscopy) (COSY) en el Instituto de Química de la UNAM para determinar su estructura química.

Cultivo celular

Los preadipocitos múridos 3T3-F442A se cultivaron con medio L15 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera (HyClone) (Medio basal; MB) a 37°C en una atmósfera húmeda libre de intercambio de gases.

Preadipocitos humanos de tejido subcutáneo (HAST) derivados de una biopsia de tejido subcutáneo inguinal de un paciente masculino de 20 meses de edad, tratado por sindáctila (A. Montoya Contreras, resultados no publicados), se cultivaron en un ambiente húmedo a 37°C, en medio L15 suplementado con 5% de suero de ternera, 5% de suero bovino fetal (HyClone) y antibióticos (penicilina 80 U/ml y estreptomycin 80 µg/ml) (Medio basal; MB).

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por recuento directo en cámara de Neubauer a las 48 y 96 horas. Ambos tipos celulares se sembraron en placas de 24 pozos a una concentración de 1×10^4 células/pozo en MB. A las 24 horas las células se expusieron a diferentes concentraciones de ambos compuestos; las células 3T3-F442A (100 µM y 50 µM) y las células HAST (10 µM, 30 µM y 50 µM), cambio de medio cada 48 horas.

Los compuestos DIM y EUP se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se aplicaron sin que el DMSO excediera al 0.1% del volumen en el medio de cultivo.

Diferenciación adiposa

Los preadipocitos 3T3-F442A fueron sembrados en placas de 24 pocillos a una concentración de 1×10^4 células/pozo en MB, a las 24 h fueron inducidas a las diferentes condiciones: MA: medio adipogénico (L15, 10 % ST, glucosa 0.5 g/L,

biotina 1 μM e insulina 5 $\mu\text{g/ml}$), MA+RA 1 μM : MA con ácido retinoico (1 μM), MA+DIM 10 μM : MA con DIM (10 μM), MA+DIM 20 μM : MA con DIM (20 μM), MA+EUP 10 μM : MA con EUP (10 μM) y MA+EUP 20 μM : MA con EUP (20 μM), con cambio de medio cada dos días. A los 11 días se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer, en el cual se contaron adipocitos y células totales.

Los preadipocitos HAST fueron sembrados en placas de 24 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pozo en MB. Transcurridas 24 h se les adicionaron los tratamientos los cuales fueron MB, MI: Medio de inducción (L15, SBF 5%, ST 5%, insulina 1 μM , d-biotina 33 μM , pantotenato de calcio 17 μM , cortisol 100 nM, T/T3 5 $\mu\text{g/mL}/2$ nM, dexametasona 100 nM, IBMX 500 μM , rosiglitazona 1 μM y penicilina/estreptomicina 80 U/mL/80 $\mu\text{g/mL}$), MI+RA 0.1 μM : MI con ácido retinoico (1 μM), y MI con EUP y DIM a concentraciones de 10, 20 y 30 μM , respectivamente. A los siete días los tratamientos con medio de inducción se cambiaron a medio de mantenimiento (MM) (L15, SBF 5%, ST 5%, insulina 1 μM , d-biotina 33 μM , pantotenato de calcio 17 μM , cortisol 100 nM, T/T3 5 $\mu\text{g/mL}/2$ nM y penicilina/estreptomicina 80 U/mL/80 $\mu\text{g/mL}$) en los que se mantuvieron las mismas concentraciones de los flavonoides. Cada 48 hrs se realizó cambio de medio durante 21 días.

Tinción con rojo oleoso O

Los preadipocitos 3T3-F442A se sembraron en placas de 24 pocillos y se sometieron a diferenciación de la misma forma que en el experimento previo. Transcurridos los 11 días posteriores a la inducción, las células fueron fijadas con formaldehído y se incubaron por 30 min a 4°C. Se retiró el exceso de formaldehído

y se agregó el rojo oleoso, incubando durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavó el exceso de rojo oleoso y la acumulación lipídica fue observada en el microscopio invertido (Leica) con un aumento de 20x. Posteriormente se hizo la extracción del colorante utilizando isopropanol y se cuantificó en el espectrofotómetro (JENWAY) a 510 nm.

Expresión génica mediante PCR punto final

Al término de la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3-F442A y HAST, se realizó un lavado con PBS-DEPC y se realizó la extracción de RNA total. La cual se llevó a cabo mediante el uso de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, el RNA fue cuantificado en el equipo Epoch (BioTek) y se evaluó su integridad mediante un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El retrotranscrito (cDNA) fue obtenido a partir de 1 µg de RNA total en un volumen de reacción de 25 µL, el cual además contenía buffer RT 4 µL, dNTPs 0.5 mM, RNasin 25 U y M-MLV RT 200 U/µL, el cual se colocó a 42°C por 90 min en el termociclador (BioRad). El cDNA fue cuantificado en Epoch y se utilizó 1 µg de este para realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR), para la cual también se requirió buffer de reacción 3 µL, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 1.5 mM, Go Taq Flexi DNA Polymerase 1.25 U y primers específicos 0.2 µM mencionados en la tabla 1 para cada gen, en un volumen final de 15 µL.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (90 V, 50 min), teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. Secuencias de primers específicos utilizados

RNA_m	Secuencias	Amplicón (pb)
GADPH	fw. GAAGGTGGTGAAGCAGGCGT rv. ATGTGGGCCATGAGGTCCACCA	226
CEBPα	fw. GGCAAAGCCAAGAAGTCGGTGG rv. AGCGTGTCCAGTTCACGGCTCA	200
PPARγ	fw. GCATCAGGCTTCCACTATGG rv. ACCTGATGGCATTGTGAGAC	193

Análisis estadísticos

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) realizada en Statgraphics Centurion (versión 18.1.11). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron para indicar diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los flavonoides

Los espectros obtenidos por RMN de ^1H (Fig. 2), ^{13}C y COSY (ver material suplementario), se analizaron para determinar la estructura de los compuestos.

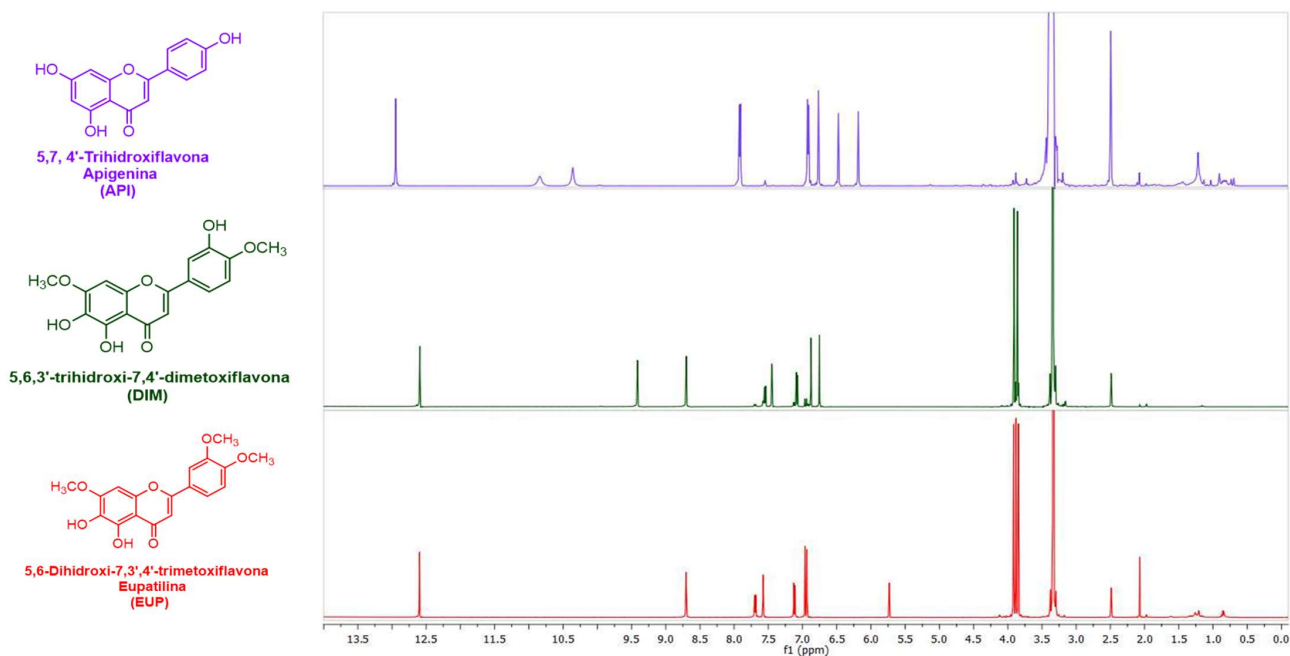


Fig. 2 Identificación de 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM), eupatilina (EUP) y apigenina (API) por RNM ^1H

Espectros obtenidos por RMN de ^1H de los compuestos obtenidos 1 (DIM), 2 (EUP) y 3 (API), que junto con los otros espectros analizados (^{13}C Y COSY; ver material suplementario), permitieron determinar las estructuras químicas de estos.

Los compuestos obtenidos fueron tres flavonas, identificadas como 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM, **1**); 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona o

eupatilina para el compuesto (EUP, **2**) y 5,7,4'-trihidroxi-flavona o apigenina (API, **3**). Las estructuras se confirmaron en la base de datos PubChem [19].

Para efectos de este trabajo sólo se realizaron análisis sobre el efecto de 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) y de 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona o eupatilina para el compuesto (EUP).

Ensayo de viabilidad celular utilizando DIM y EUP

Para determinar las concentraciones inocuas de DIM y EUP que se utilizaron en los experimentos siguientes, se realizó un recuento de preadipocitos 3T3-F442A con dos concentraciones diferentes de cada flavona, además, se utilizó un tratamiento control con el vehículo (DMSO al 0.1%) (Fig. 3).

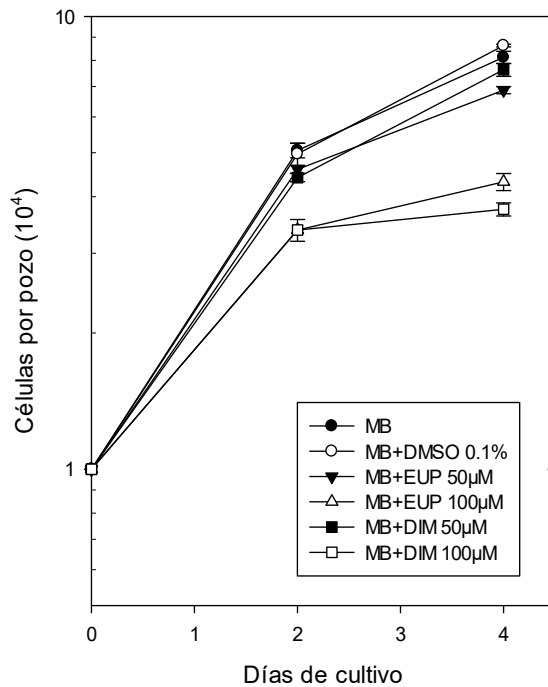


Fig. 3. Efecto de DIM y EUP sobre la viabilidad celular de 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A se sembraron (1×10^4 células/pozo) en medio basal. A las 24 horas los cultivos se realimentaron con MB, MB+DMSO 0.1%, MB con eupatilina (EUP) o MB con 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones señaladas. Los días indicados se realizaron recuentos celulares en un hematómetro.

Los resultados muestran que las concentraciones de 100 μM de EUP y DIM disminuyen la proliferación celular, ya que desde el segundo día de cultivo se aprecia que el recuento celular es menor respecto a los controles. En cambio con concentraciones de 50 μM de ambas flavonas no se tuvo una diferencia en el número de células respecto a los controles (MB y MB+DMSO 0.1%).

Por otro lado, en preadipocitos HAST (Fig. 4) se aprecia que ninguna de las concentraciones utilizadas de DIM y EUP resultaron ser dañinas para las células, ya que todas presentaron un efecto similar a los controles utilizados (MB y MB+DMSO 0.1%). Por lo que concentraciones de 50 μM resultan ser inocuas para ambos linajes de preadipocitos y pueden ser usadas en estudios posteriores.

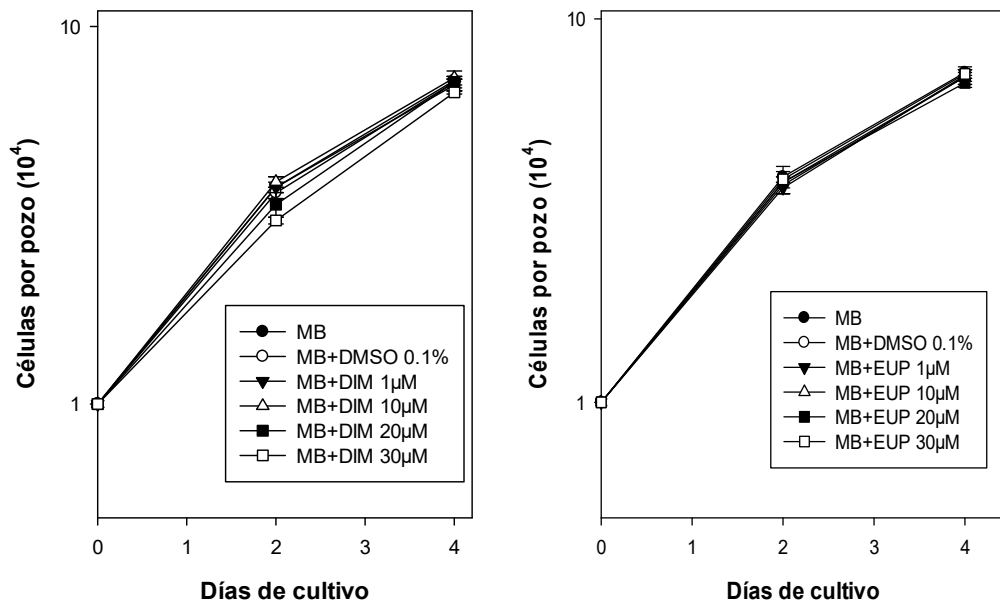


Fig. 4 Efecto de DIM y EUP sobre la viabilidad celular de HAST

Células HAST se sembraron (1×10^4 células/pozo) en MB: medio basal, a las 24 horas se cambiaron a MB, MB+DMSO 0.1% (controles positivos), MB con eupatilina (EUP) y 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a diferentes concentraciones. Se realizó recuento celular cada 48 horas durante 4 días.

Efecto de DIM y EUP sobre la diferenciación celular de preadipocitos 3T3-F442A

Las células 3T3-F442A se sometieron a diferenciación adiposa mediante el uso de medio adipogénico (MA), el cual cuenta con compuestos que promueven la diferenciación. Para los tratamientos con DIM y EUP, se utilizaron concentraciones de 10 y 20 μM para cada uno y se utilizó ácido retinoico a 1 μM como control positivo inhibitorio de la adipogénesis (Fig. 5).

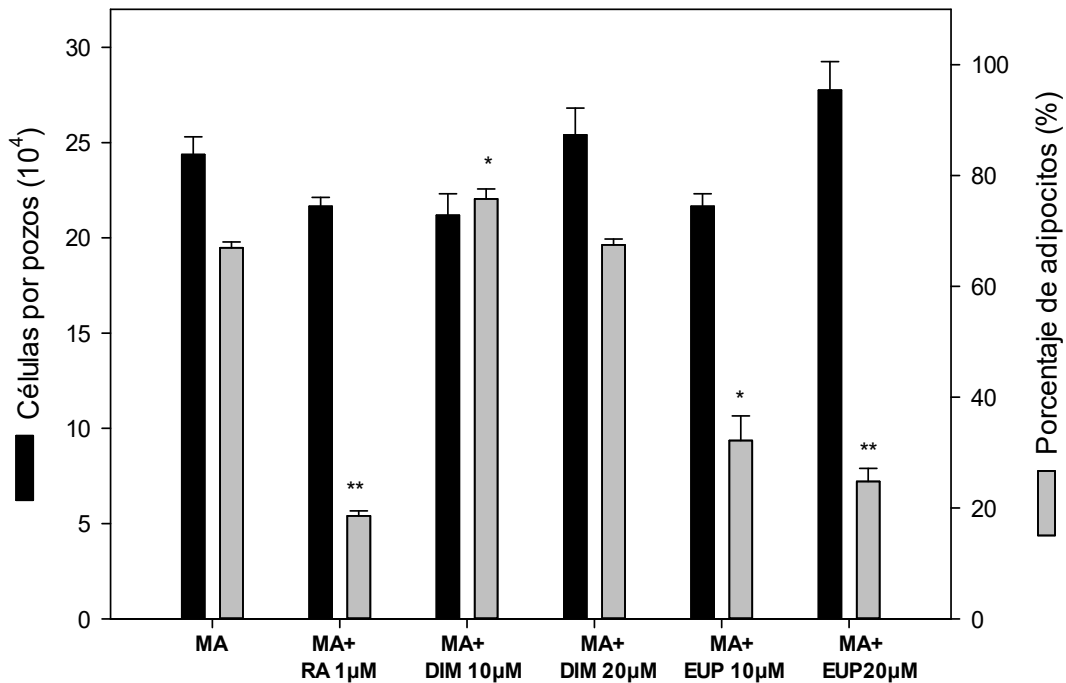


Fig. 5. Efecto de DIM y EUP sobre la diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A.

Preadipocitos 3T3-F442A se sembraron (1×10^4 células/pozo) con medio basal. A las 24 horas, los cultivos se realimentaron con medio adipogénico (MA), MA con ácido retinoico (RA), MA con eupatilina (EUP) o MA con 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones señaladas. Once días después se determinaron las células totales y diferenciadas en cada tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm EEM de 6 experimentos independientes realizados en tratamientos por duplicado. Los asteriscos señalan diferencias significativas respecto al control MA (*, $P < 0.05$; **, 0.01).

Transcurrido el tiempo establecido de 11 días, se realizó recuento celular, donde se contaron células viables totales y adipocitos. En estos resultados se observó que la proliferación celular de los tratamientos con las flavonas no tiene diferencia significativa respecto al control con MA. Con lo que se puede inferir que durante todo el tiempo en el que las células estuvieron sometidas a los tratamientos, no existieron factores o condiciones que afectaran el desarrollo de las células.

El ácido retinoico (RA) fue utilizado como un control positivo que inhibe la adipogénesis, Kuri-Harcuch y colaboradores (1982) demostraron que RA a una concentración de 1 μM inhibe la conversión adiposa en células 3T3-F442A. Sin embargo, algunas células lograron diferenciarse (20%), esto es debido a que estas células ya estaban comprometidas a la diferenciación antes de estar sometidas al tratamiento con RA, el cual sólo actúa en preconfluencia, lo que se considera diferenciación de fondo [20].

En lo que respecta a los flavonoides, con DIM (10 μM) hubo una diferenciación de preadipocitos a adipocitos del 75.76%, la cual es mayor que el control con MA. Mientras que a 20 μM se obtuvo un porcentaje de conversión celular de 67.47%, la cual no muestra diferencia significativa con el control con MA. Mientras que con EUP, a una concentración de 20 μM se obtuvo una conversión adiposa del 24.79%, igual al control con RA. EUP (10 μM) obtuvo una conversión adiposa del 32.17%, que aunque es mayor que el control de RA, si hubo un efecto inhibitorio. Por lo que, EUP a partir de 10 μM tiene un efecto de bloqueo sobre la adipogénesis.

Acumulación lipídica en células 3T3-F442A sometidas a EUP y DIM

Para confirmar la información obtenida anteriormente, se realizó la prueba de rojo oleoso O, en el cual se tiñen los lípidos que la célula acumula. Las células se sometieron a las condiciones del tratamiento anterior, se fijaron y se tiñeron, para tomar fotografías en el microscopio óptico (Fig. 6).

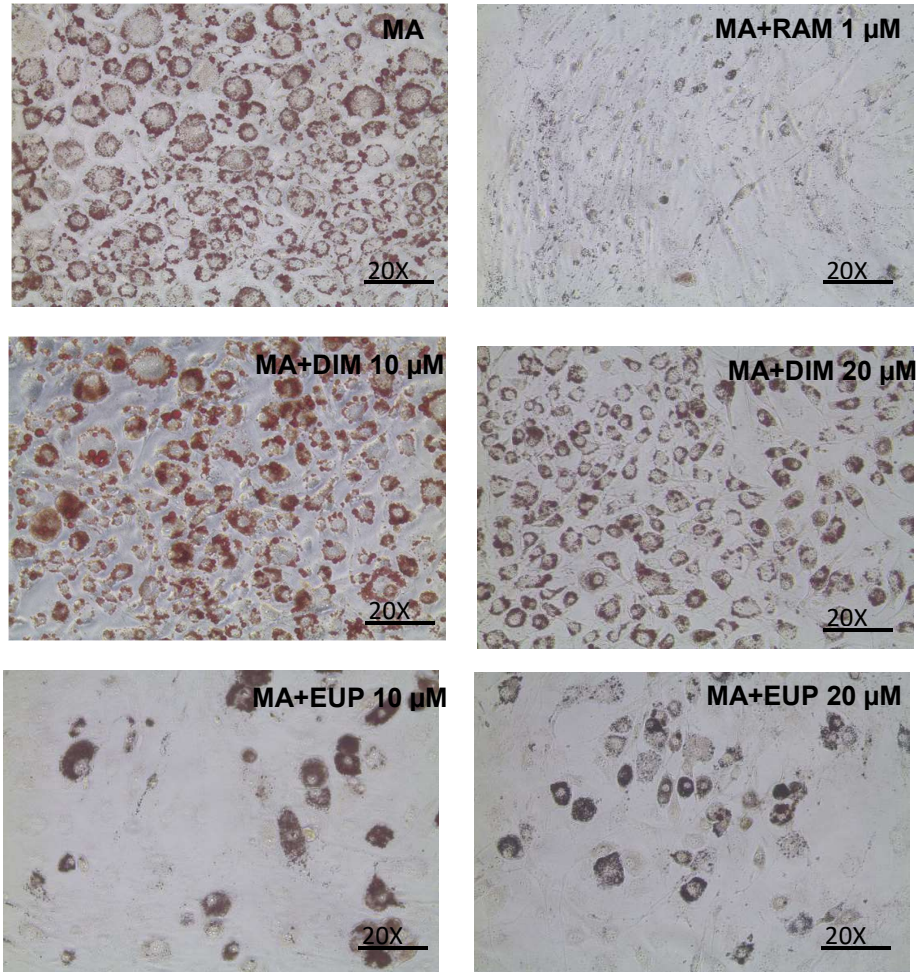


Fig. 6 Efecto de DIM y EUP sobre la acumulación lipídica en 3T3-F442A.

Preadipocitos 3T3-F442A se sembraron (1×10^4 células/pozo) con medio basal y 24 horas después se realimentaron con medio adipogénico (MA) MA con ácido retinoico (RA), MA con eupatilina (EUP), o MA con 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones indicadas. Luego de 11 días de tratamiento, las células se fijaron con formaldehído al 3% y se tiñeron con rojo oleoso O.

En las fotografías de las células sometidas a DIM a 10 μM y 20 μM se aprecia acumulación de gotas lipídicas igual que el control con MA, lo cual se asocia a la alta cantidad de preadipocitos diferenciados. En el control con RA la acumulación gotas de lípidos es casi nula. Mientras que, en los tratamientos de EUP a 10 μM y 20 μM , las células no lograron diferenciarse en su mayoría, por las gotas de lípidos son menores que el control MA.

Después se extrajo el rojo oleoso y se realizó la cuantificación de las absorbancias a 510 nm de cada tratamiento, que fueron normalizadas para obtener el porcentaje total de acumulación lipídica en cada tratamiento, donde el control con MA se considera el 100% de acumulación lipídica y el control de RA es el 0% de acumulación lipídica (Fig. 7).

En los tratamientos donde se utilizó DIM; a una concentración de 10 μM el porcentaje de acumulación lipídica fue de 104.68%, que es mayor que el tratamiento control con MA. Para DIM (20 μM) el resultado fue 80.30% de acumulación lipídica, que es menor al control con MA. Las células condicionadas a EUP tanto 10 μM como 20 μM , tuvieron un porcentaje de acumulación nulo, igual al tratamiento control de ácido retinoico (RA). Lo anterior corrobora que EUP actúa bloqueando la adipogénesis.

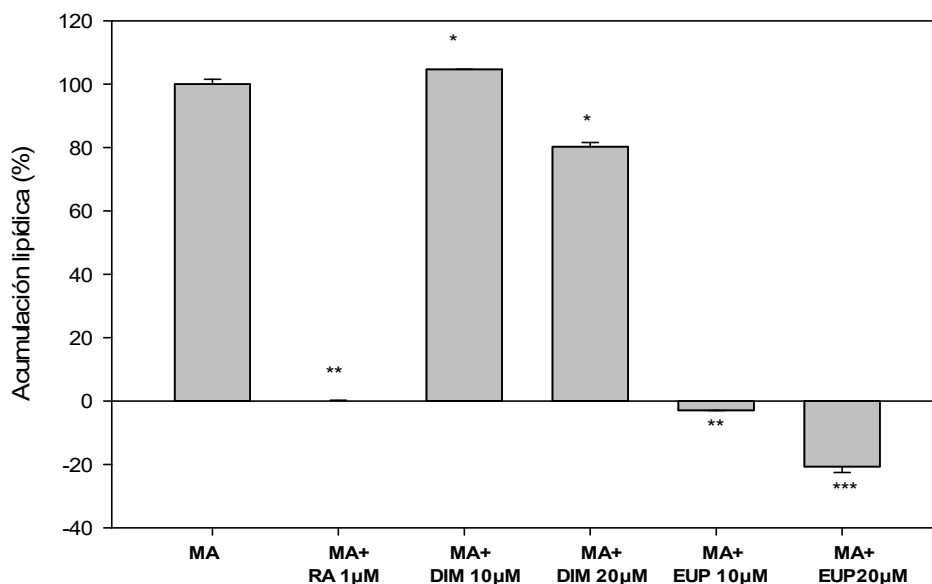


Fig. 7. Efecto de DIM y EUP sobre la acumulación lipídica en adipocitos 3T3-F442A.

Preadipocitos 3T3-F442A se sembraron (1×10^4 células/pozo) en medio basal y 24 horas después se realimentaron con medio adipogénico (MA), MA con ácido retinoico (RA), MA con eupatilina (EUP) o MA con 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones señaladas. Once días después los cultivos se fijaron y tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica. Los datos se presentan como la media \pm EEM de 6 experimentos independientes realizados en tratamientos por duplicado. Los asteriscos señalan diferencias significativas respecto al control MA (*, $P < 0.05$; **, 0.01; ***, 0.001).

DIM y EUP afectan la expresión de PPAR γ y CEBP α en preadipocitos 3T3-F442A y HAST

Debido a que EUP mostró un efecto de bloqueo sobre la adipogénesis, se procedió a realizar análisis moleculares para ver la expresión de dos de los principales factores de transcripción que están relacionados con dicho mecanismo.

Existe una cascada de señales transcripcionales que regula la diferenciación terminal de los preadipocitos a adipocitos [22] donde la primera etapa de la adipogénesis comienza con la activación de dos miembros de familia de las

(C/EBPs). C/EBP β y C/EBP δ , inducen directamente la expresión de C/EBP α y PPAR γ , conocido como el regulador maestro de la adipogénesis. Ambos reguladores transcripcionales son clave para la diferenciación de adipocitos [22-25].

PPAR γ activa el promotor del gen que codifica C/EBP α , y viceversa, creando un bucle de retroalimentación positiva. Además, estos dos factores inducen la expresión de genes que están implicados en la sensibilidad a la insulina, la lipogénesis y la lipólisis, incluidos los que codifican al transportador de glucosa (GLUT4), proteína de unión a ácidos grasos (FABP4), lipoproteína lipasa (LPL), perilipina y los factores secretados de adiponectina y leptina [21,23]. Por lo que los dos genes analizados fueron CEBP α y PPAR γ .

En los resultados obtenidos (Fig. 8) se puede apreciar que en el tratamiento con MA ambos genes se ven expresados de forma significativa. Caso contrario en el control con RA (1 μ M), donde CEBP α se atenúa de forma considerable, mientras que PPAR γ presenta una ligera atenuación. Esto se debe a que, como se mencionó anteriormente, algunas células se encontraban ya comprometidas cuando se agregó el RA, el cual solo tiene un efecto en preconfluencia [26-27]. Además, RA tiene un mayor efecto de inhibición sobre CEBP α que sobre PPAR γ , debido a que actúa directamente sobre la familia de las C/EBPs [26]. Y debido a que PPAR γ es suficiente para inducir la diferencia adiposa en fibroblastos [21], los resultados anteriores de diferenciación adiposa y acumulación lipídica corroboran esta información.

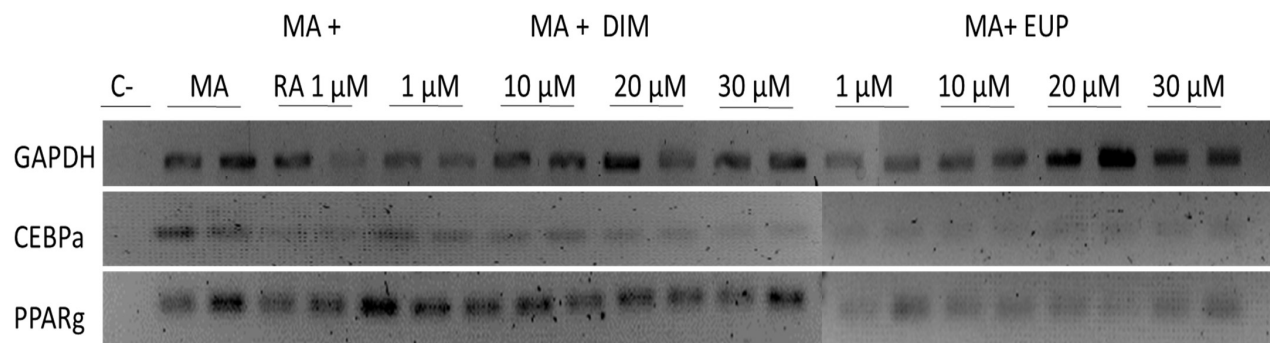


Fig. 8 Efecto de DIM y EUP sobre la expresión de PPAR γ y CEBP α en preadipocitos 3T3-F442A

Preadipocitos 3T3-F442A se sembraron (1×10^4 células/pozo) en medio basal y 24 horas después se realimentaron con medio adipogénico (MA), MA con ácido retinoico (RA), MA con eupatilina (EUP) o MA con 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones señaladas. Once días después, el RNA fue extraído y analizado mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de mRNAs de los genes PPAR γ y CEBP α , GAPDH como control positivo.

En los tratamientos con DIM, la expresión de CEBP α fue disminuyendo conforme la concentración del flavonoide aumentaba. Sin embargo se puede apreciar que la expresión de PPAR γ se mantuvo constante, por lo que el proceso de adipogénesis no se vio interrumpido en las células sometidas a estos tratamientos. Caso contrario a los preadipocitos sometidos a las cuatro diferentes concentraciones de EUP, donde la expresión tanto de CEBP α como PPAR γ , fue mínima, incluso en la concentración de 1 μ M. Lo que indica que este compuesto no solo disminuye la expresión de CEBP α , sino también la de PPAR γ , por lo que la adipogénesis se ve disminuida incluso en mayor forma que el control con RA.

Por otro lado, en las células de tejido adiposo subcutáneo humano (HAST), solo se realizó análisis molecular (Fig. 9) debido a que estas células en experimentos *in vitro*, tienen lenta acumulación lipídica, ya que van perdiendo capacidad adipogénica conforme aumenta el número de subcultivos [29].

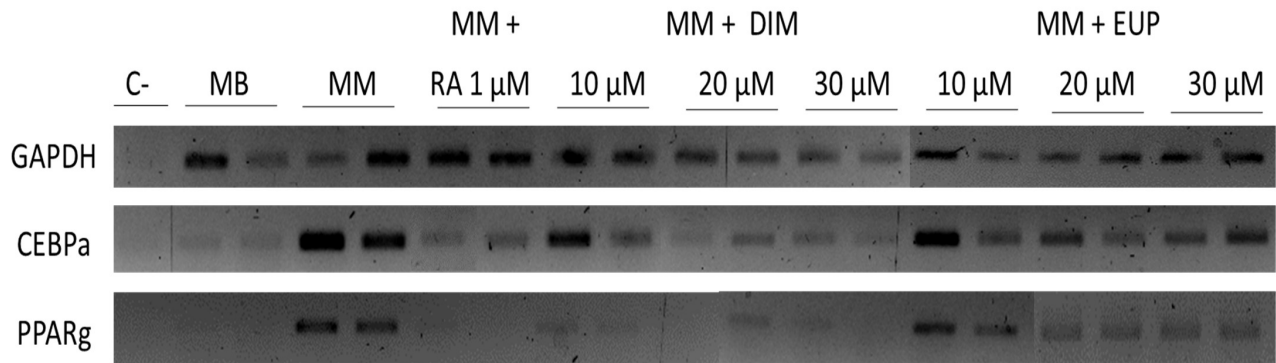


Fig. 9 Efecto de DIM y EUP sobre la expresión de PPARγ y CEBPα en HAST

Preadipocitos HAST se sembraron (2×10^4 células/pozo) en medio basal, y 24 horas después se realimentaron con MB, MI (medio de inducción), MI con ácido retinoico (RA), MI con eupatilina (EUP) o 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) a las concentraciones señaladas. Siete días después, los tratamientos con MI, fueron cambiados por MM (medio de mantenimiento) manteniendo las mismas concentraciones de los compuestos. A los 21 días el RNA fue extraído y analizado mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de mRNAs de los genes PPARγ y CEBPα, GAPDH como control positivo.

Aunque las células HAST no acumularon gran cantidad de lípidos, su maquinaria ya está comprometida a la diferenciación como se aprecia en el control con medio de mantenimiento (MM), donde se ve la activación de CEBPα y PPARγ. Mientras que la expresión de estos genes en las células sometidas sólo a medio basal (MB) es nula debido a que se requieren ciertos compuestos, principalmente hormonas y otros factores que favorecen la activación de los mecanismos de diferenciación,

los cuales no se encuentran presentes en este medio, a diferencia del medio de inducción que encienden la cascada de señalización de la adipogénesis [30].

Para el caso de control RA los genes CEBP α como PPAR γ se ven atenuados. Mientras que en los tratamientos con DIM a partir de 10 μ M se tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de CEBP α y sobre PPAR γ . Y esto se ve más claramente a 20 y 30 μ M, donde para CEBP α las bandas son más tenues incluso que el control RA. En las células con EUP la expresión de CEBP α se aprecia muy poco afectada en las tres concentraciones utilizadas. Sin embargo, a partir de 20 μ M, si hay una disminución en la expresión de PPAR γ , por lo que sí existe una disminución de la adipogénesis.

En lo que respecta a las diferencias sobre los efectos de los flavonoides en ambos tipos de preadipocitos, Salazar-Olivo y colaboradores (2014) demostraron que existen compuestos que presentan diferente actividad sobre líneas ya establecidas de preadipocitos murino como 3T3-L1 y 3T3-F442A, así como, sobre linajes de preadipocitos humanos. Esto asociado a que pueden factores transcripcionales o mecanismos diferentes aun no conocidos, para los fibroblastos humanos y murinos, que ocasionan que los mecanismos se vean afectados de diferentes formas [5,12].

Conclusiones

Eupatilina (EUP) y 5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (DIM) fueron las flavonas aisladas y purificadas de las hojas y flores de *Salvia amarissima*. EUP mostró un efecto anti-adipogénico sobre células 3T3-F442A al inhibir la expresión de PPAR γ y CEBP α . Mientras que DIM inhibe la expresión de PPAR γ y CEBP α en preadipocitos de tejido adiposo subcutáneo humano. Por lo que ambos compuestos pueden ser candidatos para estudios posteriores relacionados con las diferencias entre los mecanismos de diferenciación adiposa de preadipocitos murinos y humanos.

Referencias bibliográficas

1. Smith, M. M. & Minson, C. T. Obesity and adipokines effects on sympathetic overactivity, *J Physiol* **2012**, *8*, 1787–1801. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.221036>
2. Vernarelli, J. A., & Lambert, J. D. Flavonoid intake is inversely associated with obesity and C-reactive protein, a marker for inflammation, in US adults. *Nutr Diabetes* **2017**, *7*(5), 22–24. <https://doi.org/10.1038/nutd.2017.22>
3. Ogden, C.L.; Carroll, M.D.; Curtin, L.R.; McDowell, M.A.; Tabak, C.J.; Flegal, K.M. Prevalence of overweight and obesity in the united states, 1999–2004. *JAMA* **2006**, *295*, 1549–1555. <https://doi:10.1001/jama.295.13.1549>
4. OMS Organización Mundial de la Salud, La obesidad <https://www.who.int/topics/obesity/es/> (acceso 20 mayo 2019).
5. Spalding K. L., Arner E, Westermark P. O., Bernard S, Buchholz B. A., Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **2008**. *453*:783–787. <https://doi:10.1038/nature06902>
6. Moreno-Navarrete, J. M., Fernández-Real, J. M. Adipocyte Differentiation. In *Adipose Tissue Biology*. Editor Symonds, M.E. Publicado por Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011; Volumen 1, pp. 17-38.
7. Liou, C.-J., Wu, S.-J., Chen, L.-C., Yeh, K.-W., Chen, C.-Y., & Huang, W.-C. Acacetin from traditionally used *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. suppressed adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and attenuated lipid accumulation in obese

- mice. *Front. Pharmacol.* **2017** 8(8), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00589>
8. Ji, S., Doumit, M. E., Hill, R. A. Regulation of adipogenesis and key adipogenic gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 cells. *PLoS ONE*, **2015**. 10(6), 1-29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126142>
 9. Rosen, E., Walkey, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **2000**, 14, 1293–1307.
<https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1293>
 10. Mota de Sá, P., Richard, A. J., Hang, H., Stephens, J. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Compr Physiol*, **2017** 7(2), 635–674.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160022>
 11. Rosen, E. D., Spiegelman, B. M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**. 16:145–71 [https://doi.org/10.1081-0706/00/1115-0145\\$14.00](https://doi.org/10.1081-0706/00/1115-0145$14.00)
 12. Stephens, J. M. (2012). The fat controller: adipocyte development. *PLoS Biology*, 10(11), 11–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001436>
 13. Camacho, A., Segoviano-ramírez, J. C., Sánchez-garcía, A., Jesus, J. De, Rosa, H., García-juarez, J., Gojon-romanillos, G. Tyrphostin AG17 inhibits adipocyte differentiation *in vivo* and *in vitro*, *Lipids Health Dis.* **2018** 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12944-018-0784-7>
 14. Bautista, E., Fragoso-serrano, M., Ortiz-pastrana, N., Toscano, R. A., Ortega, A. Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A – C , diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia* **2016**, 114, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.08.007>

15. Flores-bocanegra, L., Gonza, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. α - Glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *Jnatprod* **2017**, 80, 1584–1593. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00155>
16. Andersen, O. M., & Markham, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Publicado por Taylor & Francis group International Edition **2006**; Volumen 44, pp: 443-489 <https://doi.org/0-8493-2021-6>
17. Hossain, M. K., Dayem, A. A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Saha, S. K., Cho, S. Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 569. <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
18. Assini, J. M., Mulvihill, E. E., Huff, M. W. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* **2013**. 24(1), 34-40. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32835c07fd>
19. PubChem, National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (acceso 20 de mayo de 2019).
20. Kuri-Harcuch, W. Differentiation of 3T3-F442A Cells into Adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation*, **1982** 23(1–3), 164–169. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1982.tb01279>
21. Lowe, C. E., O’Rahilly, S., Rochford, J. J. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*, **2011**. 124(16), 2681–2686. <https://doi.org/10.1242/jcs.079699>
22. Rosen, E. D., MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol*, **2006**. 7(12), 885–896. <https://doi.org/10.1038/nrm2066>
23. Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., & Graff, J. M. The developmental origins of adipose tissue. *Development*, **2013** 140(19), 3939–3949. <https://doi.org/10.1242/dev.080549>

24. Rosen, E., Walkey, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 2000. 14, 1293–1307. <https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1293>
25. Hadrich, F., Sayadi, S. (2018). Apigenin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells by downregulating PPAR γ and CEBP- α . *Lipids Health Dis*, 17(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0738-0>
26. Schwarz, E. J., Reginato, M. J., Shao, D., Krakow, S. L., Lazar, M. A. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP β -mediated transcription *Mol Cell Biol*, 2015. 17(3), 1552–1561. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1552>
27. Lin, D. P. L., Dass, C. R. Transdifferentiation of adipocytes to osteoblasts: potential for orthopaedic treatment. *J Pharm Pharmacol*, 2018 70(3), 307–319. <https://doi.org/10.1111/jphp.12862>
28. Kim, J. S., Lee, S. G., Min, K., Kwon, T. K., Kim, H. J., Nam, J. O. Eupatilin inhibits adipogenesis through suppression of PPAR γ activity in 3T3-L1 cells. *Biomed Pharmacother*, 2018. 103, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.073>
29. Heinze, E., Debatin, K., Wabitsch, M., Brenner, R. E., Melzner, I., Braun, M., Mo, P. (2001). Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes*, 2001. 25, 8–15. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801520>
30. Gesta, S., Kahn C. R. White adipose tissue. In *Adipose Tissue Biology*. Editor Symonds, M.E. Publicado por Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011; Volumen 1, pp. 71-122.

31. Salazar-Olivo, L. A., Mejia-Elizondo, R., Alonso-Castro, A. J., Ponce-Noyola, P., Maldonado-Lagunas, V., Melendez-Zajgla, J., Saavedra-Alanis, V. M. SerpinA3g participates in the antiadipogenesis and insulin-resistance induced by tumor necrosis factor- α in 3T3-F442A cells. *Cytokine*, **2014**. 69(2), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.025>
32. Grès, S., Gomez-Zorita, S., Gomez-Ruiz, A., & Carpéné, C. 5-hydroxytryptamine actions in adipocytes: Involvement of monoamine oxidase-dependent oxidation and subsequent PPAR γ activation. *J Neural Transm*, **2013**. 120(6), 919–926. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0959-8>
33. Wu, F., Wang, H., Li, J., Liang, J., & Ma, S. Homoplantaginin modulates insulin sensitivity in endothelial cells by inhibiting inflammation. *Biol Pharm Bull*. **2012**. 35(7), 1171–1177.
34. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol*. **2016**. 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
35. Vegiopoulos, A., Rohm, M., & Herzig, S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J*. **2017**. 36(14). <https://doi.org/10.15252/emj.201696206>
36. Russo, B., Picconi, F., Malandrucchio, I., & Frontoni, S. Flavonoids and insulin-resistance: from molecular evidences to clinical trials. *Int. J. Mol. Sci*. **2019**. 20, 2061. <https://doi:10.3390/ijms20092061>
37. Chen, L., He, T., Han, Y., Sheng, J. Z., Jin, S., Jin, M. W. Pentamethylquercetin improves adiponectin expression in differentiated 3T3-L1 cells via a mechanism that implicates PPAR γ together with TNF- α and IL-6. *Molecules* **2011**, 16(7), 5754–5768. <https://doi.org/10.3390/molecules16075754>

Material suplementario

**Tablas de los solventes utilizados como fases móviles en las columnas de
las diferentes fracciones**

**Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C Espectros de correlación (COSY) de los
compuestos DIM y EUP**

**Tablas de los solventes utilizados como fases móviles en las columnas de
las diferentes fracciones**

Fracción de AcOEt

Sistema	Fracciones
Hexano/AcOEt (8:2)	1 a 7
Hexano/AcOEt (7:3)	8 a 19
Hexano/AcOEt (6:4)	20 a 30
Hexano/AcOEt (5:5)	31 a 40
Hexano/AcOEt (4:6)	41 a 49
AcOEt (100%)	50 a 55
AcOEt/Acetona (4:1)	56 a 58
Acetona	Lavado (1 L)
MeOH	Lavado (1 L)

Fracción F8

Sistema	Fracciones
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (48:50:02)	1 a 12
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (45:50:05)	13 a 38
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (40:50:10)	39 a 44
MeOH	Lavado (500mL)
Agua	Lavado (500mL)

Fracción F5

Sistema	Fracciones
Hexano/AcOEt (3:1)	1 a 8
Hexano/AcOEt (7:3)	9 a 17
Hexano/AcOEt (6:4)	18 a 25
Hexano/AcOEt (5:5)	26 a 34
Hexano/AcOEt (3:7)	35 a 40
Acetona	Lavado (1 L)
MeOH	Lavado (1 L)

Fracción F5.5

Sistema	Fracciones
Cloroformo	1 a 5
Cloroformo/ MeOH (99.5:0.5)	6 a 12
Cloroformo/ MeOH (99:1)	13 a 19
Cloroformo/ MeOH (98:2)	20 a 26
Cloroformo/ MeOH (96:4)	27 a 36
Cloroformo/ MeOH (9:1)	37 a 46
Acetona	Lavado (500mL)
MeOH	Lavado (500mL)

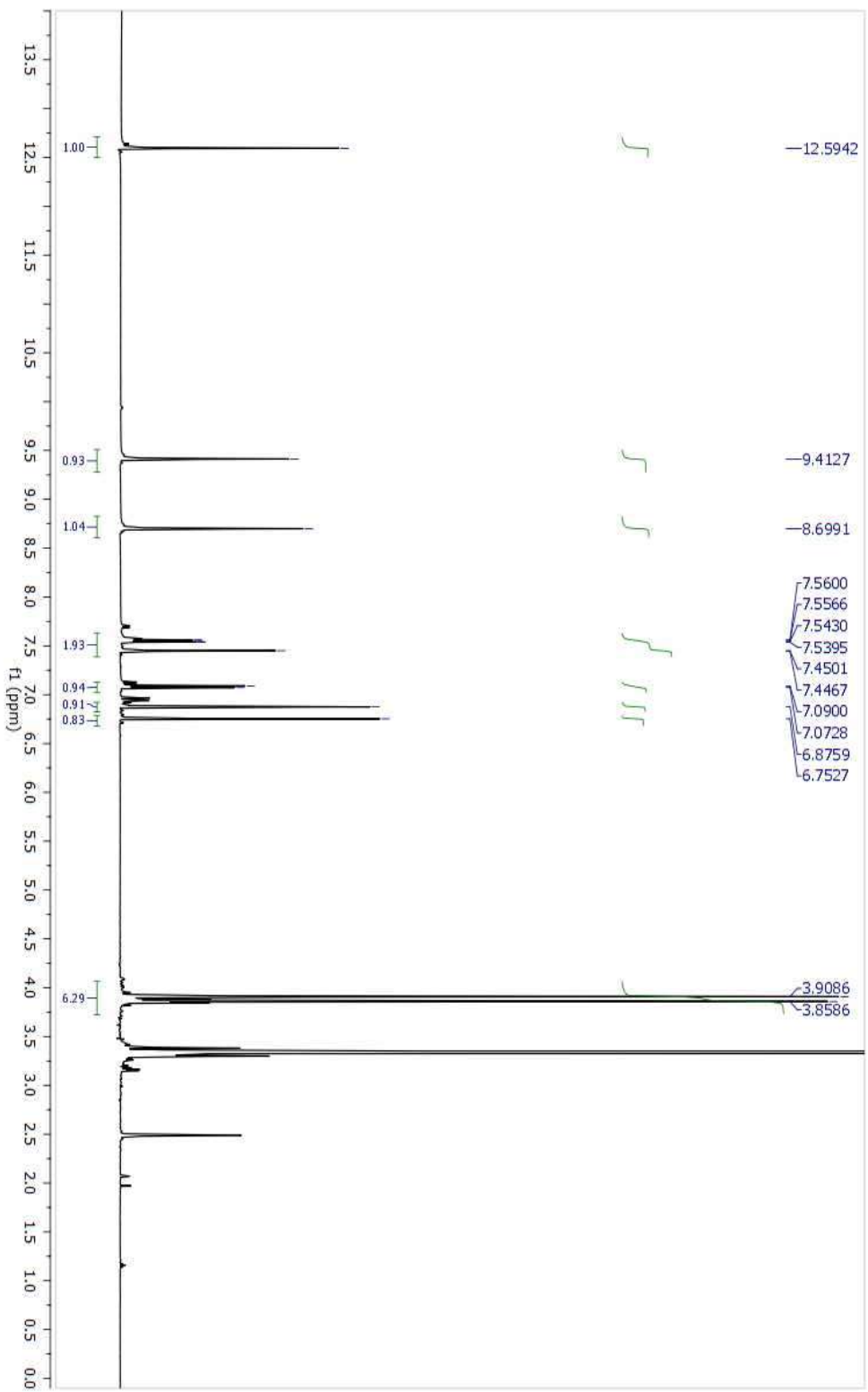
Fracción F4

Sistema	Fracciones
Hexano/AcOEt (7:3)	1 a 15
Hexano/AcOEt (6:4)	16 a 27
Hexano/AcOEt (5:5)	28 a 34
Acetona	Lavado (1 L)
MeOH	Lavado (1 L)

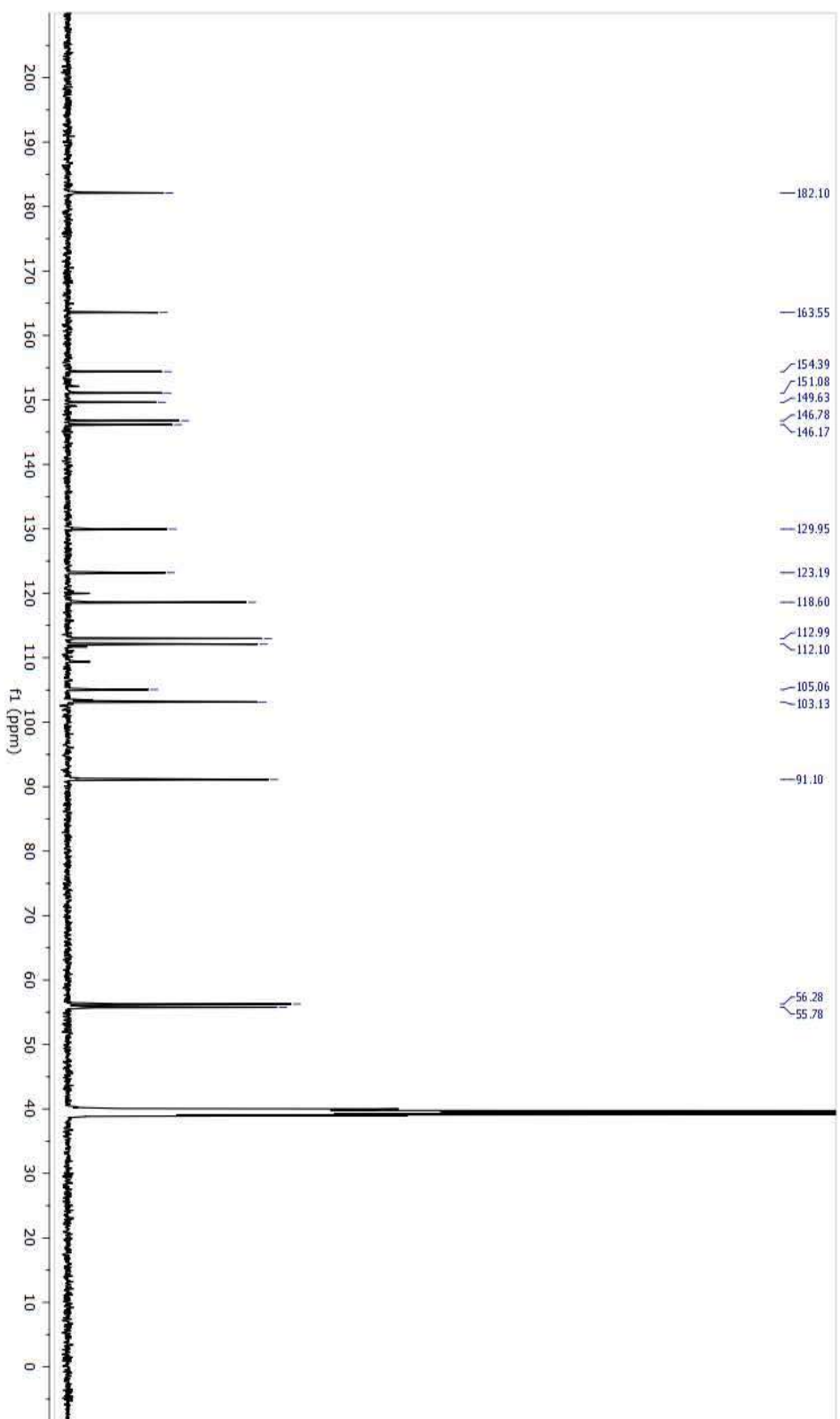
Fracción F8

Sistema	Fracciones
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (48:50:02)	1 a 12
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (45:50:05)	13 a 38
Hexano/CH ₂ Cl ₂ /MeOH (40:50:10)	39 a 44
MeOH	Lavado (500mL)
Agua	Lavado (500mL)

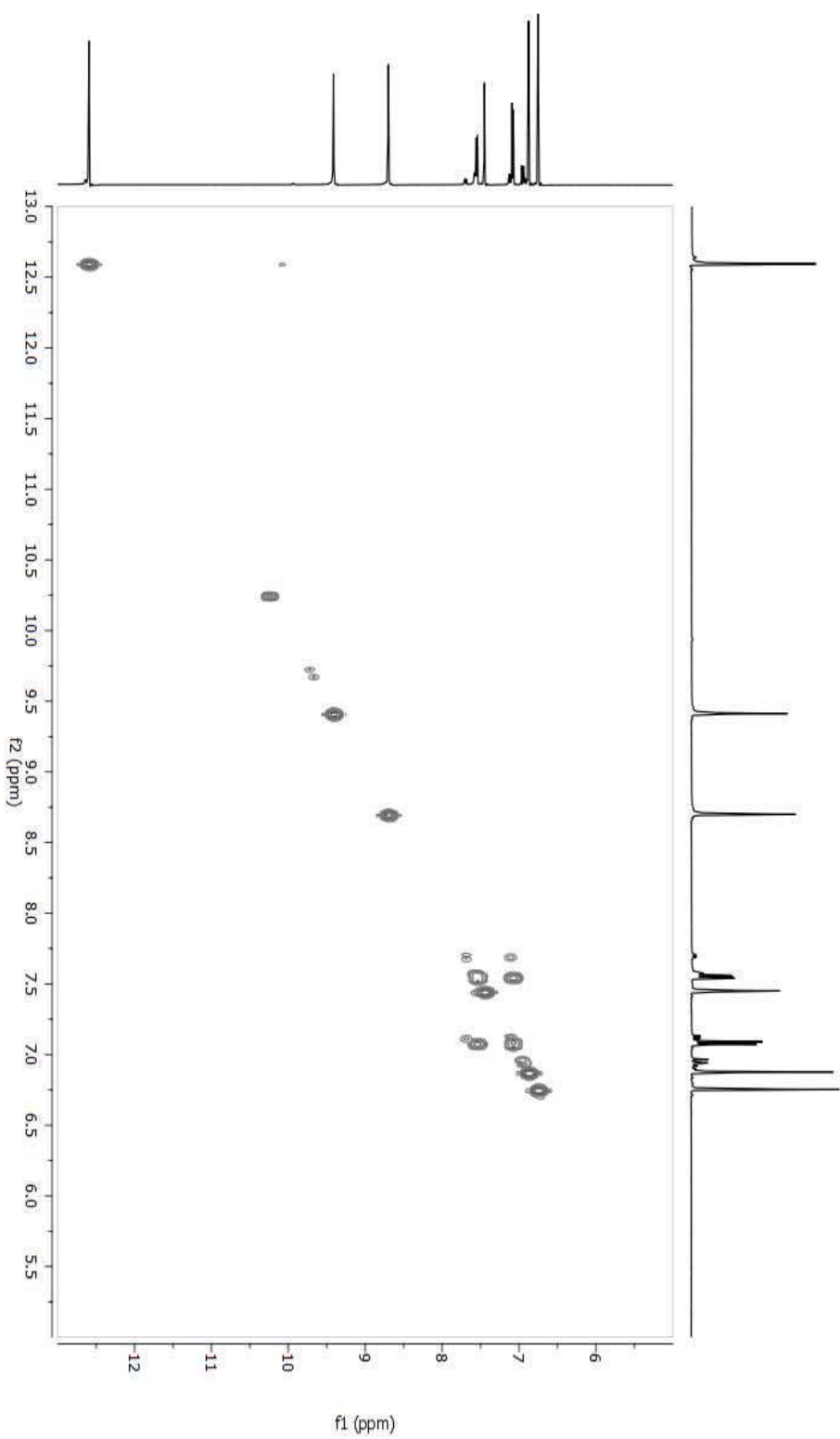
Espectros de ¹H obtenidos por RMN del compuesto DIM



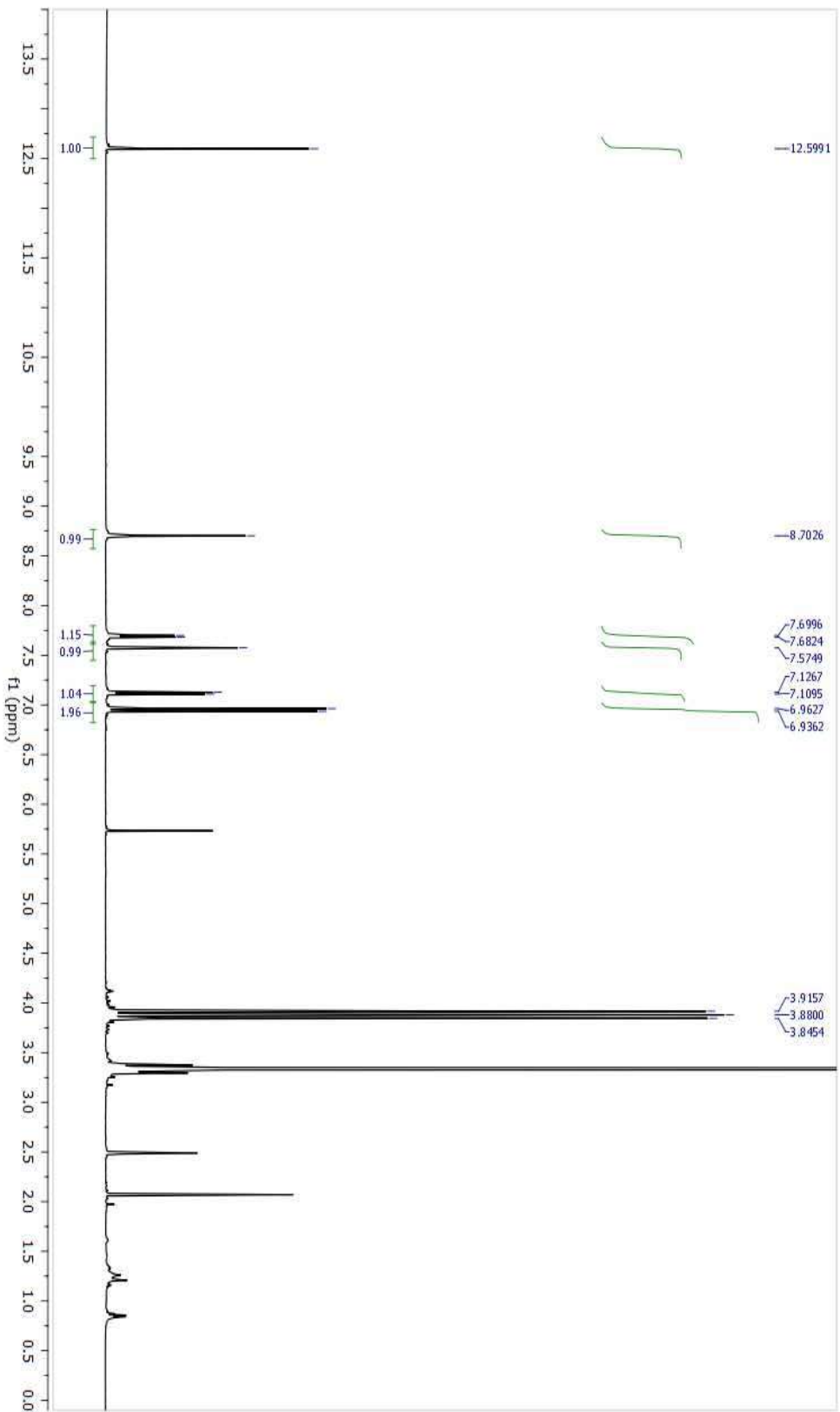
Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto DIM



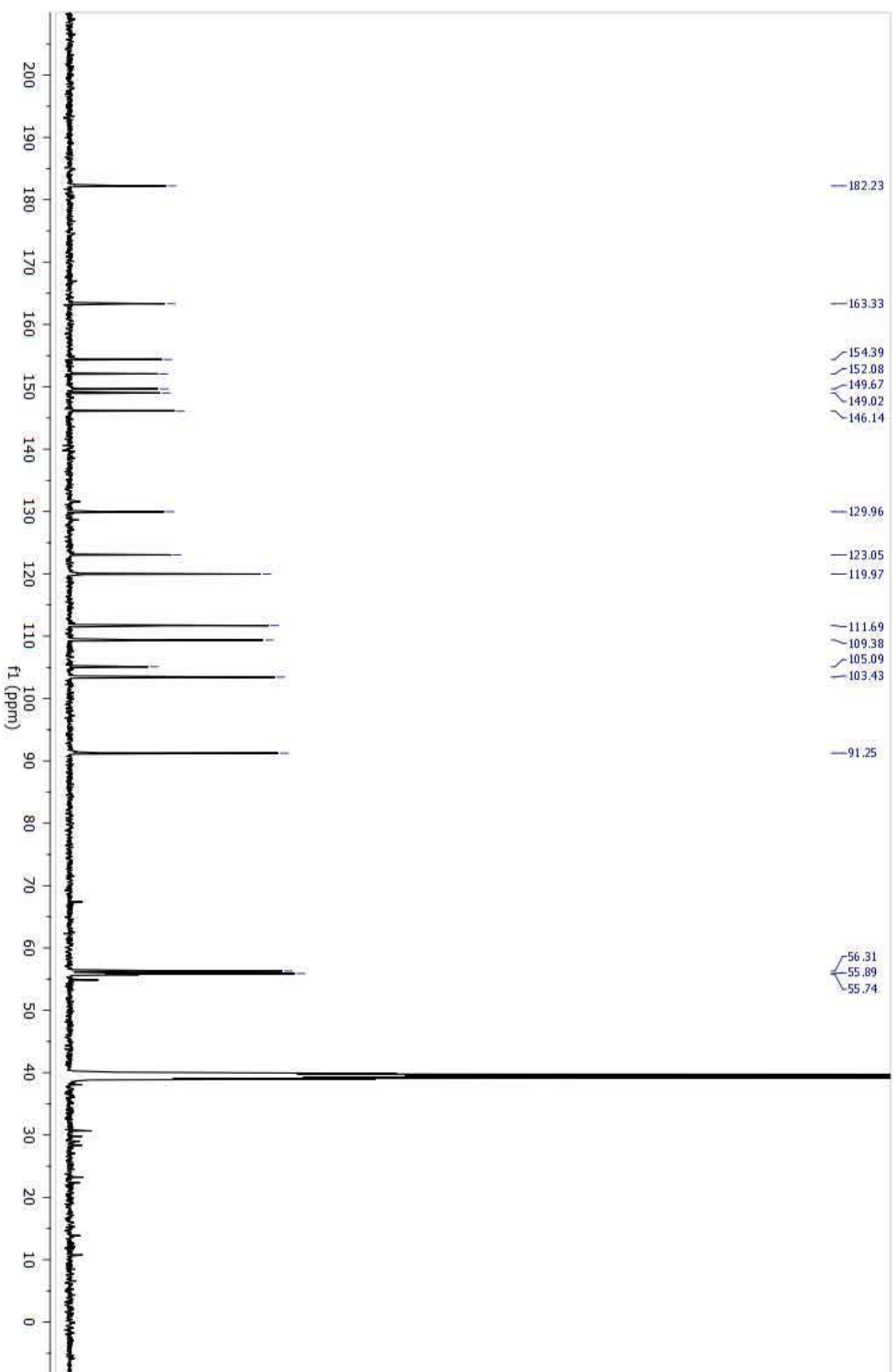
Espectros de correlación (COSY) del compuesto DIM



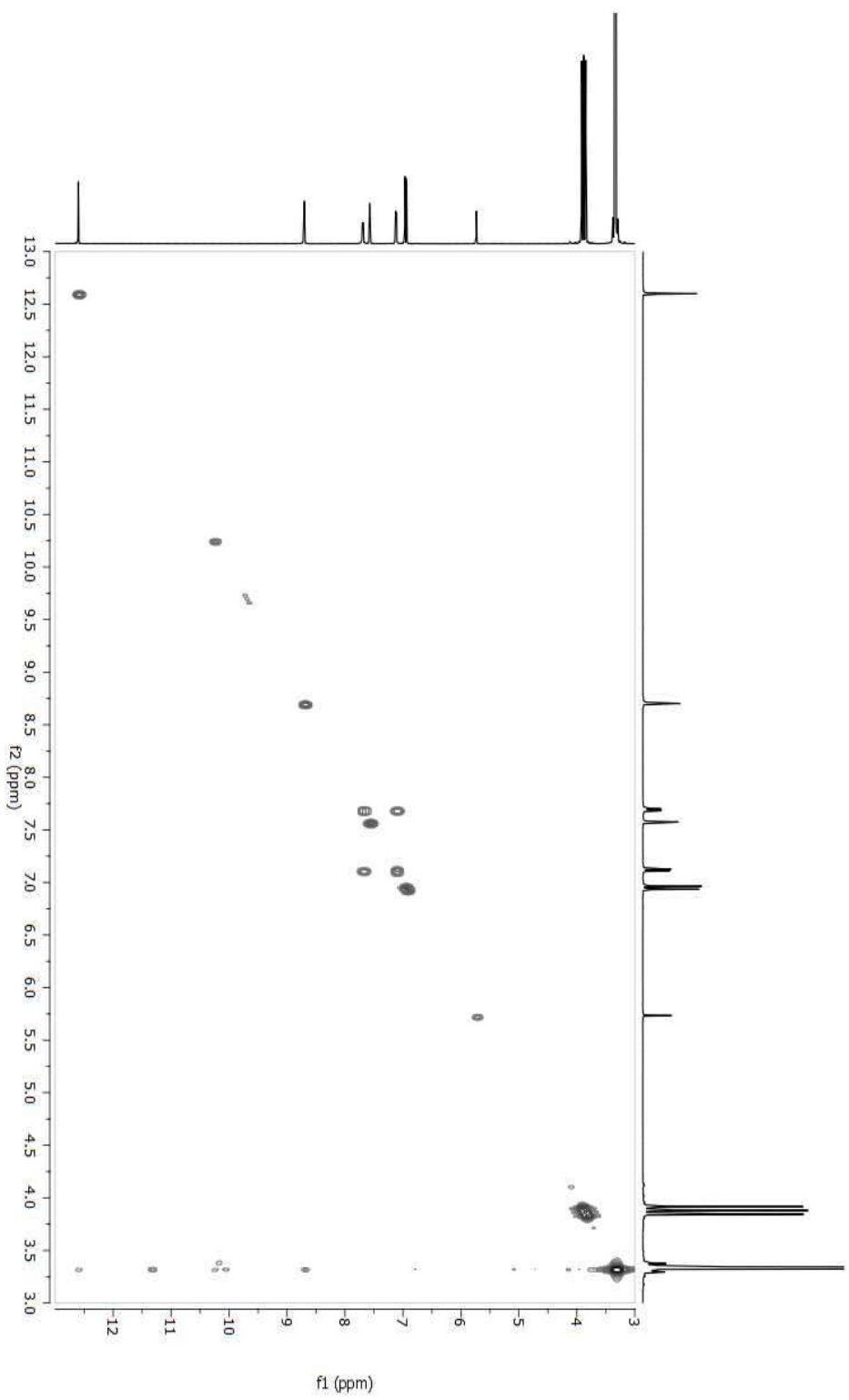
Espectros de ^1H obtenidos por RMN del compuesto EUP



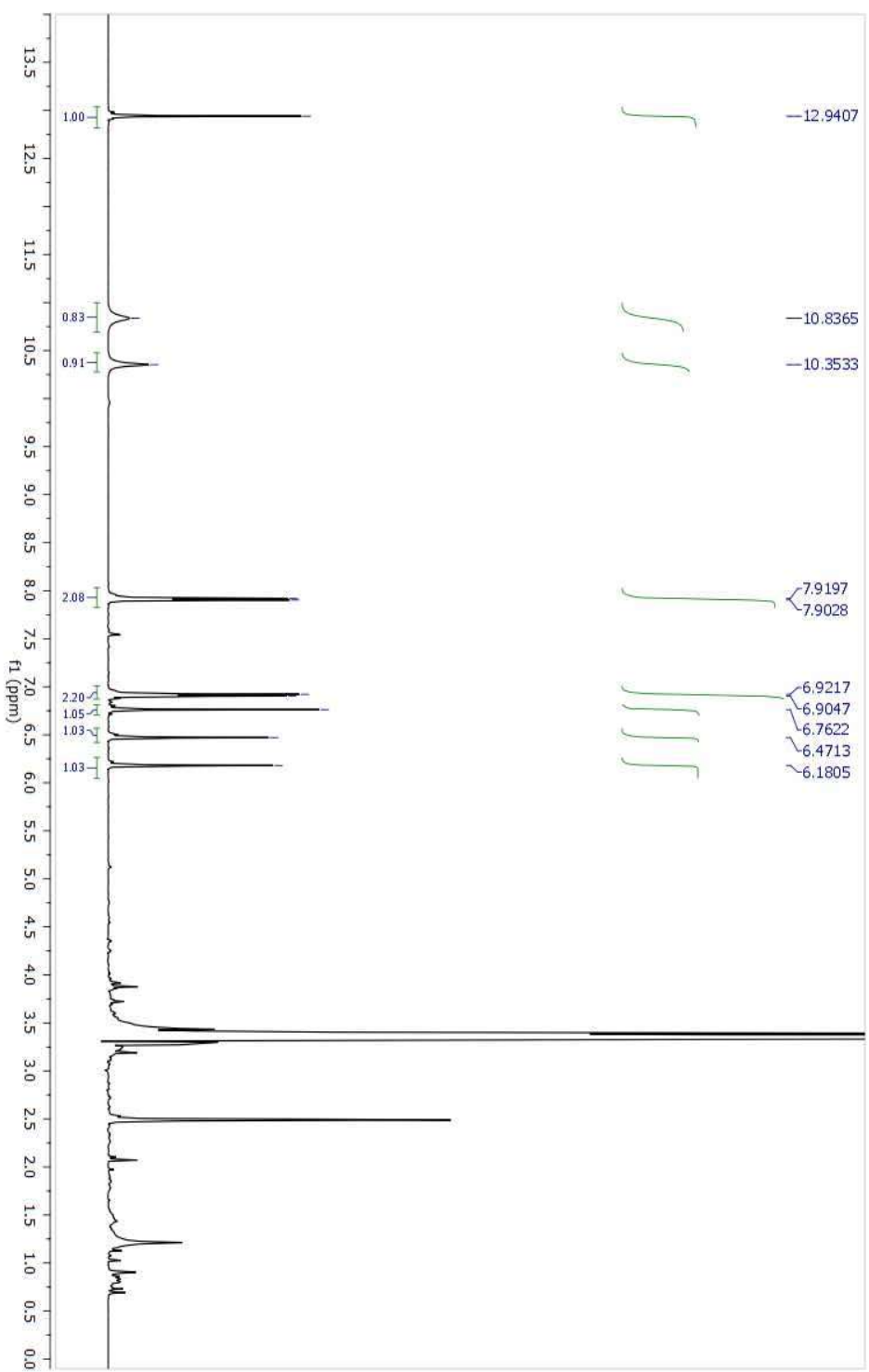
Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto EUP



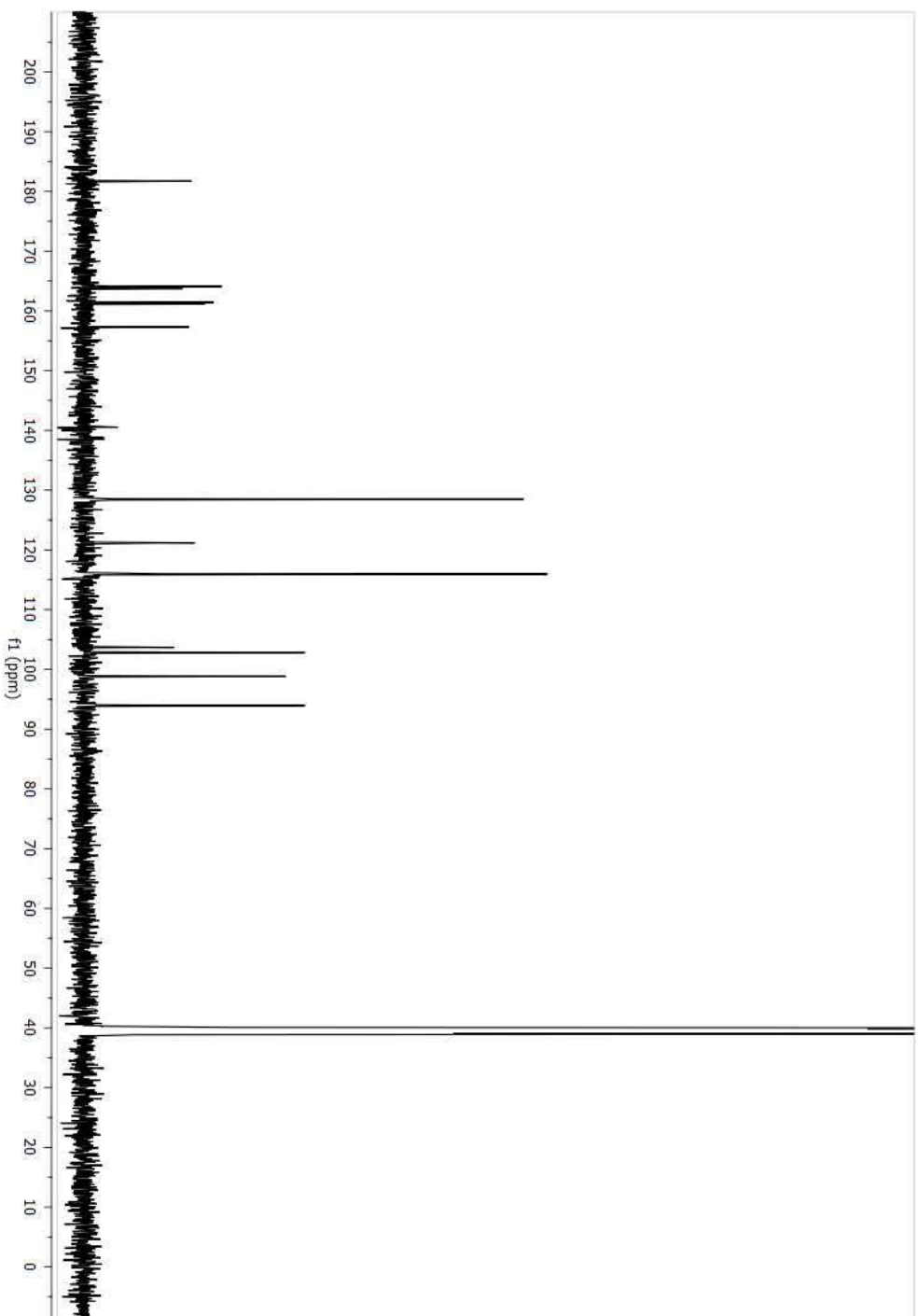
Espectros de correlación (COSY) del compuesto EUP



Espectros de ¹H obtenidos por RMN del compuesto API



Espectros de ^{13}C obtenidos por RMN del compuesto API



Espectros de correlación (COSY) del compuesto API

