



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA**  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Evaluación farmacológica de los compuestos activos de *Smilax aristolochiifolia Mill.*, sobre los componentes degenerativos del síndrome metabólico**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

**M. en C. CAROL ARELY BOTELLO AMARO**

Directores:

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS  
DR. J. ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

Asesora:

DRA. LUCÍA AGUILAR SANTAMARÍA

MÉXICO, D.F.

JULIO 2014

## **C O M I T É T U T O R A L**

### **CODIRECTORES DE TESIS**

**DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS**

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

**DR. J. ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER**

Investigador Titular, CIBIS, IMSS  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

### **ASESORA**

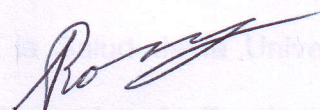
**DRA. LUCIA LOURDES AGUILAR SANTAMARÍA**

Investigador Titular, CIBIS, IMSS  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

Los miembros del jurado designado por la comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Evaluación farmacológica de los compuestos activos de *Smilax aristolochiifolia* Mill sobre los componentes degenerativos del síndrome metabólico", que presentó M. en C. Carol Arely Botello Amaro el veinticuatro de julio del dos mil catorce.

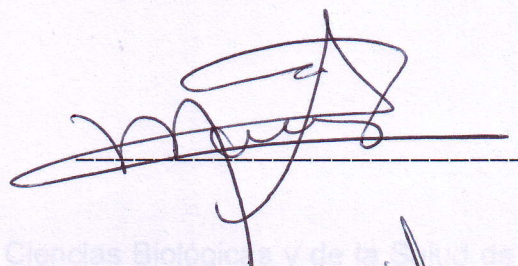
Presidente

Dr. Rubén Román Ramos  
Universidad Autónoma Metropolitana



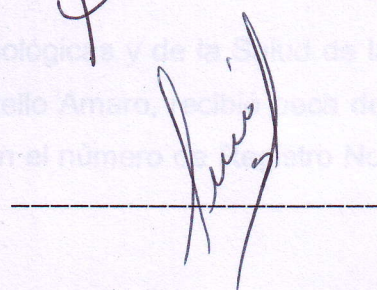
Secretario

Dr. Manasés González Cortázar  
Instituto Mexicano del Seguro Social



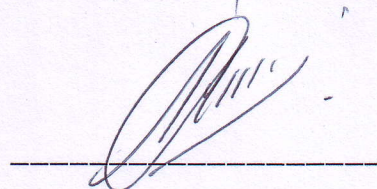
Vocal

Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría  
Instituto Mexicano del Seguro Social



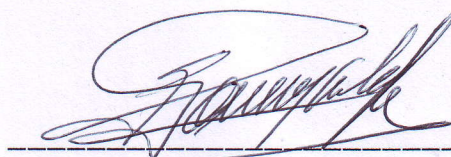
Vocal

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar  
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal

Dr. Humberto González Márquez  
Universidad Autónoma Metropolitana



El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Carol Arely Botello Amaro, recibió beca del CONACYT de Julio de 2011 a Diciembre de 2013, con el número de Registro No. **240846.**



La presente investigación se realizó en:



Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Criterios de Diagnóstico para el Síndrome Metabólico</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Epidemiología</b>	<b>16</b>
<b>4.3. Fisiopatología</b>	<b>19</b>
<b>4.4. Adiposidad, Obesidad e Inflamación</b>	<b>21</b>
<b>4.4.1. Adipocinas e inflamación</b>	<b>24</b>
<b>4.5. Inflamación y resistencia a la insulina</b>	<b>25</b>
<b>4.6. Disfunción endotelial</b>	<b>27</b>
<b>4.7. Obesidad, apoptosis de célula <math>\beta</math> e insulinitis</b>	<b>28</b>
<b>4.8. Fisiopatología de la hiperglucemia en DM2</b>	<b>30</b>
<b>4.8.1. Glucotoxicidad</b>	<b>32</b>
<b>4.8.2. Lipotoxicidad</b>	<b>32</b>
<b>4.8.3. Glucolipotoxicidad</b>	<b>33</b>
<b>4.9. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)</b>	<b>35</b>
<b>4.9.1. Enzima convertidora de angiotensina (ECA)</b>	<b>35</b>
<b>4.9.2. Receptor de la angiotensina tipo I</b>	<b>36</b>
<b>4.10. Tratamiento</b>	<b>41</b>
<b>4.10.1. Hipoglucemiantes orales</b>	<b>42</b>

4.10.1.1	Secretagogos de insulina	43
4.10.1.2	Biguanidas	43
4.10.1.3	Inhibidores de las alfa glucosidasas intestinales: acarbosa y miglitol	44
4.10.1.4	Tiazolidinedionas	45
4.11.	Modelos de SM	45
4.11.1.	Disfunción endotelial por administración de AGII	47
4.12.	Antecedentes Botánicos	48
4.12.1.	Taxonomía	49
4.12.2.	Botánica y Ecología	49
4.13.	Antecedentes etnobotánicos	50
4.14.	Antecedentes farmacológicos	54
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
6.	HIPÓTESIS	57
7.	OBJETIVO GENERAL	58
7.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
8.	MATERIAL Y MÉTODO	59
8.1.	Material vegetal	59
8.2.	Obtención de los extractos (metanólico y acetónico)	59
8.3.	Fraccionamiento químico del extracto acetónico	60
8.4.	Condiciones generales	62
8.5.	Cuantificación por HPLC	62
8.6.	Curva de calibración de la fracción Zarzacaba F2A	63
8.7.	Animales	64

8.8.	Perfil nutricional, metabólico y endocrino de los animales	66
8.9.	Determinación del peso	67
8.10.	Medición de la presión arterial	67
8.11.	Curva de tolerancia a la insulina	68
8.12.	Determinación de glucosa en ayuno	69
8.13.	Índice de adiposidad	69
8.14.	Eutanasia	70
8.15.	Determinación de los triglicéridos en plasma	71
8.16.	Análisis estadístico	74
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
9.1.	Fitoquímica	75
9.2.	Caracterización química del compuesto aislado	78
9.3.	Análisis químico	83
9.4.	Resultados experimentales	85
10.	CONCLUSIONES	98
11.	PERSPECTIVAS	99
12.	REFERENCIAS	100



<b>Índice de tablas</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales causas de mortalidad en México en el 2012	<b>12</b>
<b>Tabla 2.</b> Criterios de definición del síndrome metabólico	<b>15</b>
<b>Tabla 3.</b> Especies Tutores de la Zarzaparrilla	<b>53</b>
<b>Tabla 4.</b> Estudios fitoquímicos y farmacológicos de algunas especies del género <i>Smilax</i>	<b>54</b>
<b>Tabla 5.</b> Gradientes de HPLC	<b>64</b>
<b>Tabla 6.</b> Resumen cromatográfico del extracto acetónico de la raíz de <i>Smilax aristolochiifolia</i>	<b>75</b>
<b>Tabla 7.</b> Resumen del fraccionamiento de Zarzacaba 18-22 col (2)	<b>77</b>
<b>Tabla 8.</b> Resumen del fraccionamiento Zarzacaba F5 y 6 col (3)	<b>77</b>
<b>Tabla 9.</b> Datos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ RMN del compuesto n-trans-feruloil-tiramina a 400 MHz para protón y 100 MHz para carbono (en metanol)	<b>84</b>

<b>Índice de figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Tendencias en las prevalencias de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres de 20 años o más participantes en la ENSA 2000, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012.* México.	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Smilax aristolochiifolia</i> Miller. A. Hoja con zarcillos; B. Flor masculina; C. flor femenina; D. rama con frutos jóvenes. Ilustrado por Neftalí Núñez. Rzedowski, 1994.	<b>50</b>
<b>Figura 3.</b> <i>Smilax aristolochiifolia</i> Miller presente en el herbario (No. col. 2473) del Instituto de Ecología A.C. (INECOL).	<b>51</b>
<b>Figura 4.</b> <i>Smilax aristolochiifolia</i> Miller, Hinton - 25938 – México. MOBOT 2010.	<b>51</b>
<b>Figura 5.</b> <i>Smilax aristolochiifolia</i> Miller, Teocelo, Veracruz.	<b>52</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema del fraccionamiento químico de <i>Smilax aristolochiifolia</i> .	<b>60</b>
<b>Figura 7.</b> Equipo de HPLC Waters 99	<b>63</b>
<b>Figura 8.</b> Diferentes grupos de tratamiento.	<b>65</b>
<b>Figura 9.</b> Forma de administración de los distintos tratamientos.	<b>66</b>
<b>Figura 10.</b> Determinación del consumo de la dieta.	<b>66</b>
<b>Figura 11.</b> Peso de los animales.	<b>67</b>
<b>Figura 12.</b> Determinación de la TA.	<b>68</b>

<b>Figura 13.</b> Determinación de glucosa.	69
<b>Figura 14.</b> Evaluación de la densidad corporal.	70
<b>Figura 15.</b> Posición supina.	71
<b>Figura 16.</b> Determinación de triglicéridos.	72
<b>Figura 17.</b> Disposición de muestras, cuantificación de citocinas por la técnica de ELISA.	73
<b>Figura 18.</b> Determinación de citocinas.	74
<b>Figura 19.</b> Presipitado Precipitado amarillo de la Zarzacaba 18-22.	76
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de HPLC del N- <i>trans</i> -feruloil-tiramina.	77
<b>Figura 21.</b> Sistema aromático ABX.	78
<b>Figura 22.</b> Sistema aromático A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	79
<b>Figura 23.</b> Sistema Alquílico trans AB doble enlace.	79
<b>Figura 24.</b> Sistema Alquílico trans AB.	80
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).	80
<b>Figura 26.</b> HMBC correlación H-7.	81
<b>Figura 27.</b> HMBC correlación H-7'.	81
<b>Figura 28</b> HMBC correlación H-8'.	82

<b>Figura 29</b>	<b>82</b>
Estructura química de N- <i>trans</i> -feruloil-tiramina.	
<b>Figura 30</b>	<b>84</b>
Perfil cromatográfico por HPLC de diferentes muestras de <i>Smilax aristolochiifolia</i> (Ace-sa, F1, F2 y F3, y N- <i>trans</i> -feruloil-tiramina que tenía una TR = 10.186 min.	
<b>Figura 31</b>	<b>85</b>
Efecto de diferentes tratamientos sobre la tasa de crecimiento de los ratones expuestos a C57/BL-6.	
<b>Figura 32</b>	<b>86</b>
Efecto de diferentes tratamientos sobre la densidad corporal de los ratones expuestos a C57/BL-6.	
<b>Figura 33</b>	<b>88</b>
Triglicéridos en suero de los ratones.	
<b>Figura 34</b>	<b>89</b>
Efecto de los diferentes tratamientos sobre la resistencia a la insulina.	
<b>Figura 35</b>	<b>90</b>
Efecto de los diferentes tratamientos sobre la presión arterial.	
<b>Figura 36</b>	<b>91</b>
Efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración de citosinas.	



## LISTA DE ABREVIATURAS

Ace-SA	Extracto acetónico de <i>Smilax aristolochiifolia</i>
ADP	Adenosin difosfato
AGI	Angiotensina I
AGEs	Productos de glucosilación avanzada
AGII	Angiotensina II
AGL	Ácidos grasos libres
AP1	Activador del plasminógeno 1
ASP	Proteína estimulante de acinación
AT I	Receptor de angiotensina tipo I
AT II	Receptor de la angiotensina II
ATP III	Panel de Tratamiento de Adultos
ATP	Adenosin Trifosfato
AUC	Área bajo la curva
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CAM	Moléculas de adhesión
CAT	Catalasa
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Células endoteliales
C-HDL	Lipoproteínas de alta densidad
CML	Células musculares lisas
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
COSY	Correlación espectroscópica
COX-2	Inhibidores de la ciclooxigenasa 2
DE	Disfunción endotelial
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EGIR	Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la insulina
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelina
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO	Especies reactivas de Oxígeno
ET1	Endotelina 1
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo 1
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2
GLUT-3	Transportador de glucosa tipo 3
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
GMP	Guanosin monofostato
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HAS	Hipertensión arterial sistémica
HDC	Dieta hipercalórica
HDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDLc	Colesterol unido a la lipoproteínas de alta densidad
HMBC	Correlación Heteronuclear múltiple
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

HSQC	Correlación Heteronuclear simple
HTA	Hipertensión arterial
i.p.	Intrapritoneal
IAP1	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
ICAM	Molécula de adhesión intercelualr 1
ICAM-I	Molécula de adhesión intercelular I
IDF	Federación internacional de diabetes
IFG	glucosa alterada en ayunas
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IGT	intolerancia a la glucosa
I $\kappa$ B $\beta$	cinasa 1 Kappa beta
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de Masa Corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INF- $\gamma$	Interferón gamma
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IP3K	fosfatidil-insitol 3 cinasa
IRS	Sustrato del receptor de Insulina
IRS-1	Sustrato del receptor de Insulina-1
IRS-2	Sustrato del receptor de Insulina-2
JNK	cinasa N-terminal de C-jun
JRS1	Sustrato 1 del receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	LDL oxidadas
MAP	Proteínas activadas por mitogéno
MAPK	Protein Kinasa Activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MIF	Factor inhibidor de macrófago
MnSOD	Enzima superoxidodismutasa dependiente de manganeso
NADH	Nicotinamin-Adenin Dinucleótido reducido
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NOS	Oxido nítrico sintasa
NOX	NADPH <sup>+</sup> oxidasa
NTF	N-trans-feruloil-tiramina
O <sub>2</sub>	Ion radical oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
OMS	Organización Mundial De la Salud
ON	Oxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito

OPD	Dicloruro <i>orto</i> -Fenilediamino
P13K	Fosfoinositol 3 cinasa
PAD	Presión arterial diastólica
PAF	Activador de plaquetas
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM I	Molécula de adhesión de plaquetas y endotelio
PGL <sub>2</sub>	Prostaglandinas
PKC	Proteína cinasa c
PPAR	Proliferador de peroxisomas activado de los receptores
PPAR $\alpha$	Proliferador de peroxisomas activado de los receptores $\alpha$
PPAR $\gamma$	Proliferador de peroxisomas activado de los receptores $\gamma$
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistencia a la Insulina
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema nervioso central
Socs	Citocina supresora de señalización
SODs	Superóxido dismutasa
SREBP	Proteínas de unión a elementos de regulación por esteroides
SSRE	Elementos de respuesta a flujo
TG	Triglicéridos
TH1	Células colaboradoras 1
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Tricrómica de Masson
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
t-PA	Plasminógeno tisular
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UCP-2	Disociación de proteínas -2
UPR	Proteínas desdobladas
v.o.	Vía oral
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VSMCs	Células del músculo liso vascular
vWF	Factor de Von Willebrand
Zarzacaba	Zarzaparrilla Carol Arely Botello Amaro

## **1. RESUMEN**

**ANTECEDENTES.-** El síndrome metabólico (SM) es una constelación de padecimientos entre los que se encuentra la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la hipertensión arterial (HTA), la hipercolesterolemia, entre otros. En México, el SM presenta una alta morbilidad y mortalidad, sobre todo cardiovascular. Actualmente no existe un fármaco específico que comprenda el tratamiento en conjunto de los padecimientos incluidos en el SM, y los ahora existentes inducen efectos colaterales adversos. La especie vegetal *Smilax aristolochiifolia* Mill. (Smilacaceae) conocida como Zarzapariilla es utilizada por la medicina tradicional mexicana para bajar de peso en localidades de Morelos y Veracruz, donde se prepara una bebida refrescante de la raíz. Por lo que, esta planta es considerada como una especie GRAS (*Generally recognized as safe*).

**OBJETIVO.-** Evaluar el efecto farmacológico del extracto acetónico y fracciones de la especie vegetal *Smilax aristolochiifolia* Mill, sobre las alteraciones vasculares derivadas del estado inflamatorio y oxidante que se presentan en el síndrome metabólico. **MATERIAL Y MÉTODOS.-** Se indujo SM en ratones C57/BL/6 por administración de una dieta hipercalórica (DHC) y la administración de AGII i.p., se utilizaron ratones machos cepa C57/BL/6 recién destetados, fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos de tratamiento de 10 animales c/u: Grupo 1. Testigo (DN): recibió dieta estándar para roedores, Grupo 2: Dieta Hipercalórica (DHC), Grupo 3: DHC+AGII (0.1µg/kg), Grupo 4: DHC+AGII+Pioglitazona+Telmisartán (10 mg/kg), Grupo 5: DHC+AGII+Ace-Sa (25 mg/kg), Grupo 6: DHC+AGII+F1 (25 mg/kg), Grupo 7: DHC+AGII+F2 (25 mg/kg), Grupo 8: DHC+AGII+F3 (25 mg/kg).



El tratamiento duró veinte semanas, los grupos 1 y 2 únicamente recibieron la dieta durante todo el experimento, a partir del grupo 3, recibieron diez semanas solo DHC y posteriormente la DHC más la AGII i.p., y por v.o. los diferentes tratamientos (fármaco, extracto Ac-Sa o Fracciones). El peso de los animales experimentales y el consumo de alimento se monitorearon una vez por semana obteniendo las siguientes variables: Densidad corporal, triglicéridos en plasma, citocinas en riñón y tejido adiposo, curva de tolerancia a la insulina y presión arterial. Los datos fueron analizados aplicando ANOVA con una posprueba de Tukey, fijando una  $p < 0.05$  como criterio de significancia estadística.

**RESULTADOS.-** Los ratones (testigo) mostraron un incremento de peso dependiente en el aumento de tejido magro, alcanzando un valor de la densidad del cuerpo de  $1.05 \pm 0.02$  g/ml. En los grupos con HCD o HCD + AGII se observó una disminución significativa de la densidad del cuerpo respecto al grupo con dieta normal ( $*p < 0.05$ ). El grupo de ratones tratados con F2 disminuyendo los niveles de triglicéridos siendo inferiores a DHC + AG II, y no tuvieron diferencias estadísticamente con el grupo de dieta normal, mientras que en el grupo con Pio + Tel, no disminuyó este parámetro respecto al grupo control II. Todos los tratamientos de *S. aristolochiifolia* disminuyeron el parámetro de resistencia a la insulina reduciendo el valor de los datos de AUC, que fueron estadísticamente diferentes para el grupo con el daño ( $p < 0.05$ ). Respecto a la presión arterial (PA) se observó que los grupos de ratones con DHC o DHC + AGII, mostraron un aumento sustancial y estadísticamente significativo en ambos casos, en comparación con el grupo de dieta normal ( $p < 0.05$ ), este incremento fue controlado con la administración de diferentes grupos animales con extracto (Ace-

Sa) y fracciones (F1, F2 y F3) de *S. aristolochiifolia*; por lo tanto, se pudo observar una disminución significativa de la PA. En los niveles de citocinas se observó una disminución de las condiciones pro-inflamatorias, como sucedió con el tratamiento de control positivo. La respuesta del tejido adiposo en tratamientos con DHC y DHC + AGII, tuvieron un efecto similar a la respuesta pro-inflamatoria. El tratamiento de control positivo no fue capaz de reducir la respuesta pro-inflamatoria en el tejido adiposo, en contraste con los ratones con tratamientos de *S. aristolochiifolia*, que sí la disminuyeron, aunque la fracción F3 lo hizo en menor medida. **CONCLUSIONES.-** El extracto acetónico de *Smilax aristolochiifolia* Mill y la fracción F2 derivada de la extracción clorofórmica de éste, disminuyeron significativa y estadísticamente la obesidad, la resistencia a la insulina, el nivel sérico de triglicéridos, la hipertensión arterial y el proceso inflamatorio de los ratones expuestos a dieta hipercalórica y angiotensina II; por consiguiente, el extracto y las fracciones con (N-*trans*-feruloil-tiramina) NTF son opciones viables para el tratamiento de la sintomatología asociada a SM.

## **2. ABSTRACT**

Metabolic syndrome (MS) is a group of conditions such as obesity, type 2 diabetes mellitus (DM2), arterial hypertension (AHT), and hypercholesterolaemia, among others. In Mexico, the MS presents a high rate of morbidity and mortality, mainly related to cardiovascular diseases. Nowadays there is not a specific drug for the treatment of all MS conditions together, and those available now lead to adverse side effects. Vegetal species *Smilax aristolochiifolia* Mill. (Smilacaceae), also known as sarsaparille ("zarzaparrilla" in Spanish), is used in the traditional Mexican medicine to lose weight, especially in some towns in Morelos and Veracruz, where a refreshing drink from this root is commonly prepared. For this reason, this plant is considered as a GRAS (*Generally recognized as safe*) species. **OBJECTIVE.-** To evaluate the pharmacological effects of acetonc extract and fractions from *Smilax aristolochiifolia* Mill. vegetal species on the vascular disorders derived from the inflammatory and oxidizing conditions present in the MS. **MATERIAL AND METHODOLOGY.-** MS was induced in male C57/BL/6 mice by administrating a high calorie diet (HCD) and AGII via the intraperitoneal route (IP). The recently weaned mice were randomly distributed in 8 treatment groups of 10 animals each: Group 1.- Basal (ND): standard rodent diet. Group 2.- High calorie diet (HCD). Group 3.- HCD + AGII (0.1mg/kg). Group 4.- HCD + AGII + Pioglitazone + Telmisartan (10 mg/kg). Group 5.- HCD + AGII + Ace-Sa (25 mg/kg). Group 6.- HCD + AGII + F1 (25 mg/kg). Group 7.- HCD + AGII + F2 (25 mg/kg). Group 8.- HCD + AGII + F3 (25 mg/kg). The treatment lasted twenty weeks. Only groups 1 and 2 received the diet during the whole experiment; the others received HCD for

ten weeks and then HCD plus AGII IP, and the different treatments (drug, Ace-Sa extract or fractions) orally. The experimental animal's weight and the food consumption were monitored once a week obtaining the following variables: Body density, plasma triglycerides, kidney cytokines and adipose tissue, insulin tolerance curve and blood pressure. The data were analyzed using ANOVA and Tukey post-test, fixing a  $p < 0.05$  as statistic significance criterion. **RESULTS.-** The mice showed a weight increase depending on the lean tissue increment, reaching a body density of  $1.05 \pm 0.02$  g/ml. In the groups with HCD or HCD + AGII there was a significant decrease of body density with respect to the group on a normal diet ( $*p < 0.05$ ). The group of mice treated with F2 presented a decrease of triglyceride levels, the latter being inferior than HCD +AGII, and there were no statistic differences in regards to the group on the normal diet, while the group with Pio + Tel did not present a decrease in this parameter with respect to control II group. All the treatments with *S. aristolochiifolia* diminished the insulin resistance parameter reducing the value of AUC data, which were statistically different for the group with damage ( $p < 0.05$ ). In relation to the arterial pressure (AP), the groups of mice with HCD or HCD + AGII showed an important and statistically significant increase in both cases, in comparison to the group on a normal diet ( $p < 0.05$ ). This increment was controlled by administrating Ace-Sa extract and F1, F2 and F3 fractions from *S. aristolochiifolia* to different groups of animals. Therefore, a significant PA decrease could be observed. There was also a decrease of pro-inflammatory conditions in the cytokine levels, as it happened with the positive control treatment. The response of the adipose tissue in treatments with HCD and HCD + AGII had an effect similar to the pro-inflammatory response. The positive

control treatment was not able to reduce the pro-inflammatory response in adipose tissue, in contrast with *S. aristolochiifolia* treated mice, which did present a reduction, although fraction F3 did it in a lower degree. **CONCLUSIONS.-** *Smilax aristolochiifolia* Mill. acetonc extract and fraction F2 obtained by chloroform extraction diminished obesity, insulin resistance, triglyceride serum levels, arterial hypertension and the inflammatory process to a significant and statistical extent in mice exposed to a HCD and angiotensin II. Consequently, the extracts and fractions containing (N-*trans*-feruloyl-tyramine) NTF are viable options for the treatment of the symptomatology associated to MS.

### **3. INTRODUCCIÓN**

El síndrome metabólico (SM) es una situación clínica poligénica y multifactorial que se relaciona íntimamente con otras alteraciones como son: disfunción endotelial, inflamación y estrés oxidante, asociado a la expresión de NF- $\kappa$ B, que estimula la liberación IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, provocando aterosclerosis por infiltración de monocitos, alteración en el metabolismo de la glucosa, y los lípidos, etc.; diversos estudios han relacionado al SM con DM2, obesidad visceral y enfermedad cardiovascular. Un factor que desencadenó el aumento en el SM fue el establecimiento de la industrialización en las sociedades occidentales, que provocó cambios en el estilo de vida como: disminución del ejercicio físico y el consumo de una dieta alta en calorías, rica en grasa y pobre en fibra dietética. Y por otro lado, desde el punto de vista evolutivo, el hombre ha desarrollado un genotipo ahorrador, que asegura los cambios metabólicos necesarios para acumular glucógeno muscular y triacilglicéridos en el tejido adiposo previniendo los períodos de escasez. Así que, los cambios en los patrones de consumo y la carga genética hacen que el período de abundancia pueda provocar un conjunto de trastornos que favorecen la aparición del SM. Esta alteración metabólica resulta en obesidad, asociada con dislipidemia e hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y consecuentemente con diabetes y el daño vascular que deriva en hipertensión; este escenario se ha asociado con un aumento en el riesgo de muerte cardiovascular prematura, debido al impacto que tienen en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares e insuficiencia renal. Las enfermedades cardiovasculares representan una de las causas más frecuentes de

morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En nuestro país, las enfermedades cardiovasculares en conjunto son la primera causa de mortalidad general. Por consiguiente al haber crecido de manera acelerada la incidencia de obesidad en las últimas décadas, se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, especialmente por el aumento del riesgo cardiovascular que tiene asociado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más de 2.8 millones de personas mueren cada año en el mundo a causa del sobrepeso y obesidad. Por lo que la OMS ha calificado el padecimiento como “la epidemia del siglo XXI” a raíz de que algunos estudios han registrado el aumento de la frecuencia de la obesidad en la población de todas las edades y de que tal incremento no es exclusivo de los países económicamente desarrollados, como inicialmente se pensó, sino que afecta a otras naciones con menor desarrollo, como lo es el caso de México y del resto de países de América Latina.

El tratamiento del SM no es específico, va desde la modificación en el estilo de vida con una dieta hipocalórica y una mayor actividad física, acompañado de un tratamiento farmacológico que tendrá que ser una polifarmacia que vaya desde aquellos fármacos que ayuden a la reducción de peso como (Orlistat que inhibe la lipasa pancreática y la absorción de grasa en el intestino), hipoglucemiantes orales (Metformina), sensibilizadores a la acción de la insulina (glitazonas), inhibidores de la alfa glucosidasa, secretagogos, antihipertensivos inhibidores de los receptores AT1 de la angiotensina II (telmisartán), inhibidores de la ECA, diuréticos, además de hipolipemiantes como estatinas, entre otros. Debido a que no existe una terapia farmacológica integral para el tratamiento SM, es pertinente explorar alternativas

entre las que se encuentran los metabolitos propios de especies vegetales. Diferentes tipos de *Smilax* poseen actividad anti-inflamatoria, por inhibir a la lipoxigenasa (Khan y col., 2009; Shu y col., 2006). Compuestos fenólicos como los flavonoides y fenil-propanoides, provenientes de estas especies, poseen efecto inmunomodulador y antioxidante (Yi y col., 2008; Zhang y col., 2008; Lee y col., 2001), saponinas esteroidales de *Smilax china* son anti-inflamatorias por inhibir la COX-2 y TNF $\alpha$  en macrófagos aislados de ratón (Shao y col., 2007). El extracto acuoso de *S. china* L. induce la diferenciación de adipocitos a fibroblastos dependiente de la activación de PPAR $\gamma$ , que también participan en la homeostasis de la glucosa y la regulación del proceso inflamatorio en los adipocitos. En México, *Smilax aristolochiifolia* tiene antecedentes de uso empírico como hipoglucemiante (Andrade-Cetto 2005) y para bajar de peso. En localidades de los Estados de Morelos y Veracruz se produce el extracto que se comercializa para la preparación de una bebida refrescante de la raíz, llamada “cerveza de raíz”. Por lo que esta planta es considerada como una especie GRAS (*Generally Recognized As a Safe*); sin embargo, no se cuenta al momento con estudios farmacológicos ni fitoquímicos para esta especie, por lo que el objetivo del presente trabajo es demostrar que *Smilax aristolochiifolia* posee compuestos químicos capaces de contrarrestar algunos de los padecimientos del SM. Tal evidencia coloca a *Smilax aristolochiifolia* como una especie con altas posibilidades de incidir en los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de SM. La especie vegetal (raíz) se colectó en el estado de Veracruz, de la cual se obtuvo el extracto, fracciones y compuesto, mismos que se evaluaron farmacológicamente en las



alteraciones vasculares derivadas del estado inflamatorio y oxidante que presentaron los animales en el modelo de SM.

La estrategia experimental fue la siguiente: Para provocar SM en los animales cepa C57/BL a experimentar se utilizó un modelo con dos factores: a) consumo dieta hipercalórica, (dieta con alto contenido en carbohidratos y grasas) elaborada en el laboratorio de farmacología en el CIBIS Xochitepec, Morelos, para aumentar el nivel de leptina, citocinas pro-inflamatorias y angiotensinógeno, resistencia a la insulina con hiperglucemia crónica y dislipidemia con reclutamiento de células inflamatorias como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en tejido adiposo blanco; asimismo el modelo b) administración crónica de angiotensina II (AGII), para sobre-estimular al Sistema-Renina Angiotensina-Aldosterona (RAAS), para elevar el nivel de AGII y estimular con ello la producción de especies reactivas de oxígeno a través de NADPH-oxidasa (NOX), que convierte al oxígeno ( $O_2$ ) en radical superóxido ( $O_2^-$ ). El  $O_2^-$  consume al óxido nítrico (ON, vasorrelajante) disponible, generando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que convierte no enzimáticamente al ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos (vasoconstrictores y pro-inflamatorios). El agotamiento de ON también incrementa la expresión NF- $\kappa$ B lo que aumenta el nivel de moléculas de adhesión ICAM y VCAM (que provocan el reclutamiento vascular de células pro-inflamatorias) y la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para continuar con el aumento de AG II, estableciendo un círculo vicioso. Una vez establecido el SM experimental se aplicaron tratamientos con el extracto, fracciones y compuesto obtenidos de la raíz de *Smilax aristolochiifolia*; todos los tratamientos se administraron por vía oral,

tanto los tratamientos experimentales como los controles positivos, que consistieron en antihipertensivos y sensibilizadores de la insulina. Los tratamientos duraron 20 semanas, el peso de los animales y el consumo de alimento se monitoreó, al final del experimento, se obtuvieron las siguientes variables: curva de tolerancia a la insulina, presión arterial, glucosa en ayuno, densidad corporal y triglicéridos.

Los resultados indican que la dieta hipercalórica y la AG II inducen daño metabólico evidenciado por una elevación del peso corporal, aumento en el índice de masa corporal, aumento significativo de la presión arterial, índice elevado de glucemia y resistencia a la insulina. Indicando que el modelo cumple con las consideraciones patológicas del SM. De manera importante los animales tratados con pioglitazona, telmisartán, así como con *N-trans-feruloil-tiramina*, disminuyeron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la obesidad, RI e HTA, en comparación con el grupo que desarrollo SM.

Este trabajo se inscribe en el desarrollo de nuevos medicamentos utilizando extractos estandarizados de plantas. El centro CIBIS tiene un rol de vanguardia en Latinoamérica, siendo las enfermedades crónico degenerativas un problema de salud pública en México, como se comentó, se considera de gran importancia el desarrollo de un fitomedicamento integral con base en el extracto estandarizado de *Smilax aristolochiifolia*. El paradigma que sustenta dicho desarrollo del fitomedicamento es el diseño de un recurso terapéutico que contiene una mezcla de compuestos activos, los cuales pueden contrarrestar un cuadro fisiopatológico complejo, de tal forma que el efecto farmacológico resulte de la sinergia que se establezca entre ellos, coadyuvando al fortalecimiento de la salud pública.

#### 4. ANTECEDENTES

El síndrome metabólico (SM) es una entidad clínica compleja, poligénica y multifactorial, que puede aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, con desórdenes metabólicos que incluyen obesidad visceral, dislipidemia aterógena, hipertensión arterial sistémica (HAS), tolerancia alterada a la glucosa en ayuno (IFG), intolerancia a la glucosa (IGT) o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) hasta un estado de Disfunción Endotelial (DE) que se asocia con un mayor riesgo de padecer aterosclerosis e incrementan la morbimortalidad de enfermedades cardio y cerebrovasculares (Suzuki, 2008), padecimientos que se encuentran entre las primeras causas de muerte en nuestro país (INEGI, 2012) como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla1.** Principales causas de mortalidad en México en el 2012.

Principales causas	Defunciones
Total	602354
Enfermedades del corazón <sup>a</sup>	109309
Enfermedades isquémicas del corazón	74057
Diabetes mellitus	85055
Tumores malignos	73240
Accidentes	37727
De tráfico de vehículos de motor	17098
Enfermedades del hígado	33310
Enfermedad alcohólica del hígado	12540
Enfermedades cerebrovasculares	31905
Agresiones	25967
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	18532
Influenza y neumonía	15734
Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal <sup>b</sup>	14391

Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	6372
Insuficiencia renal	11955
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9414
Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	7730
Lesiones autoinfligidas intencionalmente	5549
Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	5172
Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	4974
Septicemia	4516
Anemias	3647
Enfermedades infecciosas intestinales	3347
Úlceras gástrica y duodenal	2496
Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte	10656
Las demás causas	87728

Fuente: INEGI, 2012

#### 4.1. Criterios de Diagnóstico para el Síndrome Metabólico

Actualmente existen diferentes definiciones o criterios de diagnóstico para el SM emitidas por diferentes organizaciones internacionales, estas definiciones aunque comparten varias características, también incluyen diferencias importantes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998 introdujo los siguientes criterios diagnósticos: uno o varios marcadores de resistencia a la insulina (RI) y más de dos factores de riesgo adicionales. Un aspecto central en la definición del SM propuesta por la OMS es la descripción biológica y fisiológica de la RI, y otros factores como obesidad, hipertensión, hipertrigliceridemia, disminución de C-HDL o microalbuminuria (ver cuadro 2). En 2001, la definición del Programa de Educación Nacional para el Colesterol, Panel III de Atención al Adulto (Por sus siglas en inglés, *National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III* NCEP ATPIII), propuso que se requerían tres de cinco factores: obesidad

abdominal, hipertriglicéridemia, disminución de C-HDL, hipertensión arterial y aumento de glucemia en ayuno, como se muestra en el cuadro 2. La definición de la Federación Internacional de Diabetes (por sus siglas en inglés *International Diabetes Federation* IDF) en 2005 retoma los criterios clínicos propuestos por la ATP III, pero consideran como factor diagnóstico más importante el perímetro de la cintura y hacen hincapié en las diferentes medidas antropométricas presentes en cada una de las razas, considerando varios puntos de corte como se muestra en el cuadro 3. La presentación más reciente de criterios para el SM fue realizada por la Asociación Americana del Corazón/ Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (por sus siglas en inglés *American Heart Association / National Heart, Lung and Blood Institute* AHA/NHLBI) y resultan de la modificación de los criterios presentados por la ATP III y la IDF; éstos son sencillos de utilizar, cabe señalar que entre las diferencias que pueden observarse está la glucosa en ayuno la cual en el ATP III es mayor de 110 mg/dL y en esta presentación indica un nivel de glucosa en ayuno mayor de 100 mg/dL (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criterios de definición del Síndrome metabólico.

Parámetros Clínicos	WHO	EGIR	ATP-III	AACE	IDF	AHA/NHLBI
Resistencia a la insulina	IGT, IFG, DM2 o baja sensibilidad a la insulina, más dos de los siguientes criterios:	Insulina plasmática mayor a la percentil 75 más 2 de los siguientes criterios	Ninguno pero 3 de los siguientes 5 criterios:	ITG o IFG más cualquiera de los siguientes basado en juicio clínico	ITG O IFG	Ninguno pero tres de los siguientes criterios:
Peso Corporal	Hombres: radio de cintura > 90 cm, Mujeres: radio de cintura > 80 , IMC > 30 kg/m <sup>2</sup>	Circunferencia de cintura ≥ 94 cm en hombres y ≥ 80 cm en mujeres	Circunferencia de cintura ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres	MC ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>	Circunferencia de cintura elevada más dos de los siguientes criterios:	Circunferencia de cintura ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres
Lípidos	TG ≥ 150 mg/dL C-HDL < 35 mg/dL en hombres y < 39 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL C-HDL < 39 mg/dL en hombres y mujeres	TG ≥ 150 mg/dL C-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 5.0 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL y HDL < 40 mg/dL en hombres o < 50 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL o en tratamiento HDL < 40mg/dL en Hombres o < 50 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150mg/dl o en tratamiento HDL < 40 mg/dL hombres y HDL < 50 mg/dL mujeres
Presión Arterial	≥ 140/90 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg o en tratamiento para HTA	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130 mm Hg sistólica y 85 mm Hg de diastólica o en tratamiento para HTA	≥ 130 mm Hg sistólica y > 85 mm Hg diastólica o en tratamiento para HTA
Glucosa	ITG, IFG o DM2	ITG o IFG (pero no DM)	> 110 mg/dL (Incluida la DM)	ITG o IFG (pero no DM)	≥ 100 mg/dL (incluida la DM)	≥ 100 mg/dL (incluida la DM)
Otros	Microalbuminuria			Otros datos de Resistencia a la insulina		

## 4.2. Epidemiología

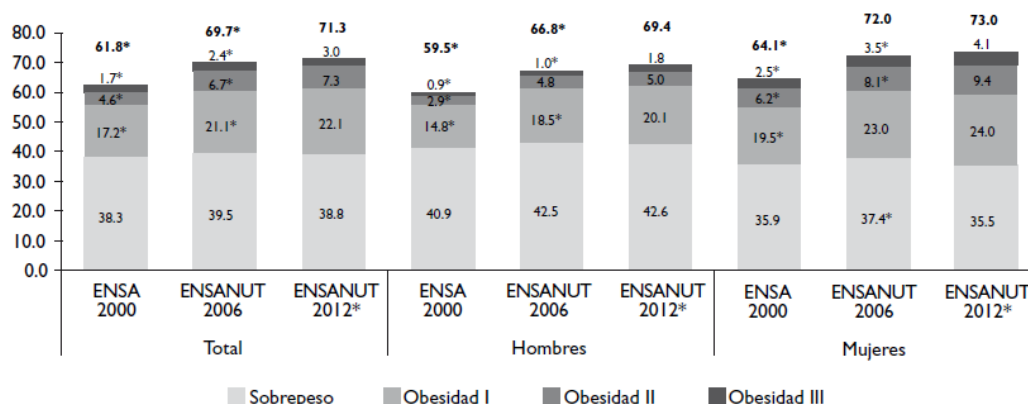
La epidemia de obesidad que se experimenta en México ha sido ampliamente documentada a través de las últimas encuestas nacionales. En el año 2006, se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que ubicó a México como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global (Barquera, *et al.*, 2009). Además, esta prevalencia aumentó más de 12% en tan solo seis años, entre la Encuesta Nacional de Salud (ENSA-2000) (Olaiz, *et al.*, 2006) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), (Jennings-Aburto, *et al.*, 2009), lo cual posicionó a México como uno de los países con mayor tendencia de aumento de sobrepeso y obesidad en el mundo con un porcentaje anualizado de incremento de alrededor de 2%.

Debido a que la obesidad es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares (OMS, 2000) (que son las dos principales causas de mortalidad general en adultos mexicanos) y ciertos tipos de cáncer, (Astrup, *et al.*, 2008), la obesidad ha sido reconocida como uno de los problemas de salud pública más importantes del país (Stevens, *et al.*, 2010). No obstante, hasta hace muy poco se ha reconocido que la obesidad es un problema prioritario que requiere de atención y acciones intersectoriales inmediatas para mejorar la prevención, diagnóstico oportuno y control en la población (OMS, 2004).

En el mundo, la tendencia de la obesidad parece seguir en aumento, aunque recientemente algunos investigadores sugieren que podría estar revirtiéndose en

algunos grupos etáreos (Olds, *et al.*, 2011; Schneider, *et al.*; 2010; Yanovski, *et al.*; 2011). Desde 1988 hasta el año 2012, con el análisis de las Encuestas Nacionales ha sido posible caracterizar el problema de la obesidad para comprender su magnitud, distribución, tendencias y asociación con otros factores de riesgo y enfermedades.

Esta información ha contribuido a que la obesidad sea ahora considerada prioritaria en la agenda nacional de salud.



\* Diferencias estadísticamente significativas en relación con la Encuesta Nacional de Salud 2012 (ENSANUT 2012), usando como punto de comparación la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA 2000) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006).

**Figura 1.** Tendencias en las prevalencias de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres de 20 años o más participantes en la ENSA 2000, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012.\* México.

El sobrepeso y la obesidad se han convertido en el factor de riesgo modificable más importante del país. En la actualidad 71.3% de los adultos mexicanos padece esta condición, con una prevalencia ligeramente elevada en las mujeres. Por grupo de edad la obesidad es más frecuente en la cuarta y quinta décadas de la vida. Si bien en encuestas anteriores se mostraban grandes diferencias por región, localidad y escolaridad, estas diferencias parecen estar disminuyendo



recientemente y en algunos casos tuvieron cambios notorios. Por ejemplo, la zona del país con mayor prevalencia de adultos con peso normal fue la región centro (29.4%) y no la zona sur como se observaba en encuestas anteriores.

El IMC por arriba de  $30 \text{ kg/m}^2$  (punto de corte que define obesidad de acuerdo con la OMS) es ya el promedio nacional para el grupo de mujeres entre 40 y 59 años. Muchos otros estratos en el sexo femenino tienen  $29 \text{ kg/m}^2$  como promedio de IMC (tercera década de la vida, región norte, localidad urbana, entre otros). En hombres ningún subgrupo llegó a  $29 \text{ kg/m}^2$ . Cuando se evalúa adiposidad abdominal por circunferencia de cintura, tanto los hombres como las mujeres se encuentran en promedio por arriba DEL punto de corte de la IDF ( $\geq 80 \text{ cm}$  para mujeres y  $\geq 90 \text{ cm}$  para hombres). El grupo con mayor circunferencia de cintura promedio es el de adultos de 50 a 59 años. Por estado de la República, todas las entidades excepto cuatro tienen una prevalencia de obesidad abdominal por arriba de 70%, y un estado del país ya tiene una prevalencia de 80%. Si bien estos puntos de corte tienen limitaciones, la similitud con la prevalencia de sobrepeso y obesidad tanto en 2006 como en 2012 hace pensar que deben seguir utilizándose como una herramienta de diagnóstico rápido en la población.

Al evaluar la tendencia en el último periodo de encuestas (2006-2012) se puede notar que el incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue relativamente modesto (2.3%) comparado con el observado en el periodo anterior (12.8%). Esto puede interpretarse como un resultado positivo dados los agudos incrementos que se habían observado a partir de la década de los ochenta.

### 4.3. Fisiopatología

El síndrome metabólico (SM) es una entidad que implica múltiples factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV) (Grundy *et al.*, 2005), es un conjunto de anormalidades en las cuales se incluyen la obesidad abdominal, resistencia a la insulina (RI), hipertensión (HTA) y dislipidemia, durante las décadas pasadas el estudio del mismo para comprender su fisiopatología ha ido en aumento, probablemente relacionado con el interés de la obesidad, diabetes y ECV como pandemias mundiales (Grundy *et al.*, 2008). La patogénesis exacta de esta enfermedad permanece difícil de explicar, sin embargo, la evidencia actual crece día a día llevándonos al conocimiento de varios factores metabólicos, celulares y moleculares que interactúan entre sí como son la dislipidemia aterogénica, elevación de las cifras de tensión arterial (TA) y glucosa, estado proinflamatorio y trombótico, obesidad de predominio abdominal, sedentarismo, dieta, factores genéticos, etc. (Després *et al.*, 2008), por lo que se considera al SM como un desorden poligénico.

El tejido adiposo es el regulador del balance de energía en el organismo, debido a que es el encargado principal de almacenar el exceso de energía y según las necesidades liberarla. Esta regulación depende del metabolismo de la glucosa y los lípidos, la liberación de citocinas (pro y antiinflamatorias), hormonas factores de transcripción y ácidos grasos libres (AGL). En condiciones normales, la energía que se captura de los alimentos debe ser equivalente a la que se consumió por el organismo, pero cuando el ingreso de energía es mayor que la que se consume ( $\uparrow$  energía de ingreso/ $\downarrow$  energía consumida = balance positivo) se desencadena la obesidad. La obesidad es el resultado de un balance positivo de energía continuo,

el cual induce la formación de mayores depósitos de energía en forma de triacilglicéridos (TG) en el tejido adiposo y en otros (Ceriello y Motz, 2004; Salmenniemi *et al.*, 2004).

La obesidad está asociada con un estado inflamatorio, crónico de baja intensidad, que activa al sistema inmune innato, que a su vez puede alterar la tolerancia a la glucosa, contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina y progresar a DM2 y ECV. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que el incremento en la concentración plasmática de proteína C reactiva (PCR), de fase aguda predice la presencia de enfermedad coronaria, el SM, la DM2 y el desarrollo de las dos últimas.

En la actualidad existe un consenso incontrovertible sobre la asociación etiológica que existe entre la inflamación crónica de bajo grado y las enfermedades metabólicas y sus complicaciones (Devaraj *et al.*, 2004). Las alteraciones del SM son el resultado de la interacción de diferentes factores (factores de riesgo cardiometabólico) con el sistema inmunológico, modificándolo en las diferentes vías antiinflamatorias y antitrombóticas, dando lugar a lo que se ha llamado “metainflamación” (Hotamisligil, 2010).

La inflamación es la respuesta que el sistema inmunológico monta ante la agresión a estímulos externos, puede ser aguda o crónica según el tipo de estímulo desencadenante y la efectividad de la respuesta inicial para eliminarlo. Mientras que la inflamación aguda es de instalación inmediata y corta duración, la inflamación crónica es de duración prolongada y está relacionada con la respuesta de linfocitos y macrófagos, con la proliferación de vasos sanguíneos y con disfunción del endotelio, así como fibrosis y destrucción tisular. El SM resulta de

un proceso de inflamación crónica y subclínica de bajo grado (González-Chávez, 2010), donde incluso valores séricos marcadores inflamatorios han sido propuestos como parte de la definición del SM. Entre los que se encuentran la PCR, interleucina-6 (IL-6) (Mohanty *et al.*, 2000), el inhibidor del activador del plasminógeno 1(PAI-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Koh *et al.*, 2005).

La interrelación de las vías metabólicas con la inmunológicas es compleja y aún está en camino de ser completamente dilucidada. El sistema inmunológico depende del metabolismo para obtener la gran cantidad de energía que la respuesta inmune requiere. Por otro lado, el metabolismo de los macronutrientes conlleva la oxidación de grandes moléculas con miras a obtener, y posteriormente utilizar la energía química almacenada en los enlaces de alta energía de los carbonos reducidos, lo que genera cierta cantidad de radicales libres, provocando así estrés de óxido reducción.

La ingesta de macronutrientes por sí misma tiene un potencial para generar inflamación en respuesta al estrés oxidante. Este desequilibrio inmunológico, genera una gran cantidad de radicales libres por el reclutamiento y activación de macrófagos y linfocitos, generando de esta forma un ciclo inflamatorio que se perpetúa a sí mismo.

#### **4.4. Adiposidad, Obesidad e Inflamación**

El adipocito controla la energía a través de la captura de AGL, su almacén en forma de TG o su oxidación hasta CO<sub>2</sub> y agua por medio de la  $\beta$ -oxidación. La captura de los AGL depende de la actividad de la lipoprotein-lipasa enzima

regulada positivamente por insulina y con gran expresión en tejido adiposo con respecto a otros tejidos. En obesidad y RI el efecto inductor de la insulina sobre la lipoprotein-lipasa está disminuido en el adipocito, en cambio en el músculo este efecto está aumentado, lo que favorece la acumulación de grasa en este último.

El almacén de triglicéridos dentro del adipocito se afecta en la RI. La esterificación de AGL necesaria para la síntesis de TG depende del abastecimiento de glicerol 3-fosfato derivado de la glucólisis. Sin embargo, si la captura de glucosa está disminuida por la RI la síntesis de TG también lo estará y por lo tanto los AGL aumentarán dentro y fuera del adipocito. En estas circunstancias el adipocito intenta remover los AGL por la  $\beta$ -oxidación pero como flujo a través de esta ruta está limitado por la generación de ADP (Adenosin Difosfato) y éste a su vez por la actividad metabólica del adipocito, el exceso de AGL provoca el desacoplamiento entre la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y la generación de ADP. Así, la  $\beta$ -oxidación puede continuar independientemente de la producción de ADP. La disminución de la función mitocondrial reduce aún más la habilidad de los adipocitos para almacenar triglicéridos. Los fármacos que inhiben a la DNAPolimerasa mitocondrial e induce una reducción de 50% del contenido de DNA mitocondrial en los adipocitos, ocasionan una redistribución de grasa periférica hacia el centro y mayor riesgo del SM (Maassen *et al.*, 2007). La grasa depositada en el músculo y el hígado provoca RI, y la grasa circulante, disfunción endotelial.

Además de las alteraciones en la captura, almacén y oxidación de los AGL, el patrón de secreción de citocinas del tejido adiposo está alterado en la obesidad. Así que, tejido adiposo lejos de ser un tejido dedicado pasivamente al almacén y reserva energética, desempeña una función preponderante en el equilibrio

metabólico e inflamatorio por medio de la secreción de factores llamados adipocinas. El estado patológico de acumulación excesiva de tejido adiposo (obesidad) implica la desregulación de este tejido, con un aumento en el número y tamaño de los adipocitos, infiltración por células mononucleares y alteración en la regulación de los vasos que lo irrigan.

Los adipocitos a semejanza de los macrófagos y las células T, tienen la capacidad de activar el complemento y producir citocinas en estadios tempranos de su diferenciación también tienen una gran capacidad fagocítica que les permite transformarse en células similares a macrófagos en respuesta a cierto estímulos.

Cabe hacer notar en este punto que el proceso inflamación en el tejido adiposo difiere de la inflamación clásica en que la infiltración inicial por neutrófilos es seguida primero, por infiltración de macrófagos y posteriormente por linfocitos (Nilolajczyk *et al.*, 2011).

En la obesidad los adipocitos comienzan a secretar TNF- $\alpha$ , el cual estimula a los preadipocitos para producir la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (Devaraj *et al.*, 2004), la misma proteína que el endotelio produce en respuesta a ciertas citocinas (Wellen, Hotamisligil *et al.*, 2003), con esto se reclutan los macrófagos que infiltran al tejido adiposo.

En los macrófagos se encuentran el receptor gamma activado por proliferador de los peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), cuya activación tiene propiedades antiinflamatorias que lo han convertido en un atractivo blanco terapéutico, se reconocen dos tipos de activación de los macrófagos del tejido adiposo: tipo M1 también llamada clásica y la M2 también conocida como alternativa. La adiponectina y la activación del PPAR favorecen el tipo de activación 2, lo cual deriva en mayor sensibilidad a

la insulina (Anderson *et al.*, 2010). La obesidad favorece el tipo M1 que conduce a la activación inflamatoria desregulada y ésta lleva al SM.

Por otro lado, el incremento en la ingesta calórica propicia la expansión rápida del tejido adiposo y al aumento de las concentraciones de ácidos grasos saturados circulantes. Éstos sirven de ligando para los receptores tipo Toll (TLR), que junto con otros receptores de superficie activan cascadas de señalización que terminan por activar el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B).

La desregulación del tejido adiposo conlleva cambios en el número, fenotipo y localización de las células adiposas, activación de las células del sistema inmune y cambios en las estructuras vasculares de dicho tejido, favoreciendo el ambiente proinflamatorio; por otro lado, los (AGL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas pueden interactuar con el sistema inmune para contribuir a la inflamación de bajo grado.

#### **4.4.1. Adipocinas e inflamación**

El adipocito es capaz de producir múltiples péptidos de señalización, llamados adipocinas. Esta capacidad secretora del tipo adiposo se puede modificar por los cambios generados por la obesidad, de los que se pueden mencionar a:

La adiposina, también conocida como factor D de complemento, es una proteasa de serina que interactúa con la producción de las proteínas C3 y factor B para la producción de la proteína estimulante de activación (ASP), una proteína plasmática producida por los adipocitos que estimula la síntesis de triglicéridos.

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos que tiene una función fundamental en la conexión entre el estado nutricional y la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, se produce principalmente en el tejido adiposo. Aunque también en menor proporción el músculo esquelético placenta y estómago (Matarese, 2000). Emparentada estructuralmente con la IL-6, IL-11 e IL-12 la leptina modula la activación y proliferación de linfocitos T, tiene efectos antapoptóticos en el linfocito T, activa a los polimorfonucleares, promueve la quimiotaxis de neutrófilos potencia la producción de citocinas como IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ , polariza la respuesta TH1 al inhibir la IL-10 e IL-4, estimula la proliferación de monocitos y promueve que éstos produzcan IL-6 Y TNF- $\alpha$ , todo lo cual estimula el ambiente proinflamatorio.

La adiponectina es una adipocina en general antiinflamatoria como lo demuestra al disminuir la función y crecimiento macrofágicos, así como su capacidad de disminuir la acción del NF-kB.

En la obesidad la producción de leptina está aumentada, mientras que la de adiponectina esta disminuida, con lo que estimula la infiltración macrofágica del tejido adiposo (Xu *et al.*, 2002). Los macrófagos reclutados expresan el PPAR,  $\gamma$  y producen TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , entre otros factores proinflamatorios.

#### **4.5. Inflamación y resistencia a la insulina**

La insulina es una hormona pleiotrópica que regula el metabolismo energético y está estrechamente relacionado con el estado inflamatorio.

El receptor de la insulina pertenece a la familia de receptores tirosincinasa, las vías de señalización intracelular implican dos vías principales: la del fosfatidil-inositol 3 cinasa (IP3K), principal regulador del metabolismo de la glucosa y la de la



cinasa de proteína activada por Ras-mitógeno (MAPK) que regula la expresión génica e influye en el crecimiento y diferenciación celular. Estas dos vías confluyen en los sustratos del receptor de insulina (IRS), una familia conformada por seis miembros, nominados de IRS a IRS-6. De ellos IRS.1 IRS-2, son moléculas de señalización cruciales en la acción de la insulina y su inactivación produce resistencia a esta hormona. La acción de la insulina requiere la fosforilación de un residuo de tirosina del IRS-1 cuando fosforila. En cambio un residuo de serina (en el que se encuentra en la posición 307), la actividad del IRS-1 y con él la acción de la insulina disminuye significativamente. Entre estas cinasas de serina capaces de inactivar el IRS-1 se encuentra la cinasa 1 Kappa beta ( $I\kappa B\beta$ ) (Arkan, 2005). En la vía de NF- $\kappa$ B y a cinasa N-terminal de C-jun (JNK) (Hirosumi *et al.*, 2002). En la vía JNK/AP-1. En el TNF- $\alpha$  citocina proinflamatoria secretada predominantemente por esos monocitos y macrófagos, activa el NF- $\kappa$ B.

Adicionalmente, hay otros inhibidores de IRS relacionados con la inflamación entre los que se encuentran las proteínas de señalización supresoras de citocinas (Socs) Socs-1 y Socs -3 ubiquitinan a las proteínas IRS, promoviendo así su degradación lo que contribuye a la acción deficiente de la insulina (Hotamisligil 2006; Devaraj 2004).

Por otro lado, también la desregulación lipídica disminuye la sensibilidad a la insulina en el tejido muscular. Eso sucede por la acumulación intracelular de precursores de la síntesis de lípidos en células musculares, como acil-CoA y

ceramida, que activa a la proteincinasa C- $\theta$  (PKC $\theta$ ), la cual es una cinasa de Seria/treonin que inhibe la cascada de señalización de la insulina.

#### **4.6. Disfunción endotelial**

El endotelio es una capa monocelular que cubre la cubierta interna de los vasos sanguíneos, es un tejido altamente activo desde el punto de vista inmunoendocrinológico. También es el encargado de mantener la relación vasomotora y la homeostasis sanguineotisular, así como el equilibrio de componentes protrombóticos y antitrombóticos, fibrinolíticos y antifibrinolíticos. Por lo tanto la incapacidad para llevar a cabo estas funciones de forma apropiada, situación conocida como disfunción endotelial, conduce a procesos inflamatorios así como a la aparición de enfermedad vascular.

El óxido nítrico (NO) es el mediador principal de la vasodilatación. Dadas sus características de bajo peso molecular y alta lipofilidad, difunde fácilmente a través de las membranas, mediante la nitrosilación libera cGMP (Guanosin monofosfato cíclico), el cual libera calcio citosólico produciendo relajación del músculo liso vascular, y consecuentemente, vasodilatación.

Es producido por las enzimas sintasa de óxido nítrico (NOS). Se conocen tres tipos de NOS: NOS-I expresada constitutivamente en tejido neuronal, NOS-III expresada en células endoteliales y las NOS inducible (iNOS) localizada en el endotelio. Tanto los ácidos grasos libres como las citocinas inflamatorias y el estrés oxidante inactivan a la iNOS, lo cual favorece a vasoconstricción y con ella la hipertensión arterial sistémica.

El NO, además de ser vasodilatador, también disminuye la permeabilidad vascular y la síntesis de moléculas de adhesión, reduce la agregación plaquetaria, la oxidación tisular, la activación de factores trobogénicos, de crecimiento celular, de proliferación y de migración; inhibe la expresión de citocinas proaterogénicas y proinflamatorias, favorece la fibrinólisis y coadyuva a la actividad de IRS-1. Por esta razón, el NO es considerado fundamentalmente una molécula antiinflamatoria. Por otro lado, el endotelio también libera angiotensina II (AGII), la cual a través del receptor AT1 tienen efectos vasoconstrictores, protrombóticos oxidantes y antifibrinolíticos. El estrés oxidante estimula directamente a través de HSP-60, la replicación del NF- $\kappa$ B, que conduce a la producción de citocinas proaterogénicas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 moléculas de adhesión y citocinas que inhiben la actividad de las NOSIII y favorece la síntesis de ATII. Este es el motivo por el cual los procesos inflamatorios estudiados hasta ahora resultantes en estrés oxidante conducen a disfunción endotelial.

#### **4.7. Obesidad, apoptosis de célula $\beta$ e insulinitis**

Otro aspecto de gran importancia a considerar la inflamación crónica es la afección intracelular que se produce por la variación de las vías proinflamatorias consideradas hasta este momento. Los organelos más estudiados en esta línea son el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, los cuales participan en la síntesis, transporte, liberación de proteínas, el almacenamiento de lípidos y glucosa. Las células especializadas de organismo modifican su RE para cumplir con sus objetivos según las demandas de síntesis proteínica (Borradeile, 2006).

Una de las funciones del RE es determinar la biodisponibilidad de glucosa, produciendo enzimas que determinan el metabolismo de la glucosa y permitiendo el desarrollo de repuestas adaptativas, como la sobreproducción de proteínas desdobladas. (UPR), mediante las cuales se activa la respuesta inflamatoria celular y desencadena la activación de la vía de JNK, IK $\kappa$  $\beta$ /NF- $\kappa$ B y Especies reactivas de oxígeno (ERO). El estrés del RE estimula la activación de tres receptores de cinasa RE semejante a la cinasa de proteína dependiente de ARN [PERK, RNA *dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase*] el factor 6 de transcripción activado y a enzima-1, que requiere el inositol (IRE-1), todos ellos involucrados en la respuesta de UPR. Si esta respuesta es suficiente puede promover la supervivencia de la célula de lo contrario se presenta muerte celular (Kharroubi *et al.*, 2004; Fulda *et al.*, 2010).

Por otro lado, el estrés del RE activa JNK, el cual fosforila a una familia de proteínas llamadas Bcl-2, suprimiendo así sus efectos antiapoptósicos; asimismo, libera del citoesqueleto a la proteína BH3 al fosforilarla, lo que deja de reprimir las propiedades apoptósicas de las proteínas Bax y Bak induciendo de esta forma la apoptosis de la célula beta (Gregor y Hotamisligil, 2007). Considerar el daño celular a la células  $\beta$  secundario a estos procesos inflamatorios obliga a abundar aquí en otro fenómeno que dadas sus implicaciones patogénicas y terapéuticas es de suma importancia, la insulinitis.

En las células  $\beta$  del páncreas la hiperglucemia genera estrés del RE al inducir una hiperinsulinemia sostenida tanto del estrés oxidante con las grandes cantidades de ERO y la generación de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  E IFN- $\gamma$ , así

como el estrés del RE llevan tarde o temprano a la falla en la función de las células  $\beta$  con la consecuente deficiencia de insulina. Por otro lado, la apoptosis de las célula beta favorece un estado crónico de inflamación generado por las citocinas inflamatorias liberadas por los macrófagos, La IL-1 $\beta$  induce la enzima superoxidodismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), con la que se incrementa la conversión de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro de la mitocondria incrementado así la toxicidad por la célula  $\beta$ . La excesiva producción de ERO intracelulares afecta en forma primaria a la mitocondria, la cual se considera como el desencadenante estrella de todo este proceso de enfermedad.

#### **4.8. Fisiopatología de la hiperglucemia en DM2**

La resistencia a la insulina es frecuente en la población general y más en el sobrepeso y la obesidad; antecede al desarrollo de la diabetes. La sobrecarga que ejerce esa resistencia sobre las células beta del páncreas agota su reserva funcional en los individuos con predisposición genética, disminuyendo a 60% en los paciente con intolerancia a la glucosa y hasta 50 % al diagnóstico de la DM2.

Otros mecanismos que participan en el desarrollo de la hiperglucemia son la producción hepática de glucosa, su absorción intestinal, derivada de la digestión de los carbohidratos complejos y de los disacáridos, el control funcional de las incretinas intestinales sobre la secreción de insulina y glucagón por los islotes de Langerhans, la actividad de glucagón, las anomalías en el eje adiposo pancreático la reabsorción tubular renal de la glucosa, el depósito de amiloide en los islotes de Langerhans, la resistencia a la insulina en el SNC (Sistema Nervioso Central) y las deficiencias enzimáticas derivadas de cambios genéticos.

Las dislipidemias ocurren cuando aparecen las concentraciones séricas de colesterol total, triglicéridos o colesterol HDL. En la mayoría de los casos esto sucede de manera sintomática; probablemente por ello la mitad de los adultos mexicanos la padecen y desconocen.

Las dislipidemias pueden ser causadas por defectos genéticos (dislipidemias primarias) o ser de consecuencia de patologías o de factores ambientales (dislipidemias secundarias).

Una buena estrategia para identificar la causa secundaria de las dislipidemias producto de la influencia dependiente de uno o varios factores, es mediante el uso del acrónimo de las cuatro D: alimentación (Diet), fármacos (Drugs), trastorno metabólicos (Disorders of metabolism), y enfermedades (Diseases).

Otra forma para clasificar el tipo de dislipidemias con base en sus factores causantes es la siguiente:

1.- Defectos genéticos: las principales dislipidemias de causa genética son a hipercolesterolemia familiar, la dislipidemia familiar combinada, la hipercolesterolemia poligénica, de disbetalipoproteinemia las hipertrigliceridemias familiares y el déficit de HDL.

2. Patologías causantes de dislipidemias las principales obesidad, DM, hipotiroidismo, colestasis, insuficiencia renal y el Síndrome nefrótico.

3.- Factores ambientales: los principales son cambios cualitativos y cuantitativos de la dieta así como algunos fármacos.

Las alteraciones metabólicas conducen a condiciones fisiopatológicas relevantes, basadas en los principales productos metabólicos como:

#### **4.8.1. Glucotoxicidad**

Durante la resistencia a la insulina, la hiperglucemia posprandial y la hiperlipidemia incrementa el flujo de equivalentes reductores en la cadena transportadora de electrones mitocondrial y la producción de ERO, principalmente anión superóxido ( $O_2^-$ ), generando un estado de estrés oxidante que puede traer diversas consecuencias. Aunado a esto, la acumulación de grasa visceral también contribuye al estrés oxidante, a través de la activación del complejo NADPH oxidasa (Zak *et al.*, 2007), lo cual se ha asociado también a la disminución de enzimas antioxidantes en ratones obesos (Furukawa *et al.*, 2004).

La interacción de las ERO con otras moléculas puede originar una reacción en cadena autocatalítica que dañe los componentes celulares, de tal suerte que pueden causar la muerte de la célula. Por esta razón es de suma importancia que las células posean enzimas antioxidantes que las protejan y/o inhiban la producción de ERO. De no ser así se presenta un estado de estrés oxidante que se ha asociado al desarrollo de diversas patologías incluyendo el síndrome metabólico (Zak *et al.*, 2007).

La exposición de células  $\beta$  a concentraciones altas de glucosa por periodos cortos, se caracteriza por el aumento en la producción de ERO ( $H_2O_2$ ) y de estrés oxidante, lo cual se evita por la adición de inhibidores de la función mitocondrial.

#### **4.8.2. Lipotoxicidad**

La exposición aguda de las células  $\beta$  a las concentraciones de ácidos grasos potencia el proceso de secreción de insulina inducido por glucosa; posiblemente a través de la activación de determinadas isoformas de PKC mediante la regulación

de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  Por el contrario, la exposición crónica a concentraciones altas de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos disminuye la secreción de insulina al estímulo con glucosa en animales y humanos e induce profundos cambios fenotípicos.

#### **4.8.3. Glucolipototoxicidad**

Cuando la resistencia a la insulina se acompaña de obesidad y de periodos de hiperglucemia, sumado a concentraciones elevadas de ácidos grasos circulantes, se presenta glucolipototoxicidad, que afecta principalmente a las células  $\beta$  (Roche 2003). El incremento de AGL circulantes favorece los proceso de esterificación y aumenta los depósitos de ácidos grasos en las células  $\beta$ , que como primera instancia aumentarían la secreción de insulina, sin embargo, esta respuesta no puede mantenerse por mucho tiempo debido al exceso intracelular de intermediarios lipídicos que puedan activar la apoptosis de las células  $\beta$ .

El incremento de AGL circulantes induce la activación de diversas rutas desintoxicantes como la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, el desacoplamiento mitocondrial (disminución de ATP) y la  $\beta$ -oxidación proxisomal. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia hay aumento en a acumulación de malonil-CoA, que inhibe a CPT-2 y la  $\beta$ -oxidación.

La expresión de UCP-2 y de ACO que dependen del factor transcripcional PPAR- $\alpha$  se inhibe; como resultado los ácidos grasos se esterifican y depositan en las células  $\beta$  conduciéndolas a la vía apoptótica.

La obesidad, la resistencia a la acción de la insulina, y la intolerancia a la glucosa son algunas de las alteraciones que acompañan al síndrome metabólico. Estas



condiciones afectan la funcionalidad de las células  $\beta$  del páncreas, sobre todo disminuyen los procesos para generar nuevas células (neogénetos, replicación) y aumentan la tasa de muerte celular por apoptosis. En los mecanismos, que conducen a las alteraciones en las células  $\beta$ , participan diversas moléculas como el polipéptido amiloide, la proteína desacoplante tipo 2 sintetizado por las propias células  $\beta$  las moléculas expresadas y liberadas por el tejido adiposo (ácidos grasos libres y citocinas), la presencia de altas concentraciones de glucosa, las especies reactivas de oxígeno producidas por la glucotoxicidad, entre otras.

La pérdida de la masa de las células  $\beta$  puede llegar a un punto crítico, en el cual no se pueden revertir los efectos dañinos de las moléculas antes mencionadas, lo que disminuye la producción y liberación de insulina, que coadyuva al establecimiento de la DM2.

La hipertensión arterial es uno de los criterios clínicos del síndrome metabólico y hasta el momento ha sido difícil establecer si su aparición es causa de ciertos factores de riesgo presentes en el individuo, como la predisposición genética, edad, sexo, etc., o si es producto de una serie de alteraciones metabólicas o inflamatorias presente en el mismo sujeto.

En los individuos obesos y con resistencia a la insulina se han identificado varias vías metabólicas que intervienen en el desarrollo de la hipertensión arterial la que dirige ciertas vías metabólicas y proinflamatorias que retroalimentan este círculo patológico, de tal modo que se perpetua el daño endotelial.

Dentro de los sistemas más referidos con el desarrollo de la hipertensión arterial, las respuestas proinflamatorias y la sensibilidad celular alterada a la glucosa, es SRAA es sin duda el más estudiado.

#### **4.9. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)**

El RAAS es una cascada proteolítica relacionada con un sistema de transducción de señales en el que la renina escinde el decapeptido angiotensina I (AGI) del dominio N-terminal del angiotensinógeno 1. El riñón es el único sitio conocido en el cual la prorenina se convierte en renina y la única fuente de renina plasmática. El hígado es el lugar más importante de expresión del gen del angiotensinógeno, pero el mRNA del angiotensinógeno se expresa en varios lugares extrahepáticos incluidos cerebro, grandes arterias, riñón, tejido adiposo y corazón (Oparil y Weber, 2004; Isaac *et al.*, 1998).

Una vez obtenida la AI a partir del angiotensinógeno por la acción de la renina se transforma de manera proteolítica en angiotensina II (AGII) por la ECA, sobre todo en el plano pulmonar.

La AGII actúa a través de cuando menos dos clases de receptores: AT-1 y AT-II. La mayoría de los efectos fisiológicos de la AGII tiene la mediación de los receptores AT-1. Los receptores AT-2 se expresan en especial durante el periodo fetal y se han vinculado con la diferenciación y regeneración celular (Watanabe *et al.*, 2005).

##### **4.9.1. Enzima convertidora de angiotensina (ECA)**

En términos estructurales, la ECA es una metalopeptidasa de zinc y desde, el punto de vista funcional, una ectoenzima unida a membrana que representa el paso enzimático final en la producción de AGII a partir de AI (Oparil y Weber, 2004; Johnston, 1990; Skidgel y Erdos, 1993). Existen tres isoformas principales de

ECA: a) ECA somática, b) ECA testicular o germinal y c) ECA plasmática o soluble. La ECA somática es la enzima principal para la producción de angiotensina II (Oparil y Weber, 2004; Esther *et al.*, 1997).

La ECA inactiva la bradicinina mediante la liberación del dipéptido Phe-Arg del extremo terminal del péptido. También posee la capacidad de escindir dipéptidos y tripéptidos de la región C terminal de agentes como la sustancia P, encefalinas, neurotensina, colecistocinina, bombesina y hormona liberadora de hormona luteinizante (Oparil y Weber, 2004; Skidgel y Erdos, 1993; Erdos, 1990; Skidgel y Erdos, 1987).

#### **4.9.2. Receptor de la angiotensina tipo I**

El receptor AT-1 de la angiotensina pertenece a la superfamilia de las siete proteínas G de recubrimiento transmembranal. Posee una masa molecular de 41 KDa y lo codifica un gen en el cromosoma 3. Se localiza de forma primaria en las suprarrenales, el músculo liso vascular, el riñón y el corazón. En el cerebro se ubica en áreas específicas participantes de la acción de la AGII. La liberación de vasopresina y el control neurogénico de la presión arterial (Oparil y Weber, 2004; Steckelings *et al.*, 1992; Gasparo *et al.*, 1994) como son las regiones circunventriculares, el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático y el núcleo del conducto solitario.

La estimulación del receptor AT-1 da lugar a la activación de la fosfolipasa de proteína cinasa c (PKC), la cinasa de tirosina JAK Y FAK. (Maria *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2005) y la movilización de calcio en cuestión de segundos (aumenta el calcio intracelular y promueve la contracción muscular);

esto indica la activación de la proteincinasa C y MAPk y p28 MAPk en cuestión de minutos y además estimula la transcripción génica y la actividad de la oxidasa de NADH/NADPH, con lo cual se perfila la formación del ión superóxido y peróxido de hidrógeno en cuestión de horas.

En estudios recientes se ha demostrado que existen varias vías a través de las cuales AT-1 y AT-2 modulan la afinación de la célula endotelial (CE) (Watanabe *et al.*, 2005; Berk, 2003; Li *et al.*, 2000). Una vez estimulado el receptor AT-1 por la AGII se inicia una secuencia de transcripciones que implican una serie de efectos sistemáticos al actuar de dos formas: a) como hormona circulante: produce vasoconstricción y estimulación de la síntesis de aldosterona y vasopresina y, por otro lado, b) un efecto local (autocrino y paracrino): estimula la proliferación celular de miocitos y musculo liso vascular y la formación de colágeno e induce apoptosis celular al inhibir la regulación transcripcional de la proteína antiapoptósica Bcl-2.

La inducción de la apoptosis se ve reforzada por otras vías por ejemplo, la estimulación del receptor AT-1 aumenta la regulación de la proteincinasa activada por mitógeo (MAPk), lo que ocasiona una inactivación extracelular de las señales reguladoras y disminución secundaria de la transcripción de la Bcl-2. La elevación de la síntesis de radicales libres por la estimulación de la oxidasa de lipoproteínas de baja densidad (LOX-1), con lo cual se estimula a su vez la síntesis de radicales libres, además de una mayor relación de la MAPk, y la síntesis del factor nuclear  $\kappa\beta$  (FN $\kappa\beta$ ) (Watanabe *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1999).

El DNA es en particular susceptible al daño por radicales libres (Hebert *et al.*, 2008; Toussaint *et al.*, 2000) y el resultado es un envejecimiento biológico acelerado. Algunos autores como Kart *et al.*, han demostrado que existe un daño

exudativo del DNA mediado por la angiotensina II a través de la acción de AT-1. Este efecto se ha demostrado en las células musculares lisas y se han descubierto hasta el momento dos mecanismos:

1.- Envejecimiento prematuro inducido por estrés (también conocido como envejecimiento independiente de telómero).

2.- Envejecimiento acelerado por fragmentación del telómero de DNA.

El AT-1 altera de manera directa a la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), con lo que disminuye la síntesis del óxido nítrico (Merrero *et al.*, 1999). La activación de los AT-1 no sólo promueve la apoptosis de la célula endotelial, sino también la apoptosis por activación de la proteína P13-cinasa, la cual estimula expresión de una proteína antiapoptósica. Esto quiere decir que la Angiotensina tiene un efecto regulador en la apoptosis y la regeneración de células endoteliales y vasos sanguíneos (angiogénesis), pero se requieren más estudios (Watanabe *et al.*, 2005; Ohashi *et al.*, 2004).

El AT-1 también incrementa la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) al aumentar la transcripción del mRNA del PAI-1. El PAI-1 es el mayor inhibidor fisiológico del activador del plasminógeno tisular y el activador del plasminógeno tipo urocinasa; en consecuencia, juega un papel en la trombosis al suprimir al sistema fibrinolítico (Watanabe *et al.*, 2005; Ridker *et al.*, 1993; Nishimura *et al.*, 1997).

Otra función observada del AT-1 es la inducción y activación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y ésta a su vez cataliza la formación de prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub>. En situaciones de hipoxia tisular, la estimulación del AT-1 induce además la activación del factor 1 inducido por hipoxia, el cual incrementa la expresión del

factor de crecimiento endotelial (VEGF) y promueve la angiogénesis y la remodelación vascular. Estos efectos confieren al AT1 una función antiinflamatoria, remodeladora y patológica importante al propiciar la acumulación de células inflamatorias y edema en los episodios agudos como el accidente vascular cerebral (AVC) y la cardiopatía isquémica (Watanabe *et al.*, 2005; Kramer *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2002).

Algo muy llamativo en relación con el bloqueo de los AT-1 con medicamentos antagonistas de los receptores de la angiotensina tipo II (ARAI), es la activación de los PPAR- $\gamma$ . El efecto agonista que logran los ARA II es similar al observado con las pioglitazonas, al aumentar la expresión de PPAR- $\gamma$  se incrementan los GLUT-4 que son transportadores de glucosa, mejora el transporte de ésta hacia el interior de la célula y disminuye la resistencia a la insulina (Watanabe *et al.*, 2005).

Influencia de la AGII en la expresión de los GLUT como sustrato de la RI y el daño endotelial. Como ya se ha mencionado a través de su interacción con los AT-I la AGII activa una diversidad de vías de señalización intracelular, entre ellas la fosfolipasa de proteincinasa C (CPKC), el calcio citosólico y la cinasa de tirosina JAK y FAK (Maria *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2005), si bien activa también señales extracelulares como la cinasa ( ERK 1 Y 2) y la proteincinasa activada por mitógeno p38(p38MAPk), las cuales son miembros de la familia MAPk. Todas pueden intervenir en cierta medida en la resistencia celular a la insulina, más aun se ha reportado que la AGII, al inducir una fosforilación de la serina del receptor para la insulina (IRS)-1 y la cinasa PI-3, puede contribuir a la resistencia en las células de la vasculatura lisa.

La expresión de los transportadores de glucosa (GLUT) están presentes desde las fases iniciales de la placenta, el GLUT-1 se localiza en placenta, células endoteliales, células musculares lisas, musculares esqueléticas, adipocitos, podocitos (Maria *et al.*, 2007; Haugue-de Mouzon *et al.*, 19997; Janson *et al.*, 1993; Takata *et al.*, 1992).

GLUT-3 se expresan en tejidos con elevados requerimientos de glucosa como cerebro, testículos, y placenta (Gould *et al.*, 1991; Haber *et al.*, 1993).

Los GLUT-4 expresados sólo en tejidos sensibles a la insulina presentan una similitud en los patrones de distribución a los GLUT-12, ya que se encuentran en los tejidos adiposo, esquelético y cardíaco (Cushman y Wardzala, 1980; Roger *et al.*, 2002).

La regulación de la respuesta a la glucosa en las células grasas y musculares a través de GLUT-4 es una acción fundamental de la insulina, este proceso se altera en la DM2. Debido a que la enfermedad tiene proporciones epidémicas, la comprensión de las bases moleculares de los GLUT-4 es importante (Ishiki y Klip, 2005; Piper *et al.*, 1991).

Los efectos de la AGII sobre la respuesta celular a la glucosa se vinculan también con la conformación del citoesqueleto. El esqueleto de actina facilita la propagación de los efectos farmacológicos, metabólicos y nucleares de la insulina, al regular la distribución subcelular de la señales moleculares en las que participan las vías de señalización de la insulina, de esta forma, los filamentos de actina también juegan un papel esencial en la transportación de glucosa (Maria *et al.*, 2007; Marette *et al.*, 1992).

Estudios corroboran que la AGII desordena con el tiempo los filamentos de actina (Maria *et al.*, 2007; Tsakiridis *et al.*, 1994), mientras que la insulina induce una rápida reorganización de los filamentos, además de promover la nueva formación de éstos (regeneración) en sitios dañados (Maria *et al.*, 2007; Cooper, 1987), con lo cual mejora la reacción de la glucosa.

En estudios farmacológicos se ha confirmado que los medicamentos antagonistas de los receptores AT-1 evitan el desordenamiento de las fibras de actina, de tal manera que mejoran la respuesta celular a la glucosa (Maria *et al.*, 2007).

#### **4.10. Tratamiento**

El tratamiento para las diferentes alteraciones que constituyen el síndrome metabólico debe ser multifactorial y actuar sobre todos los factores de riesgo asociados, el denominador común en todas ellas debe ser un estilo de vida saludable con un abandono del hábito tabáquico, un incremento en la actividad física y una restricción calórica en la dieta que ayude a la pérdida de peso y derive finalmente en la normalización de los diferentes parámetros afectados.

Los fármacos para perder peso se dividen en dos clases: anorexigénicos e inhibidores de la absorción.

El orlistat inhibe la absorción de grasa alrededor de 30% y es moderadamente eficaz en comparación con el placebo (pérdida de peso de 5%, en promedio). Se ha demostrado que el orlistat disminuye la incidencia de DM2, efecto evidente en particular en individuos con IGT basal.

Presión arterial. En personas con SM pero sin diabetes, la mejor elección es un antihipertensivo inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), o un



antagonista del receptor de angiotensina II, dado que los dos fármacos al parecer disminuyen la incidencia de DM2. Toda persona con hipertensión debe consumir una dieta hiposódica con abundantes frutas y verduras y consumo de productos lácteos semidescremados.

Alteración de la glucemia en ayuno. Se ha demostrado que la metformina disminuye a incidencia de diabetes.

#### **4.10.1. Hipoglucemiantes orales**

Los fármacos hipoglucemiantes orales actúan en varios de los mecanismo fisiopatológicos de la diabetes: la resistencia a la insulina, las alteraciones en la secreción de la insulina por la célula beta del páncreas, la producción hepática de la glucosa, la absorción intestinal de la glucosa derivada de la digestión de los alimentos, el control funcional insular total con base a las hormonas incretinas, la actividad del glucagón, etc. Al disminuir la hiperglucemia, mejora la glucotoxicidad independientemente del medicamento empleado y por esa razón aumenta la sensibilidad a la insulina y la capacidad secretora de la célula beta. En algunos de esos fármacos se consideran otros efectos además del hipoglucémico: se les atribuyen efectos en otros factores de riesgo cardiovascular como los lípidos, en los fenómenos inflamatorios, la disfunción endotelial, la resistencia a la insulina, la producción de radicales libres, el vaciamiento del estómago la reservación de las células beta y la diferenciación a partir de precursores.

Se presentan a continuación los grupos de hipoglucemiantes orales de acuerdo con su principal mecanismo de acción:

#### **4.10.1.1. Secretagogos de insulina**

Las sulfonilureas más empleadas de este grupo en la actualidad son la glibenclamida, la glicacida, la glipicida y la glimepirida. Con el mismo mecanismo de acción pero de forma más rápida se tiene a la meglitinidas como la repaglinida y natelinida.

Las sulfolureas se utilizan en clínica desde 1955-1956. Estimulan la secreción de insulina por las células beta a través de un receptor de membrana celular que cierra los canales de potasio y permite el ingreso celular del calcio con la consiguiente expulsión de la insulina acumulada en los gránulos secretores. Las características de unión al receptor celular les confieren una acción duradera, de horas.

Reductores de la producción hepática de glucosa:

Sensibilizadores de la insulina: metformina, rosiglitazona y pioglitazona. Existen otros compuestos con efecto también en la resistencia a la insulina que pronto podrán emplearse.

#### **4.10.1.2. Biguanidas**

También en uso desde hace varias décadas. De este grupo la más usada es la metformina. De la cual no se conoce su mecanismo de acción y se identifica su efecto como moderador de la producción hepática de glucosa al disminuir la gluconeogénesis y la glucogenólisis; así como una acción más pequeña en la utilización periférica de la glucosa. Desciende la glucosa de ayuno entre 40 y 80 mg/dL. Disminuye 10-20% los niveles de triglicéridos por acción en la síntesis hepática de lipoproteínas VLDL y en proporción menor (5-10%) al colesterol

circulante total, aumenta la fibrinólisis, disminuye al inhibidor 1 dl activador del plasminógeno, al factor de Von Willebrand y la agregabilidad plaquetaria. En algunos trabajos se menciona además un efecto favorable sobre la hipertensión arterial. No ocasiona ganancia de peso. Puede indicarse en obesos y en individuos con peso normal. Algunas personas no la toleran por sus efectos gastrointestinales y también al paso de los años, disminuye su efecto, siendo necesario asociarla para mantener el buen control. La acidosis láctica es su efecto negativo más grave y puede evitarse si se respetan las contraindicaciones para su empleo: nefropatía, hepatopatía, insuficiencia respiratoria o cardíaca acidosis, infección grave, alcoholismo, empleo de contraste radiológico, intravenoso y embarazo (González Chávez, 2002).

#### **4.10.1.3. Inhibidores de las alfa glucosidasas intestinales: acarbosea y miglitol**

Acarbosea y miglitol. Retrasan la digestión de los carbohidratos complejos y de los disacáridos (almidones, dextrinas, sacarosa) al inhibir de manera reversible a la alfa glucosidasa de la mucosa intestinal (glucoamilasa, sacarasa, mantasa e isomaltasa), hacen más lenta la absorción de la glucosa y atenúan la hiperglucemia posprandial. Disminuyen la glucosa en ayuno desde 20 y 40 mg y la postprandial entre 40 y 80 mg/dL. Disminuye el hiperinsulinismo. En la intolerancia a la glucosa mejoran la sensibilidad a la insulina. Los efectos colaterales referidos son digestivos, flatulencia y diarrea.

#### **4.10.1.4 Tiazolidinedionas**

Considerados como fármacos insulinosesilizantes o antihiperglucemiantes.

Rosiglitazona y pioglitazona. Se conocen sus antecesores desde los años ochenta. Se identifican como sensibilizadores a la acción de la insulina con efecto en particular a nivel de tejido adiposo y muscular. Se conoce que actúan como factores de transcripción sobre el DNA a través de unos receptores nucleares los PPAR $\gamma$ , abundantes en el adipocito, en menor número en las células musculares y en conjunto con otros factores dan lugar a la expresión genética de varias enzimas que influyen en la diferenciación del adipocito y en el metabolismo de glucosa y de los lípidos. Entre las acciones indeseables se señala el aumento leve de peso, además se recomienda vigilar la función hepática por los efectos negativos de la troglitazona, tiazolidinediona de empleo previo que se retiró del mercado.

#### **4.11. Modelos de SM**

Debido a las altas cifras de mortalidad vinculadas con enfermedades crónico-degenerativas incluidas en el SM, existen en la comunidad de investigación modelos animales que constituyen una herramienta valiosa para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a este padecimiento. Debido al papel fundamental que juega la dieta en los seres humanos, la mayoría de los modelos de enfermedades metabólicas en animales la utilizan como una forma de precipitar su aparición (Sunil K. Panchal and Lindsay Brown, 2011), los animales que se utilizan con más frecuencia son roedores como ratas (cepas Sprague Dawley y Wistar) y ratones de diferentes cepas (A/J, AKR, C57/BL/6), cobayos, hámster sirio dorado dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que

se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático) de estas especies y también por su facilidad de reproducción.

Animales genéticamente modificados.- Gracias a que se conoce el genoma íntegro del ratón, se pueden inducir modificaciones genéticas en los que se logran fenotipos asociados a la obesidad y sus complicaciones, incluidas hipertensión, diabetes y aterosclerosis. Proporcionando datos de suma importancia para la caracterización del síndrome (Hsueh *et al.*, 2007). Sin embargo en éstos modelos las alteraciones se deben a la lesión de un solo factor, lo que no es comparable a la aparición del SM en humanos. Como desventaja, mencionar su obtención más dificultosa y los mayores costes económicos de adquisición y mantenimiento de colonias animales para estudios a largo plazo.

Modificación de la dieta.- Existe evidencia de que la ingesta por 4 a 12 semanas de dieta elaborada con elevada concentración de grasa y azúcares en modelos de roedores promueve la aparición de diversas alteraciones como obesidad central, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial y trastornos del metabolismo de lípidos (Gajda y col., 2007; Catar y col., 2007). Estas alteraciones promueven cambios en el metabolismo de carbohidratos ocasionando un exceso de éstos y de AGL en sangre induciendo disglucemia, dislipidemia, cambios en los patrones de expresión genética e incremento en la generación de ERO.

Por su parte, el exceso en los depósitos de lípidos en el área abdominal induce la producción de ácidos grasos no esterificados a la economía del organismo, así como enzimas pro-inflamatorias, RI y eventualmente hiperglucemia. El exceso del carbohidratos facilita la glucosilación no enzimática de proteínas la cual se intensifica cuando la hiperglucemia se hace crónica acelerando al producción de

productos de glucosilación avanzada (AGEs) favoreciendo la vía de los polioles (en donde la aldosa reductasa modula la conversión de glucosa a sorbitol) y por lo tanto, la generación de ROS (Vincent y Taylor, 2006), que como se ha dicho es un evento importante en la patología vascular.

Entre los posibles modelos animales los ratones de la cepa C57/BL/6 resultan atractivos ya que son más susceptibles a la obesidad. Se comprobado que por ingesta de varios tipos de grasas se obtiene un fenotipo de obesidad e hiperglucemia (Gajada *et al.*, 2007). La modificación en la composición de los lípidos e hidratos de carbono, principalmente grasa saturadas y azúcares simples, de los que la fructosa es muy importante, son los causantes del aumento del tamaño de los adipocitos o cardiomiocitos además del desarrollo y progresión de hipertensión ventricular izquierda además, del aumento de la insulina plasmática e hipertensión crónica (Gjada *et al.*, 2007). Estudios demostraron la posible relación entre el consumo de azucares simples y cardiopatía isquémica y aterosclerosis (Yudkin y Stock., 1970, Sharma *et al.*, 2006). De acuerdo con publicaciones previas, las ratas que son alimentadas con dietas ricas en grasas, elevan la producción de angiotensinógeno, que se ha detectado en tejido adiposo a través de la expresión de RNAm, lo que provoca activación de sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS) con repercusión en la presión arterial (Cassis *et al.*, 1998; Boustrany *et al.*, 2004).

#### **4.11.1. Disfunción endotelial por administración de AGII**

La administración crónica de micro dosis de AGII, produce disfunción endotelial a través de la unión al receptor tipo 1 (AT1-R) originando vasoconstricción,

secreción de aldosterona, fibrosis, estrés oxidante e inflamación, alteraciones que están relacionadas con el desarrollo de aterosclerosis e hipertensión. La AGII induce sus efectos a partir de los siguientes mecanismos (Touyz Berry, 2002; Sedeek *et al.*, 2003; Jian *et al.*; Ferrario *et al.*, 2006, Dandona y col., 2007).1) Incremento de la permeabilidad vascular por agonista del receptor AT1 de AGII, como eicosanoides, leucotrienos, factor de permeabilidad vascular y prostaglandina 12 y E2. 2) Inducción de adhesión de monocitos y neutrófilos al endotelial por medio de selectinas, e inmunoglobulinas, integrinas y citocinas.

#### **4.12. Antecedentes Botánicos**

La zarzaparrilla *Smilax aristolochiifolia* es una planta cuya forma de vida es una liana o bejuco, que crece en bosques primarios y secundarios, (muchos han sido modificados para sombra de cultivo de café). De *S. aristolochiifolia* se utiliza la parte subterránea (rizoma) por sus propiedades medicinales y bebida refrescante que es muy apreciada y comercializada.

La zarzaparrilla *S. aristolochiifolia* es nativa de México y está registrada para el bosque mesófilo de montaña, en los estados de Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz (Calderón y Rzedowski, 1994).

La palabra zarzaparrilla, según el diccionario de la lengua española (Martínez, 1999) se registra entre 1570 y 1580, y viene de *zarza* – rama o arbusto, *parrilla* de parra de vino y el diminutivo sufijo *illa*, que significa “parra pequeña”. El nombre se debe a la similitud entre los frutos de la uva; *S. aristolochiifolia* y el hecho de tratarse de una enredadera. El diccionario reconoce como zarzaparrilla a varias plantas de América tropical que crecen en las montañas del género *Smilax*, de la

que extrae un extracto de la raíz, señalan que con él, preparan una bebida denominada cerveza de raíz adicionada con azúcares.

#### **4.12.1. Taxonomía**

Según registros del Missouri Botanical Garden para los trópicos (MOBOT 2010), *Smilax aristolochiifolia* fue descrita por Miller, P., en 1768. Según el mismo MOBOT (2010) esta especie registra sinonimia con: *Smilax kerberi* Apt, *Smilax medica* M. Martens & Galeotti, *Smilax medica* Schlecht. & Cham, *Smilax medica* var. *Bracteata* A. DC., *Smilax milleri* Steud, *Smilax ornata* Lem.

**Zarzaparrilla** *Smilax aristolochiifolia* Miller

Liliaceae

#### **Sinonimia popular**

San Luis Potosí: t'oknal ts'aah (tenek)

#### **Sinonimia botánica**

*Smilax medica* Schlechtendal & Cham., *Smilax ornata* Lem

#### **4.13. Botánica y Ecología**

Planta con los tallos cuadrados. Las hojas son más anchas que largas. Son redondeadas en la punta. Los frutos son redondos y de color rojo.

Originaria de México a Honduras. Habita en climas cálido, semicálido y templado entre los 740 y los 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino.



#### 4.14. Antecedentes etnobotánicos.

Las propiedades medicinales que popularmente se le atribuyen son: resolver trastornos ginecológicos, como dolores menstruales (Puebla) y la sífilis (Michoacán y Veracruz). También se emplea en enfermedades gastrointestinales. Otros usos medicinales de esta planta son: contra pulmonía fulminante, reumatismo, tumores, para purificar la sangre y curar llagas.

En el siglo XX, Maximino Martínez señala los usos siguientes: contra abuso de preparaciones mercuriales, como depurativo, contra dermatosis, como diaforético; para aliviar de eczema y lepra.

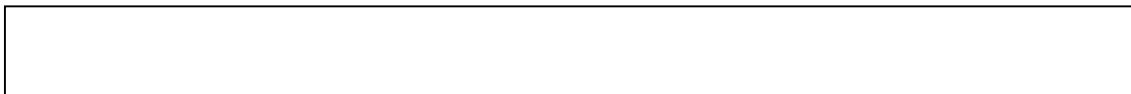
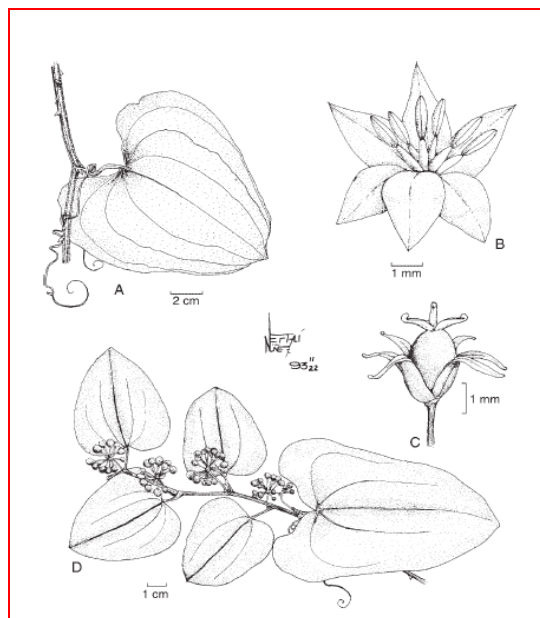
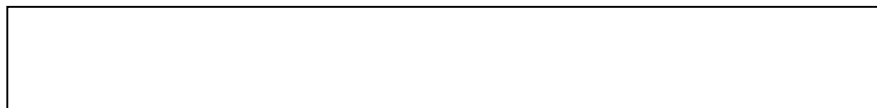
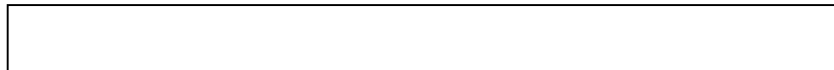


Figura 3. *Smilax aristolochifolia* Miller, Finken. 1893. México.  
MOBOT 2010  
Figura 3. *Smilax aristolochifolia* Miller presente en el herbario (No. col. 2473) del Instituto de Ecología A.C. (INECOL)





**Sitios donde desarrolla la zarzaparrilla *Smilax aristolochiifolia*.**

En la localidad de Monte Blanco en el municipio de Teocelo, Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave. Que cuenta con 1720 habitantes y se encuentra situado geográficamente a 19° 23' 08" de latitud norte, 95° 54' 47" de longitud oeste a 980 msnm. (Fig. 5). Esta planta se encuentra resguardada en barrancas asociadas muy comúnmente con cultivo y árboles de sombra, y se desarrolla en terrenos arcillosos y arenosos pudiendo ser estos planos o con algún grado de inclinación.

Los extractores mencionan que después de la barranca de Monte Blanco, Río Infiernillo, hacia el este (Costa del Golfo), una vez en tierra caliente, no encuentran la planta, toman como línea límite, "atrás de la barranca, hacia Tuzamapan, municipio de Coatepec a 880 msnm". Los terrenos donde extraen la planta se encuentran en el ejido Boquerón y finalizando en los linderos de Jalcomulco. Los

parámetros ambientales, suelo, clima determinan la distribución de *S. aristolochiifolia*, se estima su presencia en una cota altitudinal entre 800 a 1500 msnm en microclimas o refugios para la planta, requiere suelo húmedo, soporte de árboles o arbustos, protección de vientos, es una liana o bejuco.

Un estimado de distribución, considera que la mayor altura de la región, el Cofre de Perote, se encuentra a 4,100 msnm, y la localidad de Monte Blanco, se encuentra a 860 msnm, es importante determinar que en las barrancas, se encuentran cafetales cultivados y en algunas partes más inaccesibles selva mediana caducifolia con en ecotono con bosque mesófilo de montaña, entre 800 a 1500 msnm. En su mayoría en estado sucesional (acahual).

### Reconocimiento de especies asociadas

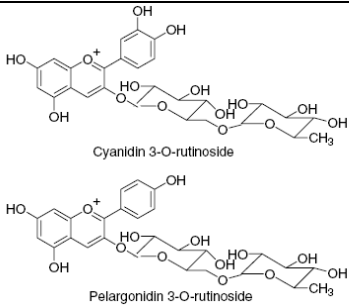
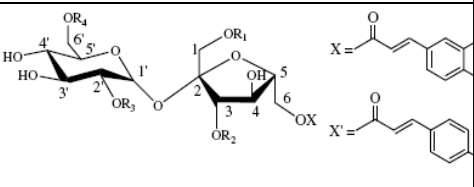
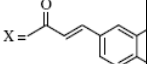
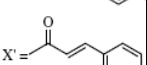
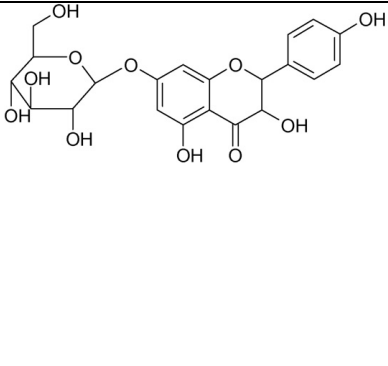
Las especies asociadas a *Smilax aristolochiifolia* son: el café, el palo mulato entre otros como se observa en el Tabla 3.

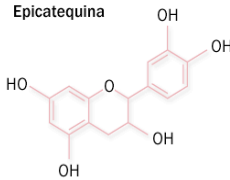
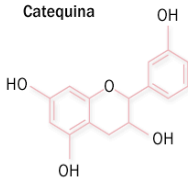
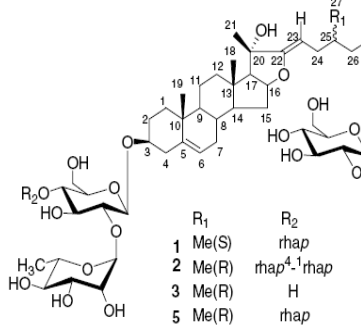
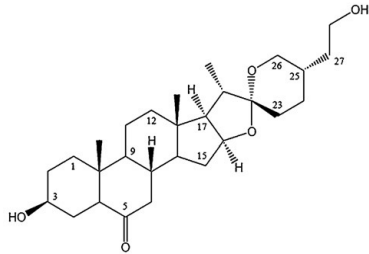
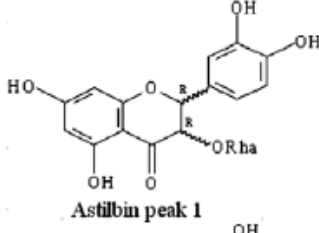
Nombre común	Nombre científico
Café	<i>Coffea arabica</i> L.
Palo mulato	<i>Bursera simaruba</i> (L)
Palma camedor	<i>Chamaedorea elegans</i> (Mart)
Chalahuite	<i>Inga spuna</i> (Humb)
Palo gusano	<i>Lonchocarpus guatemaltensis</i> (Berth)
Guarumbo	<i>Cecropia obtusifolia</i> (Bertol)
Capulin	<i>Prunus serótina</i> (Cav)
Mango	<i>Mangifera indica</i> (L)

#### 4.15. Antecedentes farmacológicos

En el género *Smilax* se han caracterizado compuestos con efecto antiinflamatorio y antioxidante que han demostrado además contrarrestar los daños asociados al estrés oxidante, particularmente la especie *Smilax china* Tabla 4. En México, Andrade-Cetto reporta efecto hipoglucémico para la *Smilax aristolochiifolia* (Andrade-Cetto 2005), sin embargo no se cuenta al momento con estudios farmacológicos ni fitoquímicos de esta especie.

**Tabla 4.** Estudios fitoquímicos y farmacológicos de algunas especies del género *Smilax*.

<b><i>Smilax aspera</i></b>	Flavonoide	 <p>Cyanidin 3-O-rutinoside</p> <p>Pelargonidin 3-O-rutinoside</p>	<b>Antocianinas</b> Inhibidores de la ECA, Diuréticos, antioxidantes. (Longo y Vesapollo, 2004)
<b><i>Smilax bracteata</i></b>	Fenilpropa- noides	 <p>X = </p> <p>X' = </p>	<b>Smilasides</b> Antioxidantes (Zhang <i>et al</i> , 2008 y Kuo <i>et al.</i> , 2005).
<b><i>Smilax china</i></b>	Flavonol		<b>(Kaemperol)</b> Hipouricemia Protección contra daño endotelial Antiinflamatorio Antioxidante Inhibidor de ECA (Li Li <i>et al.</i> , 2007)

<p><b>Smilax china</b></p>	<p>Flavanoles</p>	<p>Epicatequina  Catequina </p>	<p><b>Catequina y epicatequina</b>          Protección contra <math>\beta</math>-amiloide          Antioxidantes.          (Ban <i>et al.</i>, 2006)</p>
<p><b>Smilax china</b></p>	<p>Saponinas esteroidales</p>	<p></p> <p>R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>          1 Me(S) rhap          2 Me(R) rhap<sup>4-1</sup>rhap          3 Me(R) H          5 Me(R) rhap</p>	<p><b>26-o-B-D-glucopyranosyl-3.</b>          Antiinflamatorio          Citotóxica          Hipocolesterolemica          Hipoglicémica          Anticoagulante          Neuroprotector          Antioxidante.          (Shao <i>et al.</i>, 2007)</p>
<p><b>Smilax china</b></p>	<p>Triterpeno</p>	<p></p>	<p><b>Sieboldogenin a.</b>          Antiinflamatorio.          (Khan <i>et al.</i>, 2009)</p>
<p><b>Smilax glabra</b></p>	<p>Flavanona</p>	<p></p> <p>Astilbin peak 1</p>	<p><b>Astilbin.</b>          Antioxidante.          (Zhang <i>et al.</i>, 2009)</p>

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México mueren más de 130 mil personas al año como consecuencia del Síndrome metabólico, la gran mayoría de estas fatalidades se relacionaron con las alteraciones vasculares que surgen de la disfunción endotelial derivada del daño orgánico, debido al proceso inflamatorio y estrés oxidante crónico asociado a las enfermedades incluidas dentro del SM. La sobre-estimulación de RAAS con la consecuente elevación de los niveles de AG II, la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la elevación plasmática de LDL<sub>ox</sub>, son el origen multifactorial de las complicaciones vasculares y deterioro orgánico generalizado. En la actualidad, no existe un tratamiento farmacológico integral para el manejo del SM, por tanto se requieren alternativas terapéuticas que incidan en el origen multifactorial de las alteraciones vasculares que derivan del síndrome mencionado.

Los fitomedicamentos son una alternativa real para el tratamiento del SM, ya que desde su definición en la ley general de Salud de 1998, ¿se caracterizan por el uso de un extracto vegetal?, el cual contiene una mezcla de compuestos que puede modificar la evolución y las complicaciones de SM. En el género *Smilax* se han caracterizado compuestos con efecto antiinflamatorio y antioxidante que han demostrado además contrarrestar los daños asociados al estrés oxidante, particularmente la especie *Smilax china*. En México, *Smilax aristolochiifolia* tiene antecedentes de uso empírico como hipoglucemiante (Andrade-Cetto., 2005). Diurético (Rodríguez., 2010). Sin embargo no se cuenta al momento con estudios farmacológicos ni fitoquímicos. Por lo anterior expuesto, el extracto de *Smilax*

*aristolochiifolia*, ¿es capaz de contrarrestar los efectos de daño orgánico derivados del proceso inflamatorio y el estrés oxidante, que se asocian a las alteraciones vasculares que se presentan en los padecimientos incluidos dentro del síndrome metabólico?

Si esto es cierto.

¿Cuál es el compuesto o los compuestos responsables del efecto?

## **6. HIPÓTESIS**

*Smilax aristolochiifolia* contiene sustancias activas como fenilpropanoides capaces de contrarrestar las alteraciones vasculares derivadas del proceso inflamatorio y estrés oxidante asociadas al daño orgánico provocado por el síndrome metabólico.



## 7. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar el efecto farmacológico del extracto acetónico y fracciones de la especie vegetal *Smilax aristolochiifolia* Mill, sobre las alteraciones vasculares derivadas del estado inflamatorio y oxidante que se presentan en el síndrome metabólico.

### 7.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7.10.1. Establecer el procedimiento de extracción acetónica y fraccionamiento cromatográfico de la raíz de *Smilax aristolochiifolia* Mill.
- 7.10.2. Evaluar la actividad farmacológica del extracto acétonico de *Smilax aristolochiifolia* Mill y de sus fracciones en un modelo de síndrome metabólico en ratones y establecer la caracterización química de la fracción activa.
- 7.10.3. Realizar la caracterización química de la fracción activa del extracto.
- 7.10.4. Definir la estandarización del extracto mencionado a partir de la cuantificación del compuesto activo.

## **8. MATERIAL Y MÉTODO**

### **8.1. Material vegetal**

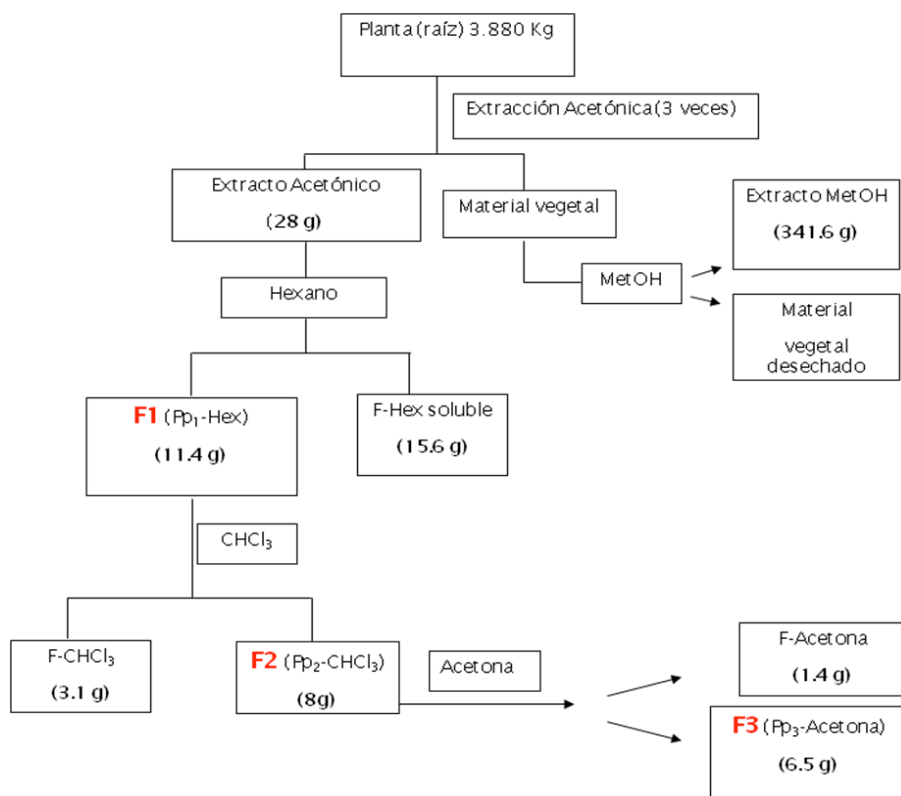
La especie vegetal *Smilax aristolochiifolia*, (la raíz) fue colectada en el municipio de Teocelo, Veracruz (19°23'02.20" de latitud norte y 96°56'09.60" de longitud oeste con 1,773 msnm) e identificada por la Biol. Margarita Avilés del Herbario INAH-Morelos, con número de registro 2053.

### **8.2. Obtención de los extractos (metanólico y acetónico)**

La raíz de *Smilax aristolochiifolia*, fue secada a temperatura ambiente bajo oscuridad. El material seco (3.800 kg) fue molido (molino marca Pulve plastic, EUA) hasta obtener partículas < 4 mm, al cual se le agregó acetona (3 L), esto se repitió dos veces, y se dejó reposar durante 24 horas a 25° C. Después de este tiempo, el líquido fue filtrado con papel whatman No.40 y concentrado en un equipo Heidolph Laborota 4000 a presión reducida, obteniendo un extracto de acetona (Ace-Sa), que fue liofilizado en un equipo Heto DRYWINNER. Este mismo material vegetal fue secado a temperatura ambiente, para posteriormente agregarle metanol (3 L) dejando reposar 24 horas. El líquido filtrado, fue llevado a sequedad con el equipo de rotaevaporador antes mencionado, obteniendo un extracto metanólico (MeOH-Sa), (Figura 6).

### 8.3. Fraccionamiento químico del extracto acetónico

En la Figura 6 se muestra el fraccionamiento del extracto de acetona (Ace-Sa). A este extracto se le agregó hexano (3 L) y se colocó en agitación por 3 horas, transcurrido el tiempo el líquido se filtró con papel whatman No. 40 y se llevó a sequedad obteniendo la fracción soluble en hexano (F-Hexano) y el precipitado insoluble, a este último se le agregó cloroformo (1.2 L) y se agitó durante 3 horas, nuevamente se filtró y concentró el líquido, obteniendo una fracción clorofórmica (F-cloroformo) y un precipitado al que se le denominó (F1), a este último se le adicionó acetona (2 L), realizándose la metodología ante mencionada, obteniéndose una fracción soluble la cual se denominó (F-Acetona o F2) y un precipitado insoluble denominado (F3).



**Figura 6.** Esquema del fraccionamiento químico de *Smilax aristolochiifolia*.

Las fracciones F1 y F3 no fueron analizadas. La fracción F2 fue separada por cromatografía en columna (345 g sílica gel 90 x 600 mm, Merck), eluyendo con diclorometano e incrementando la polaridad con 5% de acetona, colectando volúmenes de 250 ml cada una, obteniendo 115 fracciones. La separación fue monitoreada por cromatografía capa fina (CCF) y fueron reunidas de acuerdo a la similitud en polaridad de los compuestos, obteniéndose 68 fracciones; Zar1-5 (100:0, 32gr), Zar6-10 (95:5), Zar11-17 (90:10), Zar18-22 (85:15), Zar23-27 (80:20), Zar28-31 (75:25), Zar32-35 (70:30), Zar36-40 (65:35), Zar41-45 (60:40), Zar46-45 (55:45), Zar51-54 (50:50), Zar55-60 (45:55), Zar61-64 (40:60), Zar65-68 (35:65). En la fracción Zar18-22 (5 g) se observó un precipitado amarillo (Fig. 19) por el cual se decidió realizar su purificación por cromatografía en columna (60 g sílica gel 70 x 230 mm, Merck), eluyendo con diclorometano e incrementando la polaridad con 5% de acetona, colectando 42 fracciones (200ml), las cuales fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF), y reunidas de acuerdo a la similitud en polaridad de los compuestos, obteniéndose finalmente 9 fracciones. Zarzacaba1 (1-6, 100:0), Zarzacaba2 (7-8, 95:5), Zarzacaba3 (9-10, 90:10), Zarzacaba4 (11, 85:15), Zarzacaba5 (12, 80:20), Zarzacaba6 (13-16, 75:25), Zarzacaba7 (17-28, 70:30), Zarzacaba8 (29-35, 60:40), Zarzacaba9 (36-42, 55:45) Las fracciones zarzacabaF5 y 6 fueron reunidas (450 mg) y fueron sometidas a un proceso de separación nuevamente por cromatografía iniciando con diclorometano: metanol (99:1) y con un aumento la polaridad de 5% con metanol, colectándose volúmenes de 20 ml, obteniendo 17 fracciones.

En la fracción ZarcabaF2A se observaron cristales amorfos, los cuales fueron precipitados con acetona y posteriormente enviados a análisis de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  uni y bi dimensional.

#### **8.4. Condiciones generales**

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se hicieron en un equipo Varian INOVA-400 a 400 MHz y 50 MHz para  $^{13}\text{C}$ , se realizaron experimentos en dos dimensiones (COSY, HSQC y HMBC), siendo soluble la muestra en metanol deuterado. Los desplazamientos químicos son reportados en ppm con control interno Tetrametilsilano (TMS). El espectrómetro de masas se obtuvo en un equipo marca Hewlett Packard 5985-B y JOEL-AX 505 HA. El punto de fusión se determinó en un equipo marca Termo Scientific IA 1900.

#### **8.5. Cuantificación por HPLC**

La fracción zarzacabaF2A (cristales) fue inyectada en el HPLC para la identificación de los compuestos, así como la realización de la curva de calibración. Las lecturas se realizaron a 340 nm, de absorción. Para su análisis se empleó el equipo Waters 996, con bombas binarias (2695), acoplado a un detector de arreglo de diodos (2996) con un rango de detección de 190 a 600 nm y operado por el sistema Millennium System Manager Software. (Empower1).



**Figura 7.** Equipo de HPLC Waters 996.

#### **8.6. Curva de calibración de la fracción Zarzacaba F2A**

Se disolvieron 3 mg de la fracción Zarzacaba F2A en 1 ml de metanol y se filtró la muestra con una membrana Millipore de 0.45µm, antes de la inyección. Se prepararon concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 mg de la fracción. Para cada concentración de ambos compuestos, se realizaron lecturas a 340 nm. Con los promedios de tres mediciones de cada AUC se obtuvieron las ecuaciones de la recta.

La cuantificación del extracto acetónico y las fracciones se llevó a cabo por HPLC, utilizando una columna Spherisorb RP-18 (250 x 4 mm, Waters), a 25°C, con un sistema de elusión por gradientes con ácido trifluoroacético al 0.5% y una mezcla de Acetonitrilo:Metanol (100:0) con un tiempo total de 28 minutos a un flujo constante de 1ml/min.

**Tabla 5.** Gradientes de HPLC.

Tiempo (Minutos)	%A (Ácido trifluoroacético al 5%)	% B Mezcla de acetonitrilo:metanol (1:1)
1.00	100	0
2-4	90	10
5-7	80	20
8-14	70	30
15-18	60	40
19-22	20	80
23-26	0.0	100
27-28	100.0	0.0







## 8.7. Animales

### Animales y dieta hipercalórica

Se utilizaron 110 ratones macho de la cepa C57/BL/6 los cuales se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 3$  °C,  $70\% \pm 5\%$  de humedad, con ciclos con un ciclo de 12 h luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales se apegaron a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y el uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (Gajda e al., 2007). El protocolo experimental fue autorizada por el Comité Local de Investigación en Salud (IMSS), con número de registro: (R-2010-1701-41). Recién destetados fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos de tratamiento (n=10): Grupo 1: Testigo dieta estándar para roedores (2028S, 18 % Protein Rodent Diet Harland Tekland), Grupo 2: Dieta Hipercalórica (DHC) (60% grasa, 40% fructosa, 20% proteína); misma que fue

elaborada en nuestro laboratorio. (CIBIS-IMSS), Grupo 3: DHC+AGII (0.1 µg/Kg), Grupo 4: DHC+AGII+Pioglitazona+Telmisartán (10 mg/kg), Grupo 5: DHC+AGII+Ace-Sa (25 mg/kg), Grupo 6: DHC+AGII+F1 (25 mg/kg), Grupo 7: DHC+AGII+F2 (10 mg/kg), Grupo 8: DHC+AGII+F3 (25 mg/kg). El tratamiento duró veinte semanas, los grupos 3 a 5 recibieron DHC (por 10 semanas) y la administración i.p. de AGII, además de los diferentes tratamientos v.o. El peso de los animales y el consumo de alimento se monitorearon una vez por semana, y al final del experimento las siguientes variables: peso, curva de tolerancia a la insulina, triglicéridos, presión arterial, glucosa en ayuno, densidad corporal y determinación de citocinas en riñón y tejido adiposo.

**Figura 8.** Diferentes grupos de tratamiento.

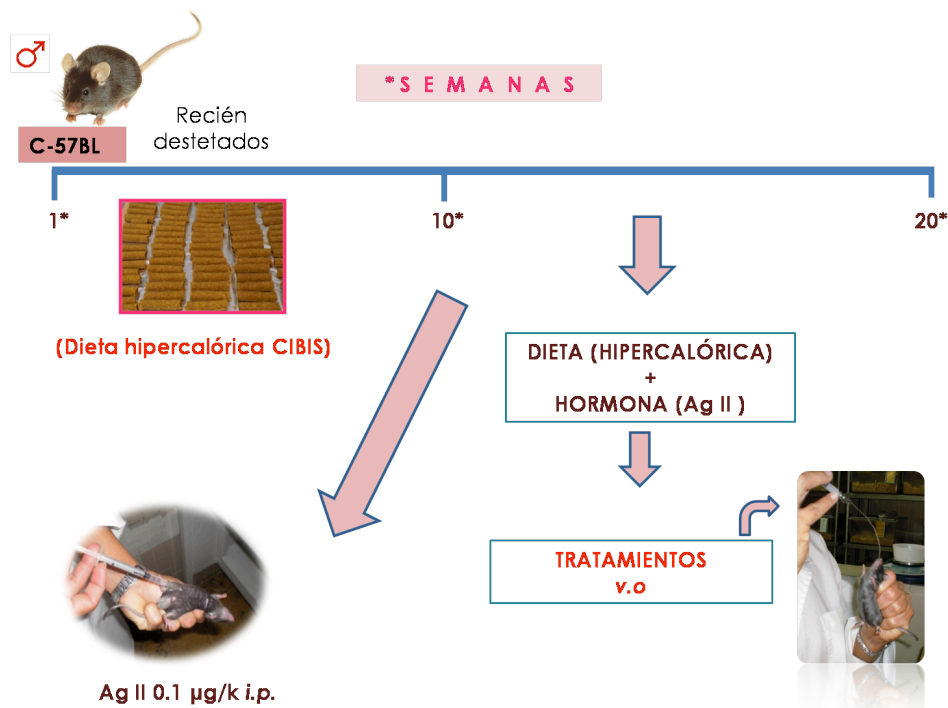
♂ GRUPOS n=10 	DIETA 	AGII (0.1 µg/kg) 	EXTRACTO O FRACCIÓN 	PIOGLITAZONA Y TELMISARTÁN 
1) Testigo	 Dieta Normal	x	x	x
2) Control I	DHC*	x	x	x
3) Control II	DHC	√	x	x
4) Control (+)	DHC	√	x	Pio + Telmi (10 mg/kg)
5) Experimental (1)	DHC	√	Exto. Acet Sa (25 mg/kg)	x
6) Experimental (2)	DHC	√	F-1 (25 mg/kg)	x
7) Experimental (3)	DHC	√	F-2 (10 mg/kg)	x
8) Experimental (4)	DHC	√	F-3 (25 mg/kg)	x

⊙Dieta normal (2018S, 18% Protein normal Rodent Diet Harland Tekland)

\* (Dieta hipercalórica CIBIS= 20% Proteína, 22% Carbohidratos, 30% Grasa)



**Figura 9.** Forma de administración de los distintos tratamientos.



### 8.8. Perfil nutricional, metabólico y endocrino de los animales

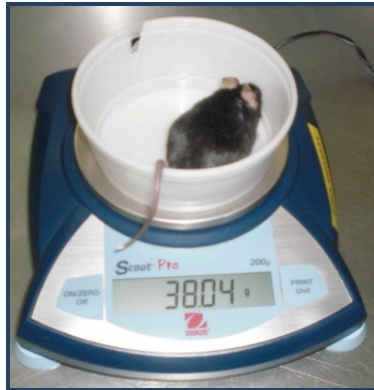
Para analizar si la obesidad inducida por dieta rica en grasa estaba asociada a las alteraciones en el comportamiento nutricional, el consumo de alimento fue medido diariamente. En una balanza mecánica de tres brazos marca OHAUS se pesó la comida una vez por semana (Figura 10) y se calculó el promedio para determinar el consumo por día por ratón.



**Figura 10.** Determinación del consumo de la dieta.

### 8.9. Determinación del peso

En una balanza electrónica portátil marca OHAUS se peso cada ratón 1 vez por semana (figura 11).



**Figura 11.** Peso de los animales

### 8.10. Medición de la presión arterial

Después de las 20 semanas de tratamiento por un método no invasivo se midió la presión arterial de los animales administrados con los diferentes tratamientos, con un aparato marca LE 5002 STORAGE PRESSURE METER LETICA; por grupo de tratamiento fueron sedados con una dosis muy baja de pentobarbital (10 mg/kg i.p.), posteriormente se precalentaron a  $35 \pm 2$  °C por 5 minutos y con ayuda de un anillo insuflador colocado en la base de la cola de los ratones, el dispositivo se encuentra unido a un transductor de pulso (Biopac System MP150). Mismo que registra la presión sistólica y diastólica y lo sistematiza para su análisis en un programa de cómputo. Por ratón se registró el promedio de 10 medidas consecutivas y estables (con una diferencia de 1 minuto), obteniendo un promedio para reporte de la PAS y la PAD en cada caso.



**Figura 12.** Determinación de la TA

### **8.11. Curva de tolerancia a la insulina**

Al final del tratamiento se realizó la curva de tolerancia a la insulina de los animales administrados durante las 20 semanas con los diferentes tratamientos, sin ayuno se obtuvieron de la vena caudal 5  $\mu$ L de sangre, cuantificando glucosa (mg/dl) utilizando un glucómetro marca Contour TS de Bayer después de obtener el valor, se aplicó insulina rápida (Humulin R de Lilly) vía i.p. a una dosis de 0.1 U/kg de peso, cuantificando glucosa de la forma ya descrita a los 15, 30, 60, 120 minutos posteriores a su aplicación. Con los datos obtenidos se construyó la curva de respuesta y se calculó el área bajo la curva generada.

### 8.12. Determinación de glucosa en ayuno

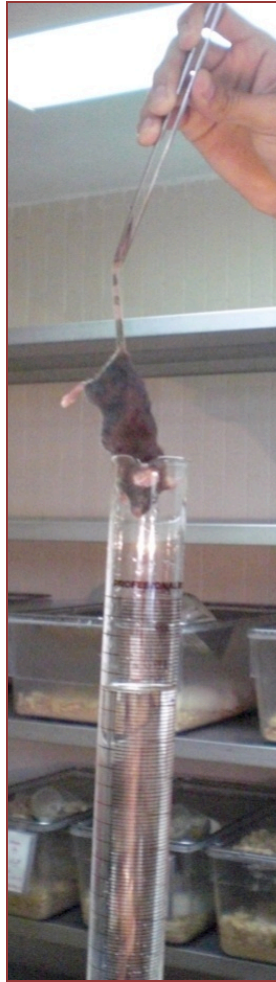
Al final del experimento se determinó los niveles de glucosa de los animales administrados con los diferentes tratamientos, previo ayuno de 12 horas, se obtuvieron de la vena caudal, una muestra de sangre 5  $\mu$ L, cuantificando la glucosa (mg/dl), utilizando un glucómetro marca Contour® TS Bayer.



**Figura 13.** Determinación de glucosa

### 8.13. Índice de adiposidad

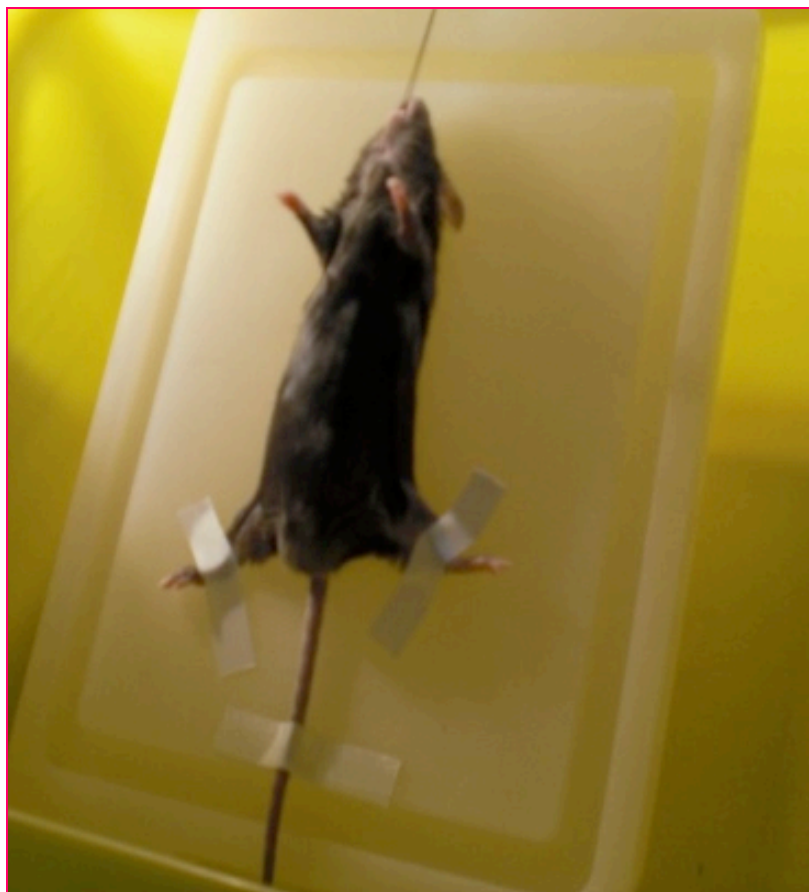
Al finalizar las 20 semanas de tratamiento, se introdujo individualmente a los ratones, bajo anestesia profunda por administración de pentobarbital (50 mg/kg i.p.), en una probeta de 250 ml llenada con agua corriente a un volumen de 180 ml. Se sujetó a los ratones del extremo de la cola (figura 14), se introdujeron durante 4 segundos en la probeta y se midió el volumen desplazado. La densidad corporal se calculó dividiendo el peso del animal entre el volumen desplazado.



**Figura 14.** Evaluación de la densidad corporal

#### **8.14. Eutanasia**

Después de las 20 semanas de tratamiento los ratones fueron anestesiados profundamente y todavía bajo el efecto de la anestesia quirúrgica i.p. con pentobarbital sódico a una dosis de (40 mg/kg), se obtuvieron rápidamente muestras de sangre (1ml) del seno infraorbitario de cada ratón. El plasma se obtuvo por centrifugación (120g por 15 minutos), a temperatura ambiente, posteriormente las muestras rotuladas se almacenaron individualmente a -10 o -70° C, para las diferentes determinaciones.



**Figura15.** Posición supina.

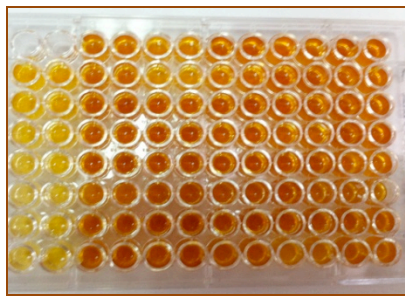
### **8.15. Determinación de los triglicéridos en plasma**

Los triglicéridos fueron determinados en plasma de los ratones, por el ensayo enzimático colorimétrico utilizando el KIT Colestat enzimático AA y TG Color GPO/PAP AA., marca Wiener lab, según las recomendaciones del proveedor. Las placas se leyeron en un lector de ELISA (Awareness Technology INC) Modelo Stat Fax-2100 y se registró la absorbencia de las muestra a 492 nm.

Estándar: solución de glicerol 2.26 mmol/l (equivalente a 2g/l de trioleína).

Reactivo: Solución amortiguadora (pH 6.8), clorofenol, lipoproteína lipasa (LPL), glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina

trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF). 1) En una placa multipozos (12X 8) se colocaron 250  $\mu$ l de reactivo en cada pozo, con excepción del A1 al que se añadió únicamente H<sub>2</sub>O. 2) En el pozo B1 no se colocó muestra alguna (Blanco). En el C1 se colocaron 5  $\mu$ l de suero estándar. 3) Los demás pozos fueron llenados con 5  $\mu$ l de muestra correspondiente. 4) Se agitó suavemente durante 50 segundos. 5) Se incubó a 37°C por 5 minutos. 6) Se determinó la absorbancia de la mezcla con un lector de ELISA (Stat Fa-2100) a 492 nanómetros. 7) Según la absorbancia correspondiente al pozo C1 cuya concentración corresponde a 2g/l se elabora una relación con la absorbancia de las muestras experimentales.



**Figura.16.** Determinación de triglicéridos

Determinación por citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  por un ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

- 1.- Se incubó el anticuerpo de detección toda la noche a 4°C.
- 2.- Se lavó por tres ocasiones con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) o carbonato Tween 20 al 0.05%.
- 3.- Se incubó nuevamente con PBS más suero fetal bobino (SFB) durante una hora a temperatura ambiente.
- 4.- Se lavó 3 veces (PBS mas Tween 20 al 0.05%).



5.- Estándar y muestras: para el caso del estándar IL6 y TNF- $\alpha$  se colocaron 1000 pg/ml y se realizaron diluciones para construir la curva estándar (1000, 500, 250, 125, 65.5, 31.2 y 15.6 pg/ml) y en el caso de la IL-10 se colocaron 2000 pg/ml con sus respectivas diluciones (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2 pg/ml).

Muestras: En el caso de IL-10, IL-4 y TNF- $\alpha$  se colocaron 50  $\mu$ l de muestras en cada pozo y 75  $\mu$ l para IL-6.

6.- Se lavó 5 veces (PBS + Tween 20 a 0.5 %)

7.- Incubación con anticuerpo de detección: en el caso de IL-6 e IL-10 (40  $\mu$ l de AC (anticuerpo) + 40 de Enzima) y para TNF- $\alpha$  (20  $\mu$ l de AC+ 40  $\mu$ l de enzima) durante una hora.

8.- Se lavó 7 veces (PBS mas Tween 20 a 0.5%).

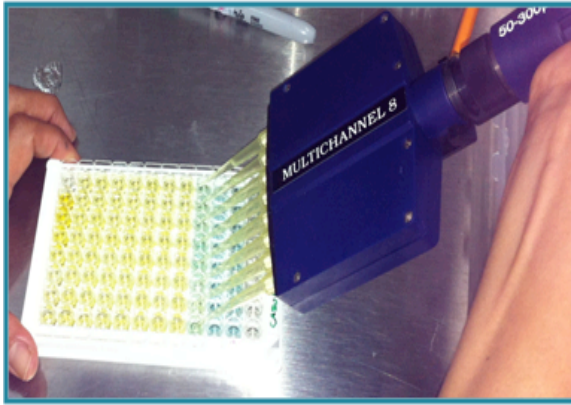
9.- Se incubó con 200  $\mu$ l de OPD (paro de reacción con Ac. Fluorhídrico) durante 30 minutos en ausencia de luz.

10.- Finalmente se leyó la placa en un lector de ELISA (Stat fax-2100) a 37°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25
B	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18	25
C	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19	25
D	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20	26
E	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21	26
F	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22	26
G	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23	Blk
H	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24	Blk

**Figura 17.** Disposición de muestras, cuantificación de citocinas por la técnica de ELISA. Blk: blanco, S1-S8: Estándar 1-8; 1-26: muestra.





**Figura 18.** Determinación de citocinas

### **8.16. Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$ ESM y fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA) con una post-prueba de Tukey, ( $*p < 0.05$ ).

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1. Fitoquímica

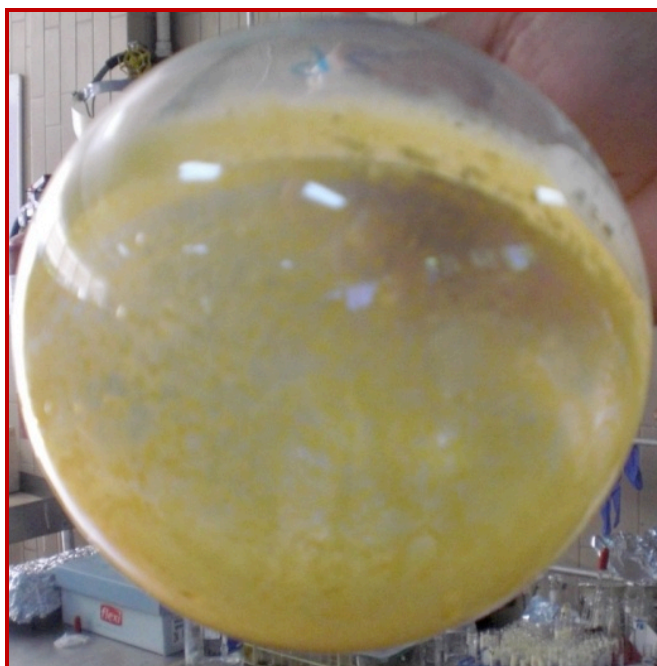
El aislamiento de los metabolitos presentes en el extracto Acetónico, se llevó a cabo por el fraccionamiento cromatográfico de la fracción F2 obtenida de una serie de particiones (Resumen del fraccionamiento Tabla 6).

**Tabla 6.** Resumen cromatográfico del extracto acetónico de la raíz de *Smilax aristolochiifolia*.

Número de la fracción	Clave de las fracciones	Sistema de Elución Diclorometano:Acetona
1-2	Zarzacaba-1	100:0
3	Zarzacaba-2	100:0
4-8	Zarzacaba-3	100:0
9	Zarzacaba-4	100:0
10-11	Zarzacaba-5	95:55
12-21	Zarzacaba-6-10	95:55
22	Zarzacaba-11	90:10
23-30	Zarzacaba-12-14	90:10
31-39	Zarzacaba-15-17	90:10
40-45	<b>Zarzacaba-18-22 Col(2)</b>	90:10
46-49	Zarzacaba-23-26	85:15
50-52	Zarzacaba-27-29	85:15
53	Zarzacaba-30	85:15
54	Zarzacaba-31	85:15
55	Zarzacaba-32	85:15
56-64	Zarzacaba-33-34	80:20
65-67	Zarzacaba-35-36	80:20
68-70	Zarzacaba-37	80:20
71-72	Zarzacaba-38	75:25
73-74	Zarzacaba-39	75:25
75	Zarzacaba-40	75:25
76-79	Zarzacaba-41-42	70:30
80-84	Zarzacaba-43-45	70:30
85-88	Zarzacaba-46-47	70:30

89-92	Zarzacaba-48-51	60:40
93-95	Zarzacaba-52-54	60:40
96-97	Zarzacaba-55-56	60:40
98-104	Faltó	55:45
105-109	Zarzacaba-60-62	55:45
110-115	Zarzacaba-63-68	55:45

Del fraccionamiento anterior, se encontró un precipitado amarillo en la Zarcaba 18-22, Fraccionamiento que nuevamente se sometió a purificación. Figura 19.



**Figura 19.** Precipitado amarillo de la Zarzacaba18-22.

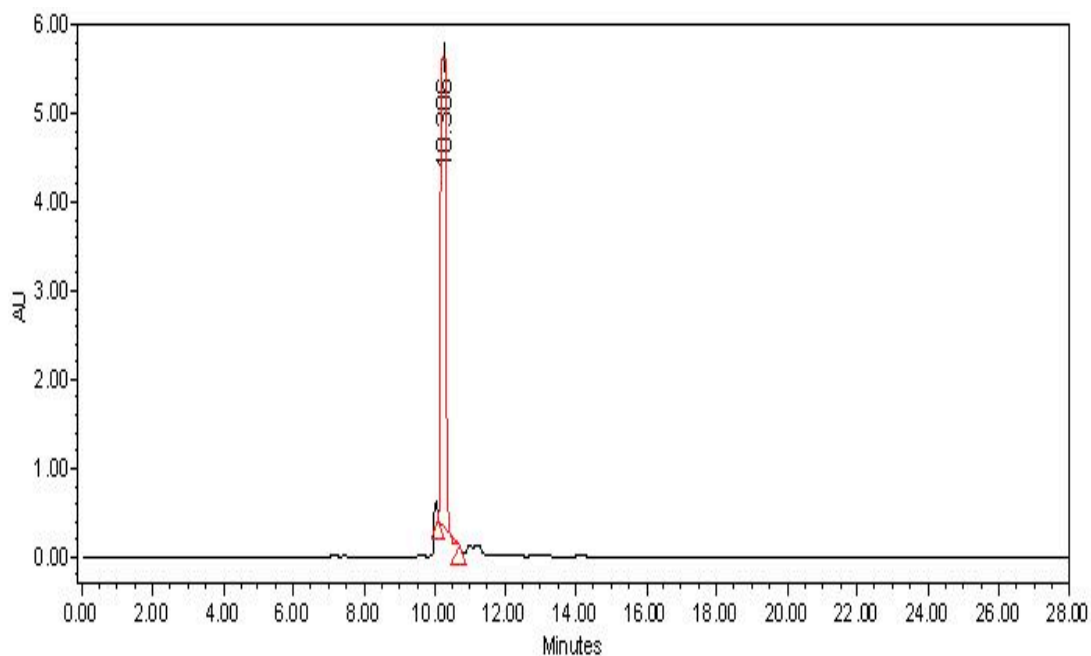
A través de una serie de separaciones cromatográficas de esta fracción, Tablas 6 y 7, se obtuvo una sola mancha en CCF en la fracción ZarzacabaF5 y 6, en donde se observó un sólido amarillo, el cual presentó un factor de referencia de (0.75) y un tiempo de retención de (10.86) en el cromatograma (Figura 20) de CLAR (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Este compuesto se envió para su análisis a través de RMN una y dos dimensiones.

**Tabla 7.** Resumen del fraccionamiento de Zar-18-22 Col (2).

Número de la fracción	Clave de las fracciones	Sistema de Elución Diclorometano:Acetona
1-6	ZarcabaF <sub>2</sub> -1	100:0
7-8	ZarcabaF <sub>2</sub> -2	95:55
9-10	ZarcabaF <sub>2</sub> -3	90:10
11	ZarcabaF <sub>2</sub> -4	85:15
12	ZarcabaF <sub>2</sub> -5	80:20
13-16	ZarcabaF <sub>2</sub> -6	75:25
17-28	ZarcabaF <sub>2</sub> -7	70:30
29-35	ZarcabaF <sub>2</sub> -8	60:40
36-42	ZarcabaF <sub>2</sub> -9	55:45

**Tabla 8.** Resumen del fraccionamiento de Zarzacaba F5 y 6 Col (3).

Número de la fracción	Clave de las fracciones	Sistema de Elución Diclorometano:Acetona
1-3	ZarzacabaF <sub>2</sub> -A	100:0
3-6	ZarzacabaF <sub>2</sub> -B	95:5
7-12	ZarzacabaF <sub>2</sub> -C	90:10
12-15	ZarzacabaF <sub>2</sub> -D	85:5
12	ZarzacabaF <sub>2</sub> -E	80:20
16-17	ZarzacabaF <sub>2</sub> -F	75:25



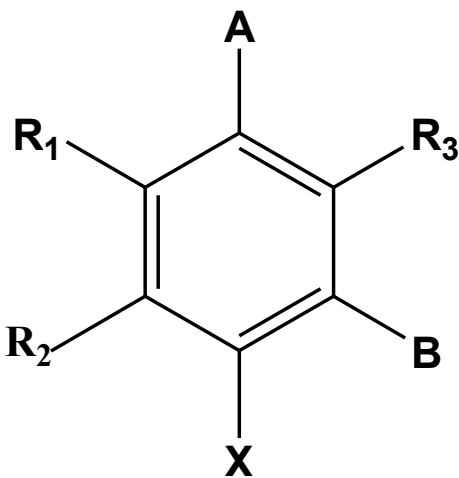
**Figura 20.** Cromatograma de HPLC del N-*trans*-feruloil-tiramina.

## 9.2. Caracterización química del compuesto aislado

Caracterización química.

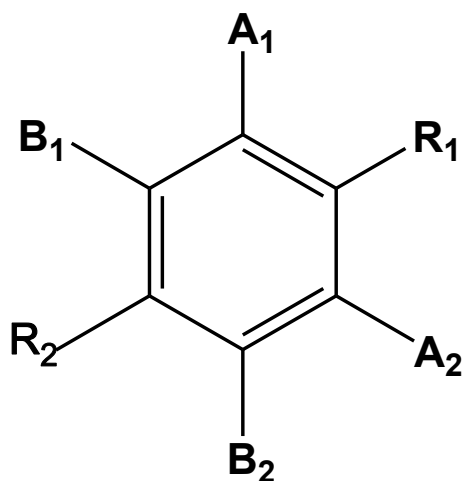
El fraccionamiento cromatográfico del F2, nos permitió obtener el compuesto (1) como un precipitado amarillo, soluble en metanol con un punto de fusión de 74-75°C. En el espectro de luz UV, el compuesto mostró absorciones de 220, 293 y 318 nm. El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró cuatro sistemas de acoplamientos:

- 1) Un sistema aromático ABX [ $\delta$  7.10 ( 1H, d,  $J=2$  Hz ), 6.79 (1H, d,  $J=8.2$  Hz) y 7.0 (1H, dd,  $J=2, 8.2$  Hz)] asignado un H-2, H-5 y H-6, respectivamente;



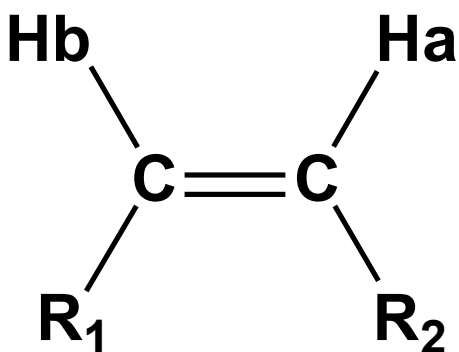
**Figura 21.** Sistema aromático ABX.

- 2) Otro sistema aromático  $A_2B_2$  [ $\delta$  7.05 (2H, d,  $J=6.8$  Hz) y 6.72 (2H, d,  $J=7.2$  Hz)] asignado H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente.



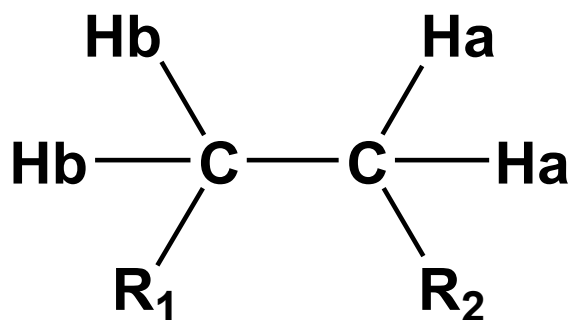
**Figura 22.** Sistema aromático  $A_2B_2$ .

- 3) Sistema de *trans* AB doble enlace [ $\delta$  7.43 (1H, d,  $J=15.6$  Hz) y 6.40 (1H, d,  $J=15.6$  Hz)] le asigna un H-7 y H-8, respectivamente.



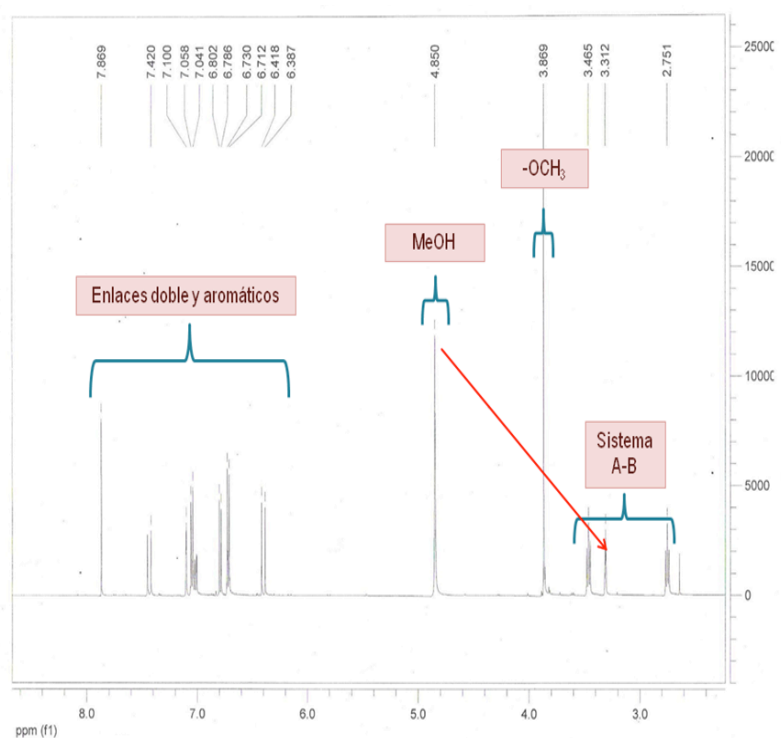
**Figura 23.** Sistema alquílico *trans* AB doble enlace.

- 4) Sistema alquílico AB [ $\delta$  2.75 (2H, dd,  $J= 7.1, 7.5$  Hz) y 3.46 (2H, dd,  $J=7.2, 6.5$  Hz)] asignado un H-7' y H-8', respectivamente.



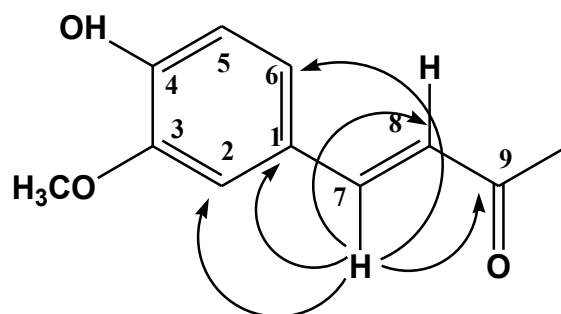
**Figura 24.** Sistema alquílico *trans* AB doble enlace.

- 5) De acuerdo con el experimento HMBC, H-7 ( $\delta$  7.43) correlacionado en dos y tres bandas con cinco señales de carbono en  $\delta$  128.39, 111.6, 123.33, 118.8 y 169.28 que son asignados a C-1, C-2, C-6, C-8 y C-9, respectivamente, lo que indica la presencia del grupo *trans* feruloil (Figura 25).



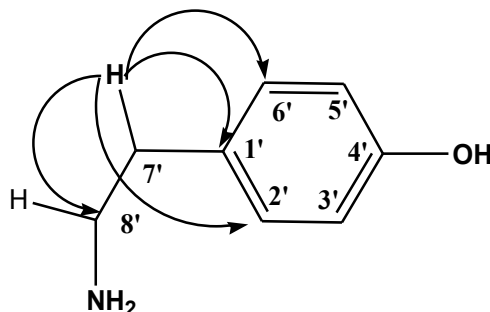
**Figura 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

De acuerdo con el experimento HMBC, H-7 (7.43) correlaciona en dos y tres ligaduras con cinco señales de carbono en 128.39, 111.6, 123.33, 118.8 y 169.28 que son asignados a C-1, C-2, C-6, C- 8 y C-9 , respectivamente, lo que indica la presencia del grupo *trans*-feruloil-tiramina (Figura 26).



**Figura 26.** HMBC correlación H-7.

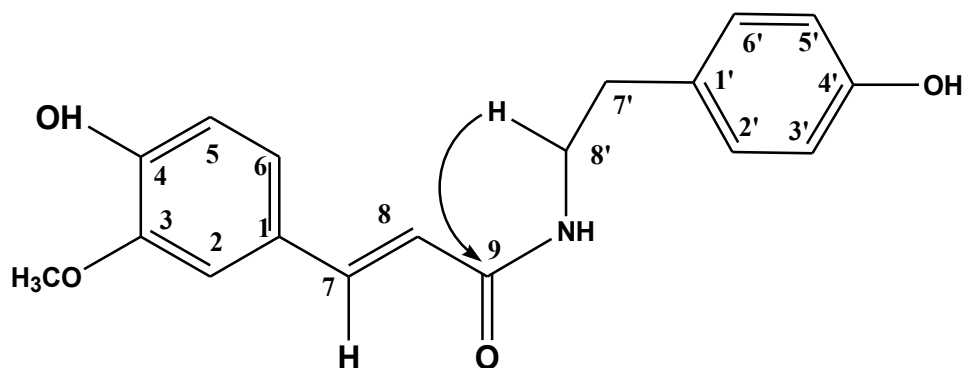
Por otro lado la señal de H-7 ' (2.75) correlaciona a  $J_{2-3}$  con cuatro señales de  $^{13}\text{C}$  en 131.41, 130.85, 130.85 y 42.66 asignado a C-1', C-2', C-6' y C-8', respectivamente, lo que indica la presencia de benceno que está sustituido por un grupo alquilo del tipo etilo (Figura 27).



**Figura 27.** HMBC correlación H-7'.

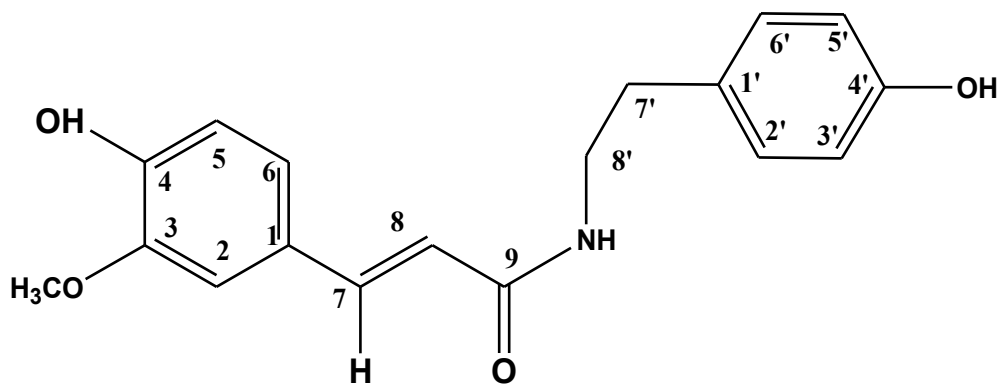


Adicionalmente la señal de H-8' (3.46) está unido a un grupo que contiene un átomo de nitrógeno por su desplazamiento químico, esto nos permitió determinar la presencia de un grupo amina terminal, que forma el esqueleto de la tiramina. Este grupo está unido a *N-trans*-feruloil, esto de acuerdo con el acoplamiento observado de H-8' a  $J_{2-3}$  con la señal de C-9 grupo carbonilo (169.28) de éster amida (Figura 28).



**Figura 28.** HMBC correlación H-8'.

De acuerdo con los datos del análisis de RMN (Tabla 9) y la comparación de los datos de la literatura, se estableció la estructura química de *N-trans*-feruloil-tiramina.



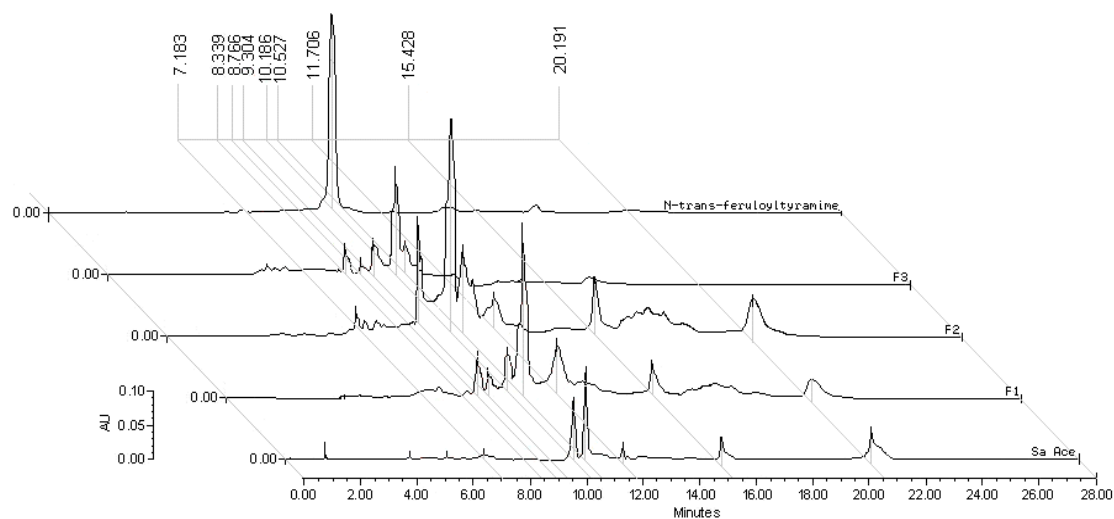
**Figura 29.** Estructura química de *N-trans*-feruloil-tiramina.

El espectro de masas dio un ion molecular de  $m/z$  314  $[M+H]^+$ , 192 [M-etilbenceno], 177 [M-etilaminobenceno]. Este compuesto no se ha aislado anteriormente para *S. aristolochiifolia*. Sin embargo, ciannamide feniletíl ha sido aislado de otras especies, y posee actividades tales como: antioxidante (Fan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011), inhibidor de la alfa-glucosidasa (Yusuf *et al.*, 1992) y antiarrítmico (Faraci 2011). Este compuesto se utilizó para la estandarización de los extractos de *S. aristolochiifolia* por HPLC y el contenido de NTF en cada muestra en mg/g de extracto fue: acetónico (Ace-Sa, 2.77); F1 (26.34), F2 (60.22) y F3 (8.76).

### **9.3. Análisis químico**

El análisis por HPLC mostró un perfil cromatográfico diferente de las muestras de *S. aristolochiifolia* (figura 27). El tiempo de retención (RT) para NTF es 10.18 min, las AUC para el pico de este compuesto en cada muestra indicó que la fracción F2 contiene la mayor concentración de NTF de Ace-sa, F1 o F3. La curva de calibración, nos permitió calcular las dosis de NTF administrados con cada tratamiento, por ejemplo, con Ac-Sa se administró a una dosis de 69.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , F1 65.75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , F2 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  cada uno, y F3 se administró a una dosis de 219  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Figura 30.** Perfil cromatográfico por HPLC de diferentes muestras de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-sa, F1, F2 y F3, y *N-trans-feruloil-tiramina* que tenía una TR = 10.186 min).



**Tabla 9.** Datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto *n-trans-feruloiltyramine* a 400 MHz para protón y 100 MHz para carbono (en metanol).

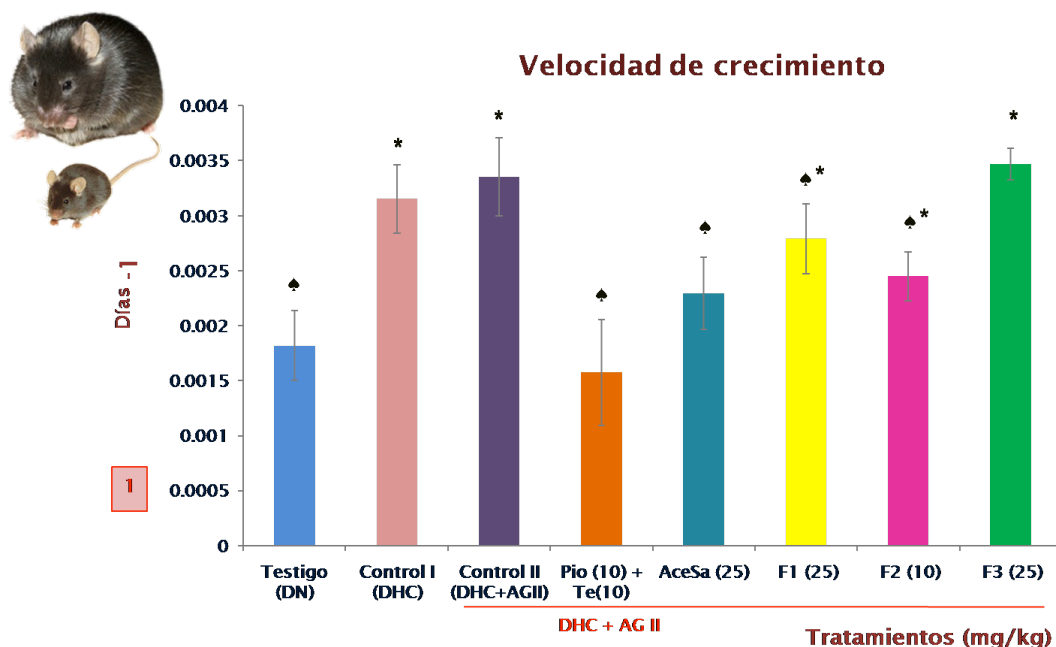
No.	$\delta_c$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_c$ [Lit]	$\delta_c$ [Lit]
1	<b>128.39</b>		129.77	128.4
2	111.6	7.1(d,2)	114.99	111,7
3	149.3		147.32	149,4
4	149.9		147.81	149,9
5	116.5	6.79(d,8.2)	116.71	116,6
6	123.33	7.0(dd,2,8.2)	110.31	123,4
7	<b>142.1</b>	7.43(d,15.6)	122.70	142,2
8	118.8	6.4(d,15.6)	140.72	118,9
9	169.28		167.12	169,3
-OCH <sub>3</sub>	56.51	3.87(s)	55.56	56,5
1'	131.41		127.0	131,5
2'	130.85	7.05(d,6.8)	115.17	130,9
3'	116.39	6.72(d,7.2)	129.40	116,4
4'	157		155.16	157,1
5'	116.39	6.72(d,7.2)	129.40	116,4
6'	130.85	7.05(d,6.8)	115.17	130,9
7'	35.92	2.75(dd,7.1,7.5)	34.39	35,9
8'	42.66	3.46(dd,7.2,6.5)	40.56	42,7

El análisis de RMN nos permitió determinar que el compuesto se denomina *N-trans-feruloil-tiramina*.

## 9.4. Resultados experimentales

### Caracterización Farmacológica

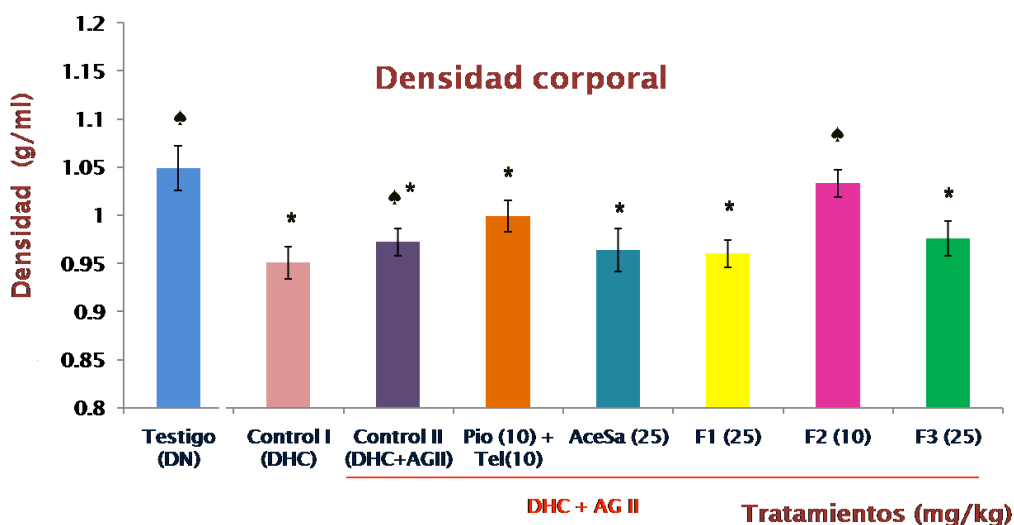
El efecto de la administración de la dieta hipercalórica (DHC, grupo de control I) durante 20 semanas, se comparó con el efecto de la administración de la dieta regular (grupo testigo con dieta normal) y contra el control negativo del experimento (DHC + AGII, grupo de control II). En ambos casos, se observó un incremento de dos veces en los valores de la tasa de crecimiento (que corresponde a la pendiente de la fase logarítmica de el cambio de peso con respecto al tiempo en días), en comparación con los valores observados en el grupo con dieta normal; estos datos fueron significativamente diferentes de los del grupo con dieta normal (\*  $p < 0.05$ ). Figura 31.



**Figura 31.** Efecto de diferentes tratamientos sobre la tasa de crecimiento de los ratones expuestos a C57/BL-6 dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (Control II). Extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-Sa), fracciones F1, F2 y F3 de Ace-Sa, la pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica. ANOVA seguido por el pos prueba de Tukey (media  $\pm$  DE,  $n = 10$ ); \*  $p < 0.05$  (en comparación con el grupo con dieta normal), ♠  $p < 0.05$  (en comparación con el control II).

Los tratamientos con extracto de Ace-Sa y control positivo (Pio + Tel) no mostraron ningún cambio significativo ( $*p > 0.05$ ) en comparación con el grupo con dieta normal. Pero cuando estos grupos se compararon con el grupo de daños (control II) mostraron una disminución significativa ( $& p < 0.05$ , Figura 31). Aunque el efecto de la F1, F2 y F3 fueron más bajos que Ace-Sa y no fue significativamente diferente con el grupo con dieta normal ( $*p < 0.05$ ), éstos tratamientos también indujeron una disminución estadísticamente significativa de la velocidad de crecimiento respecto al grupo control II ( $& p < 0.05$ ).

Los ratones alimentados con una dieta regular (testigo) mostraron un incremento de peso dependiente en el aumento de tejido magro, alcanzando un valor de la densidad del cuerpo de  $1.05 \pm 0.02$  g/ml (Figura 32). En los grupos con HCD o HCD + AGII se observó una disminución significativa de la densidad del cuerpo respecto al grupo con dieta normal ( $*p < 0.05$ ), el efecto de tales tratamientos es de acuerdo al tamaño de los animales y peso de los animales (Figura 32).

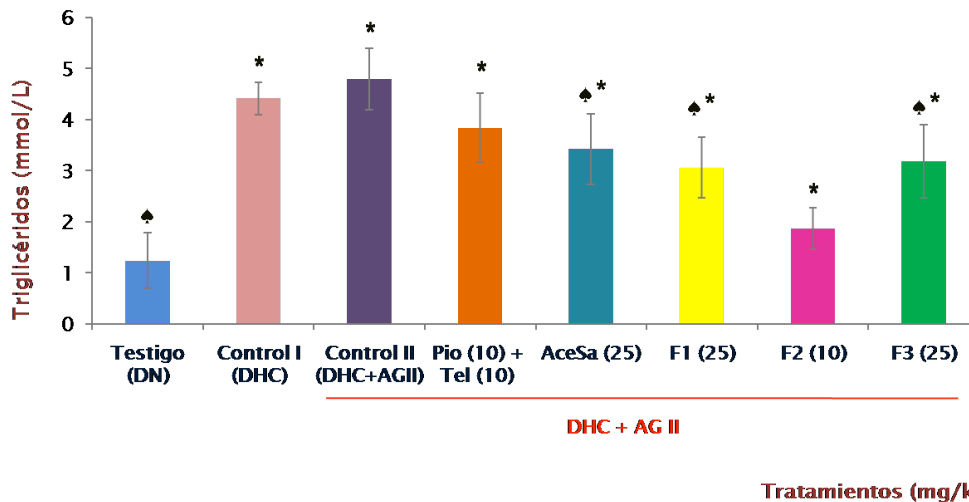


**Figura 32.** Efecto de diferentes tratamientos sobre la densidad corporal de los ratones expuestos a C57/BL-6 dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (control II): Extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-Sa), fracciones F1, F2 y F3 de Ace-Sa, pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica. ANOVA seguido por el pos prueba de Tukey (media  $\pm$  DE, n = 10); \*  $p < 0.05$  (en comparación con el grupo con dieta normal), #  $p < 0.05$  (en comparación con el control II).

Los tratamientos con el extracto Ace-Sa y las fracciones F1 y F3 a partir de *S. aristolochiifolia* no impidieron el efecto de DHC y AGII sobre la densidad corporal, los valores de densidad de estos grupos fueron significativamente diferentes con respecto al DN (Figura 32, \* $p < 0.05$ ), pero no con el grupo daño (Figura 30, &  $p > 0.05$ ). Sin embargo, la fracción F2 y el grupo de control positivo (Pio + Te), fueron los únicos capaces de inhibir la disminución de la densidad corporal inducida con HCD y AGII, este efecto era diferente al grupo de daños (HCD + AGII, &  $p < 0.05$ ), pero estadísticamente similar al de dieta normal ( $p > 0.05$ ).

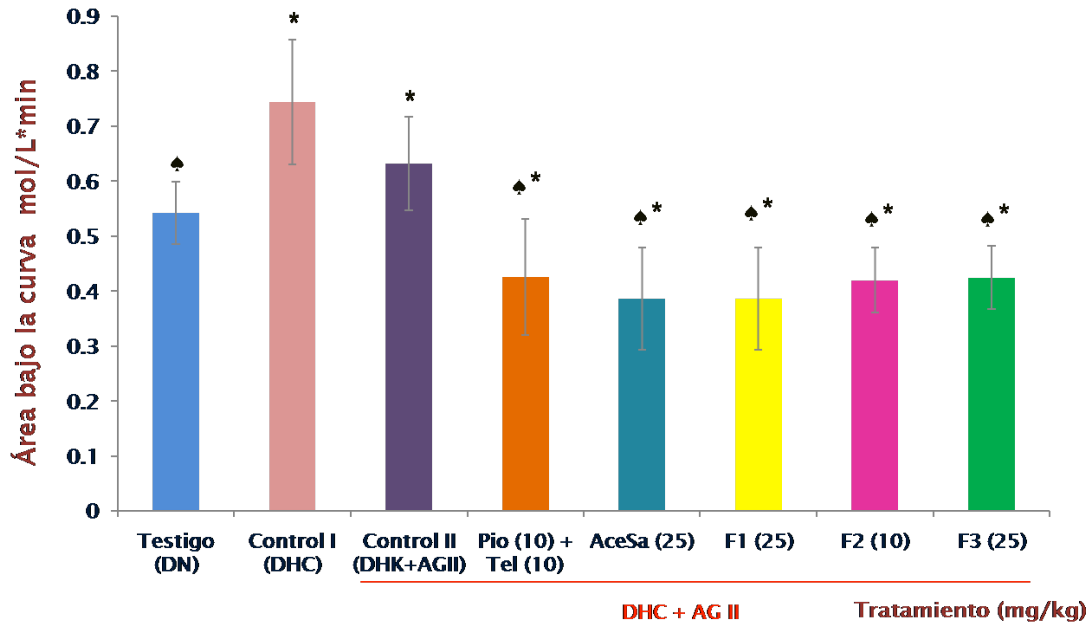
La hipertrigliceridemia es una alteración cardinal de la SM, que está asociada a la dislipidemia, en este trabajo la administración del DHC y DHC + AGII causó un aumento significativo (\* $p < 0.05$ ) en la concentración de triglicéridos plasmáticos con respecto al grupo de dieta normal hasta 3 y 4 veces, respectivamente. Los tratamientos de *S. aristolochiifolia*, aunque fueron mayores y estadísticamente diferentes de grupo con dieta normal (\* $p < 0.05$ ), estos provocaron una disminución estadística significativa de la concentración de triglicéridos en suero respecto al grupo daño con DHC + AG II ( $\spadesuit p < 0.05$ ) y cabe señalar que el grupo de ratones tratados con F2 respondió mejor debido a que los triglicéridos fueron inferiores a DHC + AG II, y no tuvieron diferencias estadísticamente con el grupo de dieta normal (Figura 33). Mientras que en el grupo con Pio + Tel, no disminuye este parámetro respecto al grupo control II ( $p > 0.05$ , Figura 33).

### Concentración de triglicéridos en plasma.



**Figura 33.** Efecto de diferentes tratamientos sobre la concentración de triglicéridos en suero de ratones expuestos a C57/BL-6 dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (control II): Extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-SA), fracciones F1, F2 y F3 de Ace-Sa, pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica. ANOVA seguido por el pos prueba de Tukey (media  $\pm$  DE, n = 10); \* p < 0.05 (en comparación con el grupo de dieta normal), ♠ p < 0.05 (en comparación con el control II).

Otro componente de la SM es la resistencia a la insulina que conduce a la diabetes mellitus tipo 2, este parámetro se determinó a partir del área bajo la curva (AUC) de la concentración de glucosa en plasma con la administración de una dosis de insulina. Los animales expuestos a tanto DHC y DHC + AGII mostraron un incremento significativamente mayor de la AUC respecto al grupo con dieta normal (\*p < 0.05, Figura 34). Todos los tratamientos de *S. aristolochiifolia* disminuyeron el parámetro de resistencia a la insulina disminuyendo el valor de los datos de AUC, que fueron estadísticamente diferentes para el grupo con el daño p < 0.05 (Figura 34). El tratamiento de control positivo (Pio + Tel) fue el mejor para causar una disminución de este parámetro (p < 0.05), incluso con una reducción mayor que la observada para el grupo con dieta normal (\*p < 0.05).



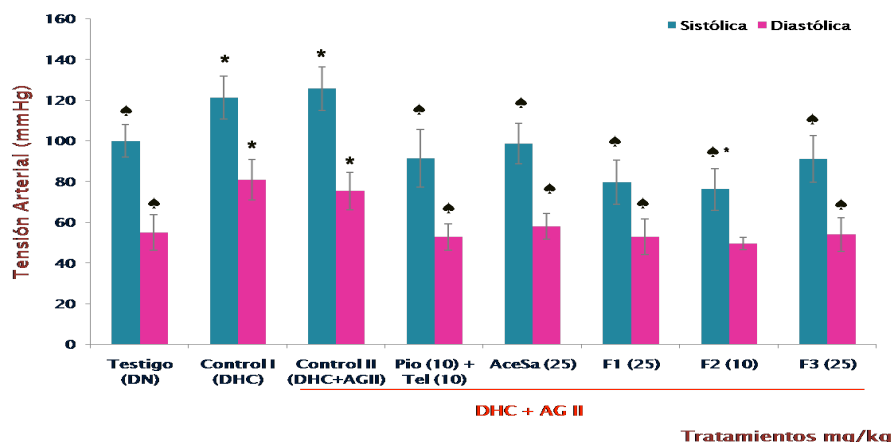
**Figura 34** Efecto de diferentes tratamientos sobre la resistencia a la insulina (medida como el área bajo la curva) de los ratones C57/BL-6 expuesta a la dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (control II): extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-SA), fracciones F1, F2 y F3 de Acesa, pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica. ANOVA seguido por el post-test de Tukey (media  $\pm$  DE, n = 10); \* p < 0.05 (en comparación con el grupo de dieta normal), ♣ p < 0.05 (en comparación con el control II).

Cuando se midieron tanto la presión arterial diastólica (PAD) y sistólica (PAS) se observó que los grupos de ratones con DHC o DHC + AGII, mostraron un aumento sustancial y estadísticamente significativo en ambos casos en comparación contra el grupo de dieta normal (\*p < 0.05, Figura 35). Este incremento fue controlado con la administración de diferentes grupos animales con extracto (Ace-Sa) y fracciones (F1, F2 y F3) de *S. aristolochiifolia*, por lo tanto, se pudo observar una disminución significativa de la PAS y la PAD (♣p < 0.05, Figura 35).

Los niveles de citocinas se cuantificaron en el riñón y tejido adiposo de animales con diferentes condiciones experimentales asociados a la SM.



### Tensión Arterial Sistólica y Diastólica.

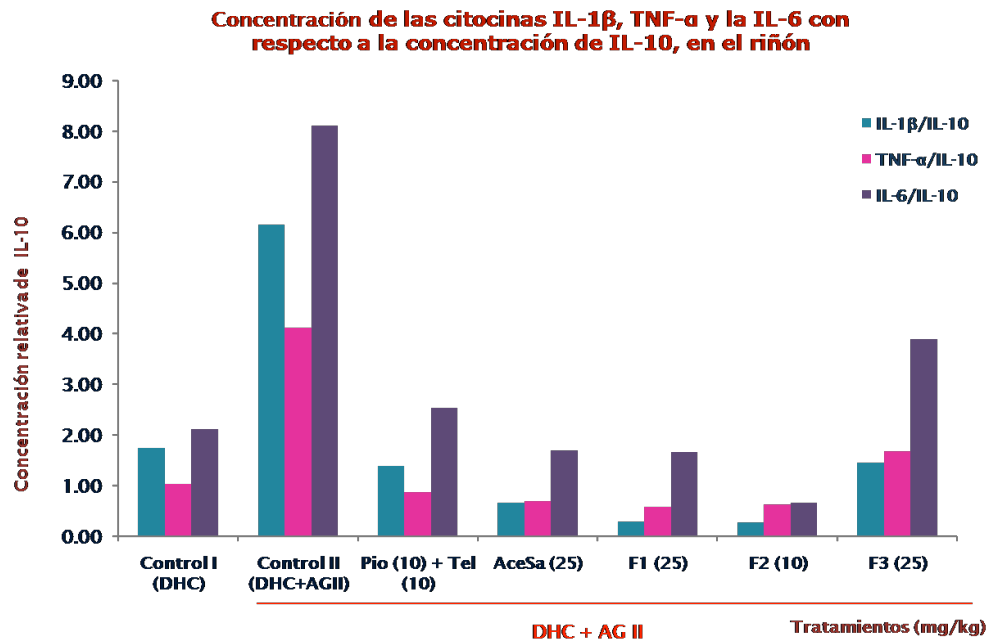


**Figura 35** Efecto de diferentes tratamientos sobre la presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) de ratones C57/BL-6 expuestos a la dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (Control II): Extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-SA), fracciones F1, F2 y F3 de Ace-SA, pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica. ANOVA seguido por el pos prueba de de Tukey (media  $\pm$  DE, n = 10); \* p < 0.05 (en comparación con el grupo de dieta normal), ♣ p < 0.05 (en comparación con el control II).

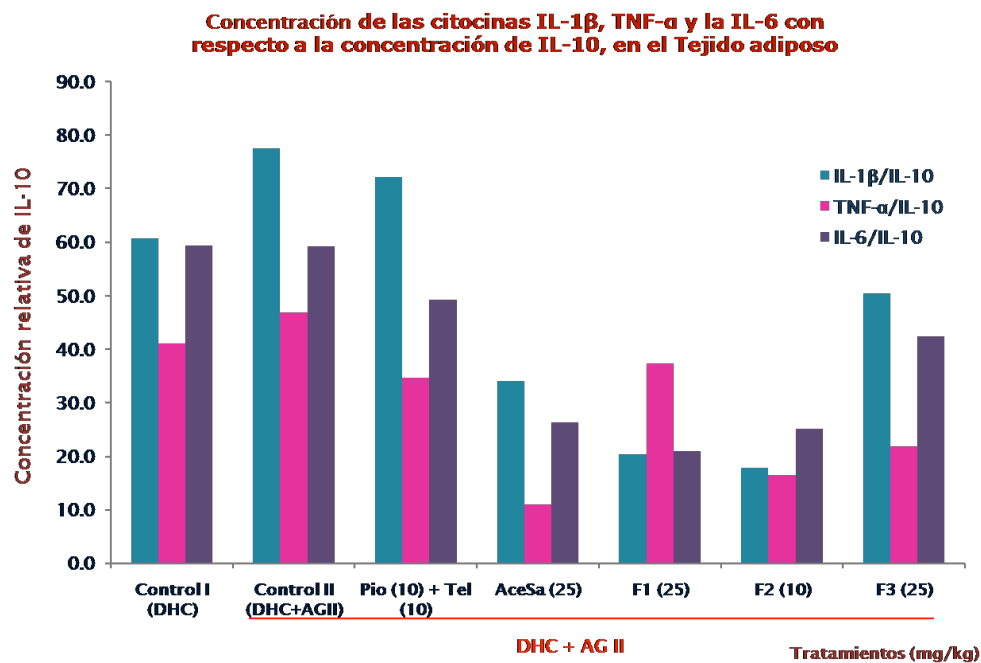
En la administración de riñón de tratamientos y DHC o DHC + AGII establecido ambiente inflamatorio, en comparación con la condición del grupo con dieta normal (Figura 36 a). Cuando estos procesos inflamatorios se evalúan en los grupos de ratones con extracto o fracciones de *S. aristolochiifolia* (Figura 36 a) generalmente se observó una disminución de las condiciones de pro-inflamatorias, de la misma manera como sucedió con el tratamiento de control positivo (Pio + Tel).

En lo que respecta a la respuesta del tejido adiposo se puede observar en la Figura 36 b, que ambos tratamientos con DHC como tratamiento DHC + AGII tenían un efecto similar con respecto a la respuesta pro inflamatoria. Tratamiento de control positivo (Pio + Tel) no fue capaz de reducir la respuesta pro-inflamatoria en el tejido adiposo (Figura 36 b). En contraste, con los ratones con tratamientos de *S. aristolochiifolia* que generalmente disminuyeron del tejido pro-inflamatoria respuesta, aunque la fracción F3 lo hizo en menor medida (Figura 36 b).

a)



b)



**Figura 36.** Efecto de diferentes tratamientos sobre la concentración de las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y la IL-6 con respecto a la concentración de IL-10, en el riñón (a) y el tejido graso (b) de los ratones C57/BL-6 expuesto a la dieta hipercalórica y angiotensina II crónica (Control II): el extracto de acetona de *Smilax aristolochiifolia* (Ace-Sa), fracciones F1, F2 y F3 de Ace-Sa, pioglitazona y Telmisartan (Pio + Te). Control I = dieta hipercalórica.

En este trabajo, se administró a ratones C57BL6, una dieta alta en calorías que provocó aumento de peso y generando daños asociados con el SM: el sobrepeso, la hiperglucemia, la hipertensión y la hipertrigliceridemia. Los cambios vasculares que resultaron de estas dolencias se vieron exacerbadas por la administración crónica del vasoconstrictor potente AG II. El aumento de la concentración de glucosa, los triglicéridos y la hipertensión crónica asociada con la obesidad y la diabetes son los principales factores patológicos en la disfunción endotelial, lo cual es un elemento clave de los mecanismos de la enfermedad vascular subyacente (Kovacic *et al.*, 2011) y también es un predictor de eventos clínicos como los accidentes vascular cerebrales, que tienen una alta tasa de comorbilidad (Najjar *et al.*, 2005; Yiannikouris *et al.*, 2012), debido principalmente al hecho de que las células endoteliales juegan un papel importante en la regulación de la estructura y la función (Kovacic *et al.*, 2011) vascular.

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de la hipertensión y la dislipidemia. La ganancia de peso inducida por DHC, produce un aumento en las concentraciones plasmáticas de AG II, que aumenta la presión arterial sistólica en ratones machos (Putnam *et al.*, 2012). Los adipocitos, las principales células de tejido adiposo, el cual es uno de los posee todos componentes del RAAS y se encuentran dispersos en la economía, son capaces de expresar péptidos de angiotensinógeno y angiotensina (Putnam *et al.*, 2012). En los seres humanos, AG II producida por los adipocitos parece inhibir la diferenciación de los precursores de adipocitos, disminuyendo el porcentaje de adipocitos pequeños que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, la capacidad de almacenamiento de los lípidos en el tejido adiposo se reduce, y los triglicéridos pueden acumularse en el hígado

y en el músculo esquelético, lo que contribuye a la resistencia a la insulina (Wright *et al.*, 2008). El aumento constante del nivel de AG II además de producir una constricción vascular prolongado induce la liberación de aldosterona, retención de sodio y agua, aumento de fluidos, en última instancia conduce a un estado de hipertensión (Ranilla *et al.*, 2010). Por lo tanto, un desequilibrio crónico de la regulación AG II induce la hipertensión crónica y daño vascular, así como la dislipidemia e hiperglucemia, que se reproduce en el modelo utilizado en este trabajo con la dieta DHC y la administración crónica de AG II. Hiperglucemia prolongada y la resistencia a la insulina resultante que conduce a hiperinsulinemia, regula hasta los componentes del sistema de renina-angiotensina (RAAS) y agudiza la condición pro-inflamatorias y pro-trombótico mediada por AG II, que se asocia con complicaciones macrovasculares de la diabetes. El desequilibrio de RAAS debido al aumento de AG II en tejidos tales como el riñón, el hígado y el tejido adiposo por la hiperglucemia puede contribuir a la hipertensión asociada con la SM y el daño a órganos observado en la DM2 (Wright *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron por primera vez el efecto de *S. aristolochiifolia* en un modelo de lesión asociada con la SM. Anteriormente, el uso farmacológico antecedente de esta planta indica sólo el efecto diurético (DellaGreca *et al.*, 2009). Hay otros reportes, que mostraron que las especies del mismo género indujo un efecto benéfico sobre diferentes alteraciones asociadas a la SM. Por ejemplo, *S. officinalis*, inhibe las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y posee un efecto antioxidante (Abdala *et al.*, 2012); *S. canariensis* tiene un efecto diurético (Amira *et al.*, 2012); *S. aspera* y *S. china* Linn disminuyen la inflamación plantar inducido por carragenina (Khan *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2008). En este último

trabajo se menciona que poseen la sieboldogenin compuesto, que inhibe la actividad de la lipoxigenasa (Zhang *et al.*, 2008). Los glucósidos (smilásidos G-L) de *S. bracteata* tienen actividad captadora contra los radicales DPPH (Fukunaga *et al.*, 1997) y *S. glabra* mostraron un efecto hipoglucémico en una prueba de tolerancia a la insulina en ratones (Kim *et al.*, 2008).

En el presente estudio la administración del extracto Ace-SA y fracciones F1, F2 y F3 de *S. aristolochiifolia* fueron un tratamiento efectivo para controlar las principales alteraciones asociadas con la SM, en ratones C57/BL6 con daño inducido por DHC y la administración crónica de AG II. Este es el caso del extracto de AceSA, que contrarresta el efecto de la dieta DHC y AG II en la curva de crecimiento (corroborado por la disminución de la densidad corporal), y se mantiene a los animales en condiciones similares a las del grupo con dieta normal; este efecto también se observó en el grupo que recibió la combinación de medicamentos pioglitazona y telmisartán. Esto es probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de Ace-SA, ya que tienen la capacidad de inhibir enzimas glucosidasa, que son una diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad en los seres humanos (Yusuf *et al.*, 1992). Además, los niveles de triglicéridos en ratones con una dieta DHC + AG II fueron mayores que en los animales que recibieron sólo una dieta DHC. En los grupos que recibieron algún tipo de tratamiento de *S. aristolochiifolia* este parámetro disminuyó significativamente en todos los grupos (Ace-SA, F1, F2 y F3) en comparación con el grupo control II. Aunque, los resultados con F2 son dignos de mención, debido a que este tratamiento era mejor que todos los grupos, incluyendo el tratamiento con pioglitazona y telmisartan. Los niveles de glucosa en suero, la hipertensión y la

concentración local de las citoquinas pro inflamatorias inducidas por DHC + AG II (Control II), también se redujo en los animales que recibieron cualquier tratamiento de *S. aristolochiifolia*.

El análisis químico indicó que todas las fracciones *S. aristolochiifolia* utilizados para el tratamiento de animales con SM, contenían diferentes concentraciones de compuesto aislado N-*trans*-feruloil-tiramina (NTF), el nivel más alto de esta sustancia se encuentran en la fracción F2. Entonces, es posible que el efecto farmacológico contra el SM en ratones, pueda atribuirse principalmente a la presencia de NTF, porque F2 posee el mayor efecto y la concentración de este compuesto es más alta en el mismo. Lo cual no excluye la posibilidad de una interacción farmacológica con otros principios activos, y que el efecto farmacológico observado podría ser el resultado de diferentes actividades relacionadas con la compleja composición de la fracción.

Es importante señalar que los efectos de diferentes tratamientos de *S. aristolochiifolia* podría ser debido a NTF porque ha sido descrito como un inhibidor no competitivo de  $\alpha$ -glucosidasas, lo que explica su capacidad anti-hiperglucemiante (Yusuf *et al.*, 1992). Además, se demostró que NTF tiene una capacidad antioxidante a través del secuestro de los radicales libres (Fan *et al.*, 2010). Por otro lado, NTF contrarresta los trastornos inflamatorios de la SM; se ha demostrado un efecto de regulación dependiente de la dosis en la liberación de óxido nítrico (estallido respiratorio) estimulado por LPS en un cultivo de células RAW 264.7 (Kim *et al.*, 2008). Sin embargo, el efecto farmacológico más notable de NTF, que podría explicar en parte el efecto del extracto de *S. aristolochiifolia* como un anti-SM, es que actúa como ligando para el receptor gamma activado por

el proliferador de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ). Por lo tanto, NTF es capaz de mejorar el estado mórbido de la obesidad visceral y las condiciones resultantes de esta enfermedad. Esto ocurre porque PPAR- $\gamma$ 2 se expresa específicamente en el tejido adiposo y es un regulador maestro en la diferenciación y maduración de los adipocitos (Reaven, 2005). Se ha demostrado que los ligandos para PPAR- $\gamma$ 2, mejoran la condición de la resistencia a la insulina. Por todo esto, la administración de estas sustancias puede ser un tratamiento eficaz para la prevención y mejora no sólo de la DM2, sino también de la RI con el síndrome de hiper-insulinemia, el metabolismo anormal de los lípidos, la obesidad, la hipertensión y la aterosclerosis (Hoffman *et al.*, 2012).

Sin embargo, llama la atención que con las administraciones de las drogas sintéticas del tipo de glitazonas, que actúan sobre PPAR, se han observado efectos secundarios adversos, sobre todo cardio-toxicidad, como insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias y edema periférico (Fonseca *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso generalizado del extracto de *Smilax aristolochiifolia* en refrescos, como "zarzaparilla" cerveza de raíz, nos permite suponer que NTF podría estar libre de cualquier efecto tóxico. Además, la inflamación asociada a la SM se controló mediante la cuantificación de la concentración en el riñón y en el tejido adiposo de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , así como la IL-10 anti-inflamatorio.

Se observó que el grupo con dieta DHC tenía un aumento no significativo en la concentración de citoquinas pro-inflamatorias con respecto al nivel de IL-10 en el riñón; aún así, el modelo por DHC y AG II, mostró un aumento significativo de

estas moléculas en el riñón, lo que indica que la administración crónica de AG II induce un estado pro-inflamatorio exacerbado.

La obesidad y la hipertensión son reconocidas como enfermedades con un importante fondo inflamatorio; un estudio demostró que los pacientes hipertensos y obesos tenían niveles bajos de IL-10 y altas concentraciones séricas de IL-8, en comparación con los sujetos hipertensos con peso normal (Zubcevic *et al.*, 2011).

El mecanismo de la hipertensión crónica mediada AG II también activa las células T por AGII, que promueve la inflamación vascular y la presión elevada (Elmarakby *et al.*, 2006).

Esto explica el papel esencial que se describe para el TNF- $\alpha$  como un regulador de la presión arterial. Con respecto al aumento de la presión sanguínea causado por la infusión de AG II en ratas hipertensas alimentadas con dieta alta en sal, el inhibidor de TNF- $\alpha$  retarda la progresión de la hipertensión, un efecto que se atribuye a una reducción de daño renal, debido a una disminución de la proteinuria y de la infiltración de macrófagos / monocitos (Guzik *et al.*, 2007. Otro estudio indica que en los ratones knockout para el TNF- $\alpha$ , la infusión de AG II durante dos semanas causa hipertensión (Rahman *et al.*, 1992).

Entonces, se concluye que, el extracto y las fracciones con NTF son opciones en los tratamientos de la sintomatología asociada con el SM.



## 10. CONCLUSIONES

- ❖ El extracto acetónico de *Smilax aristolochiifolia* Mill y la fracción F2 derivada de la extracción clorofórmica de él, disminuyeron estadísticamente significativa la obesidad, la resistencia a la insulina, el nivel sérico de triglicéridos, la hipertensión arterial y el proceso inflamatorio de los ratones expuestos a dieta hipercalórica y angiotensina II.
- ❖ El compuesto mayoritario de la F2 correspondió a *N-trans*-feruloil-tiramina.
- ❖ La *N-trans*-feruloil-tiramina estuvo presente en el extracto y las fracciones activas, por lo que esta sustancia se propone como el marcador químico para estandarizar los extractos, fracciones y formas farmacéuticas de la especie vegetal estudiada.
- ❖ *Smilax aristolochiifolia* Mill representa una fuente viable en el desarrollo de un fitomedicamento para el control del síndrome metabólico.

## 11. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar el fraccionamiento químico biodirigido de las otras fracciones que mostraron efecto sobre la resistencia a la insulina, para identificar otros compuestos responsables de la actividad anti-síndrome metabólico.
- ❖ Evaluar el efecto de extractos de la hoja y tallo de *Smilax aristolochiifolia* Mill.
- ❖ Realizar pruebas de toxicidad de las fracciones activas en este trabajo.
- ❖ Elucidar el resto de los compuestos del extracto de la raíz de *Smilax aristolochiifolia*.
- ❖ Determinar el mecanismo de acción hipoglucemiante del extracto y fracciones de *Smilax aristolochiifolia*.
- ❖ Evaluar por medio de histología los Islote pancreáticos en ratones tratados con *Smilax aristolochiifolia*.
- ❖ Evaluar de la expresión de *PPAR-α* en células de cultivo.



## 12. REFERENCIAS

- Abdala, S.; Martín-Herrera, D.; Benjumea, D.; Gutiérrez, S.D. Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. *J. Ethnopharmacol.* **2012.** 140, 277–281.
- Abel, ED.; *et al.* Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature.* **2001.** 409:729-33.
- Aguilar-Salinas C, Rojas B, Gómez-Pérez FJ, 3. Valles V, *et al.* Analysis of the agreement between World Health Organization criteria and the National Cholesterol Education program-III definition of the metabolic syndrome: results from a population-based study. *Diabetes Care.* **2003.** 26:1653.
- Aguilar–Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, *et al.* High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Arch Med Res.* **2004.** 35:76-81.
- Ahima, RS.; Lazar, MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol.* **2008.** 22:1023-31.
- Ailhaud G, Fukamizu A, Massiera F, Negrel R, Saint-Marc P, Teboul M. Angiotensinogen, angiotensin II and adipose tissue development. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2000.** 24 Suppl 4:S33-S35.
- Alberti K, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome a new worldwide definition. *The Lancet.* **2005.** 366(9491):1059-62.
- Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* **1997.** 46(5): 860-867.
- Aljada A, Saadeh R, Assian E, Ghanim H, Dandona P: Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J Endocrinol Metab.* **2000.** 85:2572–2575.
- Amira, S.; Dade, M.; Schinella, G.; Ríos, J.L. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2012.** 25, 65–72.
- Anderson EK, Gutiérrez DA, Hastay AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipido.* 2010;21:172-7.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes; *J Ethnopharmacol.* **2005.** 2-3:145-149.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *DiabetesMetab.* **2008.** 34:2-11.
- Arkan MC. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* **2005;**11;191-8.
- Astrup A, Dyerberg J, Selleck M, Stender S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev.* **2008.** 91:48-52
- Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science.* **2005.** 25;307(5717):1909-14.
- Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6

- and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J Endocrinol Invest.* **2007.** 30: 210-4.
- Ban JY, Jeon SY, Bae K, Song KS, Seong YH. Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid beta protein (25-35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. *Life Sci.* **2006.** 79:2251-2259
- Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Flores M, Durazo-Arvizu R, Kanter R. Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex* **2009.** 51:S595-S603.
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **2000.** 85(9):3338-3342.
- 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):2084-2089.
- Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M, *et al.* Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002.** 22(1):173-178.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004.** 89(2):463-478.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* **2002.** 13(2):84-89.
- Bergen, WG.; Mersmann, HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models, *J Nutr.* **2005.** 135:2499-502.
- Berk BC. Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin. *Science STKE*2003:PE16.
- Birgel M, Gottschling-Zeller H, Rohrig K, Hauner H. Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000.** 20(6):1682-1687.
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem.* **1999.** 274(42):30059- 30065.
- Blendea MC, Jacobs D, Stump CS, McFarlane SI, Ogrin C, Bahtyiar G, *et al.* Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2005.** 288:E353-E359.
- Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep.* **2006.** 6: 177-81
- Borradeile NM. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* **2006.** 47:2726-37.

- Boustany C, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown D, Randall D, Cassis I. Activation of the systemic and adipose rennin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2004.** 4:943-949.
- Boyanovsky B, Karakashian A, King K, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M. Uptake and metabolism of low density lipoproteins with elevated ceramide content by human microvascular endothelial cells: implications for the regulation of apoptosis. *J Biol Chem.* **2003.** 52:2867-73.
- Brandan NC, Llanos IC, Miño CA, Piccardo AP, Ragazzoli MA, Ruiz-Díz D. El tejido adiposo como órgano endócrino. **2008.** Universidad Nacional del Nordeste *Facultad de Medicina.*
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, *et al.* Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: *in vivo* and *in vitro* investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2003.** 285(3):E527-E533.
- Buckland M, Lombardi G. Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cells. *Handb Exp Pharmacol.* **2009.** (188):197-213.
- Caballero EA, Delgado A, Aguilar-Salinas CA, Naranjo JA, Castillo JL, Cabrera T *et al.*, The different effects of Metformin on Markers of Endothelial Activation and Inflammation in Subjects with Impaired Glucose Tolerance: A placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004.** 89:3943-3948.
- Calhau and Alejandro Santos. R. Soares, C. Costa (eds.), Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome) *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* Vol. 86, No. 1.
- Campbell PJ, Carlson MG, Nurjhan N. Fat metabolism in human obesity. *Am J Physiol.* **1994.** 266: E600-E605.
- Cano I C., V Bermúdez, G Sulbarán, *et al.*, Influencia de la Edad y el Sexo en el Balance oxidación/Antioxidación. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* **2001,** Volumen 20, Número 1(63-68)
- Cassis L, Saye J, Peach M; Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension.* **1998;**11:591-596.
- Catar, R, Müller G, Heidler J, Schmitz G, Bornstein S, Morawietzh. Low density lipoproteins induce the rennin-angiotensin system and their receptors in human endothelial cells; *Horm Metab Res.* **2007.** 39:801-805.
- Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, *et al.* Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes.* **2004.** 53:701-10.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2004.** 24:816-823.
- Ceriello, A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic, mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil, hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2004.** 24:816-23.

- Chandra RK. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob) mice. *Am J Clin Nutr* **1980**. 33(1):13-16.
- Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, *et al*. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. **2003**. 278(11):9850-9855.
- Cheung AT, Ree D, Kolls JK, Fuselier J, Coy DH, Bryer-Ash M. An *in vivo* model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology*. **1998**. 139(12):4928-4935.
- Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J., NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. **2002**. 35: 373–9.
- Chudek J, Wiecek A, Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep*. **2006**. 58(suppl):81-8.
- Cianflone K, Maslowska M, Sniderman AD. Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol*. **1999**. 10(1):31-41.
- Cianflone K, Xia Z, Chen LY. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta*. **2003**. 1609(2):127-143.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*. **2001**. 108(12):1875-1881.
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, *et al*. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. **2003**. 52(2):268-276.
- Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, *et al*. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*. **2002**. 143(3):998-1007.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, *et al*. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. **1996**. 334(5):292-295.
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, *et al*. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*. **1987**. 237(4813):402-405.
- Cooper JA. Effects of cytochalasins and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **1987**.105:1473-1478.
- Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, Groeling TM, Kral JG. Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab*. **2000**. 85(7):2609-2614.
- Cruz M, Garcia-Macedo R, Garcia-Valerio Y, Gutierrez M, Medina-Navarro R, Duran G, Wacher N, *et al*. Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in mexican children. *Diabetes Care*. **2004**. 27(6):1451-1453.

- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, *et al.* From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* **2004**. 53(5):1285- 1292.
- Cushman SW, Wardzala Lj. Potencial mechanism of insulin action on glucosa transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracelular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* **1980**. 255:4758-4762.
- Czech MP, Buxton JM. Insulin action on the internalization of the GLUT4 gucose transporter in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* **1993**. 268:9187-9190.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. etabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. **2005**. 111: 1448–1454
- Deiuliis J., Shah Z., Shah N., Needleman B., Mikami D., Narula V., Perry K., Hazey J., Kampfrath T., Kollengode M., Sun Q., Satoskar A.R., Lumeng C., Moffatt-Bruce S., Rajagopalan S.,. Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers. **2011**. 6(1): e16376.
- DellaGreca, M.; Cutillo, F.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Pacifico, S.; Zarrelli, A. Antioxidant and radical scavenging properties of Malva sylvestris. *Nat. Prod. Commun.* **2009**. 4, 893–896.
- Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* **2008**. 28(6):1039-49.
- Devaraj S, Rosenson R, Jialal I. Metabolic syndrome: an apparasial of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Edocrinol Metabol Clin.* **2004**. 33;43-13.
- Devaraj S, Tosenson r, Jialal I. Metabolic syndrome: an apprasial of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol ,Metabol Clin.* **2004**. 33:431-53.
- Díaz-Cisneros FJ., Rodríguez-Guzmán L.Rodríguez-Guzmán E., García-González MR. Metabolic syndrome prevalence in Guanajuato, Mexico's teachers. *An Fac med.* **2010**. 71(2):75-8.
- Dzielak DJ. The immune system and hypertension. *Hypertension.* **1993**. 19:36-44.
- Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, *et al.* Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetesin a mouse model of lipoatrophic diabetes. *Diabetes.* **2001**. 50(6):1440-8.
- Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* **2008**. 29: 42-61.
- Erdos EG. Angiotensin I-Converting enzyme and the changes in our concepts throught the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hipertensión*, 1990. 16:363-370.
- Esper RJ, Vilarino JO, Machado RA, Paragano A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol.* **2008**. 45: 17-43.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Guigliano G, Guigliano F, Ciotola M, *et al.* Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* **2002**.106:2067-72.
- Esposito K., Marfella R and Giugliano D.. Stress Hyperglycemia, Inflammation, and Cardiovascular Events *Diabetes care.* **2003**. vol 26 no. 5 1650-1651.

- Esposito MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-Arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduce monocyte adhesion to endothelial cells in Young men with coronary artery disease. *Arteriosclerosis*. **1997**. 129:261-9.
- Esther CR, Marino EM, Howard TE, *et al*. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*. 1997;99:2375-2385.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. **2002**. 23: 599-622.
- 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):2273-2282.
- Fan, P.; Terrier, L.; Hay, A.E.; Marston, A.; Hostettmann, K. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia* **2010**. 81, 124–131.
- Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, *et al*. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**. 301(4):1045-1050.
- Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*. **2003**. 46(12):1594-1603.
- Fernandes G, Handwerker BS, Yunis EJ, Brown DM. Immune response in the mutant diabetic C57BL/Ks-dt+ mouse. Discrepancies between in vitro and in vivo immunological assays. *J Clin Invest*. **1978**. 61(2):243-50.
- Ferrario MC, Strawn BW. Role of the rennin angiotensin aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease; *Am J Cardiol* **2006**. 98:121-128.
- Fonseca, H.A.; Fonseca, F.A.; Monteiro, A.M.; Bianco, H.T.; Boschcov, P.; Brandão, S.A.; Jualiano, L.; Gidlund, M.; Izar, M.C. Obesity modulates the immune response to Oxidized LDL in hypertensive Patients. *Cell Biochem. Biophys*. **2013**. 67, 1451–1460.
- Fonseca-Alaniz MH *et al*. Adipose tissue: an endocrine organ. *J Pediat*. **2007**. 83 (5 Suppl): S192-S203.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. 7. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. **2002**. 16: 356-59.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. **1998**. 83(3):847-850
- Frisbee JC. Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *A, J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **2005**. 289:R316.
- Fruhbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal J, Burrel MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*. **2001**. 280 (6): E827-47.



- Fukunaga, T.; Miura, T.; Furuta, K.; Kato, A. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Smilax glabra* in normal and diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**. 20, 44–46.
- Fulda S, Gorman A, Hori O, Smalli A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* **2010**.1-23.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **2004**.114:1752-1761.
- Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, *et al.* Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**. 93(25): 14564-8.
- Gajda A, Pellizzon M, Ricci M, Ulman E. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models; *Animal Lab News* 2007 <http://www.researchdiets.com/pdf/Dietinduced%20Metabolic%20Syndrome.pdf>. Con acceso 2 de febrero de **2012**.
- Gasparo M, Bottari S, Levens NR. Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology. En: Laragh JH. Brenner BM (ed). *Hypertension: physiology, diagnosis, and management*, New York: Raven, **1994**.1695-1720.
- González-Chávez A, Alexander REG., Alvarado RR. Consenso Mexicano sobre el Tratamiento integral del Síndrome Metabólico. *Rev Mex Cardiol.* **2002**. 343:16-22.
- González-Chávez A, Elizondo-Argueta S, Gutiérrez-Reyes G, León–Pedroza JI. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir Cir.* **2011**. 79(2):209-16.
- González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Jacques-4. Camarena O, Hernández-González SO, Valera-González IG, Ramos-Zavala MG. Prevalence of metabolic syndrome in adults with excess of adiposity: comparison of the Adult Treatment Panel III criteria with the International Diabetes Federation definition. *Acta Diabetol.* **2006**. 43:84-6.
- Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. Expression of human glucosa transporters in xenopus oocytes: kinetic caracterizacion and substrate especificities of the erythrocyte liver, and brain isiforms. *Biochemistry* **1991**. 30:5239-5145.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Adipocyte stress: the endoplamsic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* **2007**. 48:1905-14.
- Grima SA, León LM, Ordóñez RB. Síndrome metabólico como factor de riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* **2005**. 16(Suppl.):16D-20D.
- Grundy SM, Cleeman JL, Daniels SR, *et al.* Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement.*Circulation.* **2005**. 112.
- Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* **2008**. 28:629-636.
- Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines: novel link between inflammation and vascular function? *J PhysiolPharmacol.* **2006**. 57: 505-28.
- Guzik, T.J.; Hoch, N.E.; Brown, K.A.; McCann, L.A.; Rahman, A.; Dikalov, S.; Goronzy, J.; Weyand, C.; Harrison, D.G. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **2007**. 204, 2449–2460.

- Haber RS, Weinstein SP, O'Boyle E, Morgello S. Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology*. **1993**. 132:2538-2543.
- Haugue-de Mouzon S, Challier JC, Kacemi A, Cauzac M, Malek A, Girard J. The GLUT3 glucose transporter isoforms is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**. 82:2689-2694.
- Hebert KE, Mistry Y, Hastings R, *et al.* Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere, dependent and independent pathways. *Circ Res* **2008**. 20-208.
- Hernández N, Torres SH, Vera O, De Sanctis JB, Flores E. Muscle fiber composition and capillarization in relation to metabolic alterations in hypertensive men *J Med*. **2001**. 32:67-82.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. **2002**. 420: 333-6.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. **2002**. 420:333-40.
- Hoffmann. B.R.; El-Mansy, M.F.; Sem, D.S.; Greene, A.S. Chemical proteomics-based analysis of off-target binding profiles for rosiglitazone and pioglitazone: clues for assessing potential for cardiotoxicity. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8260–8271.
- Horie T, Ono K, Nagao K, *et al.*, Oxidative stress induces GLUT4 translocation by activation of P13-K/Akt and dual AMPK Kinase in cardiac myocytes. *J Cell Physiol* **2008**. 215:733-742
- Horton JD, Goldstein JL, Bown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. **2002**; 109:1125-1131.
- Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, *et al.* Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. **2007**. 56: 901-11.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **1993** 259(5091):87-91.
- Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. **2010**. 16:396-9.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. **2006**. 44:860-7.
- Hsueh W, Abel E, Breslow J, Maeda N, Davis R, Fucher E, Dansky H, McClain D, McIndoe R, Wassef M, Rabadan-Diehl C, Goldberg I. Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease; *Circulation Research*. **2007**. 100:1415-1427.
- [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/bmi\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/index.html).
- <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=2358>
- 7
- Isaac RE, Schoofs L, Williams TA, *et al.* A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. *Biochem J*. **1998**. 330:61-65.

- Isaac RE, Schoofs L, Williams TA, *et al.* Toward a role for angiotensin, converting enzyme in insects. *Ann NY Acad Sci.* **1998.** 839:288-292.
- Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulations of glucose transporter 4 traffic: new signals, locations and partners. *Endocrinology* **2005.** 146:5071-5078.
- Isomaa B, Acmyren P, Tuomi T, *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with metabolic syndrome. *Diabetes Care.* **2001.** 24(4):683-9
- Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, *et al.* Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **2003.** 52(7):1655-1663.
- Janson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation, *J Clin Endocrinol Metab* **1993.**77:1554-1562.
- Jennings-Aburto N, Nava F, Bonvecchio A, Safdie M, Gonzalez-Casanova I, Gust T, *et al.* Physical activity during the school day in public primary schools in Mexico City. *Salud Publica Mex.* **2009.** 51(2):141-147.
- Jian C, Vapaatalo H, Merval E. Angiotensin II and vascular inflammation; *Med SciMonit:* **2005.** 6:194-124.
- Jian-jun L. Inflammation in hypertension: primary evidence. *Chinese Medical Journal.* **2006.**119(14):1215-1221 1215
- Jiří Ehrmann Jr.a\*, Nicol Vavrušováa, Yrjo Collanb, Zdeněk Kolářa. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) In health and disease. *Biomed. Papers* **2002.** 146(2), 11–14.
- Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs.***1990.** 39:21-31.
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: A regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2005.** 19:547-66.
- Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Boner Weir S, Sharma A, Weir GC. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress *J Biol. Chem.* **2001.** 276, 31099-104.
- Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, *et al.* Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* **2009.** 139:1-4.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2001.** 280(5):E745-51.
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* **1995.** 95: 2111-9.
- Khan I, Nisar M, Ebad F, Nadeem S, Saeed M, Khan H, Samiullah, Khuda F, Karim N, Ahmad Z. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: experimental and computational studies. *J Ethnopharmacol.* **2009.** 121:175-177
- Khan, I.; Nisar, M.; Ebad, F.; Nadeem, S.; Saeed, M.; Khan, H.; Samiullah, K.; Khuda, F.; Karim, N.; Ahmad, Z. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin

- from *Smilax china* Linn.: experimental and computational studies. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 121, 175–177.
- Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo A, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik D. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanism: role of nuclear factor  $\kappa$ - $\beta$  and endoplasmic reticulum stress, *Endocrinology.* **2004**. 145:5087-96.
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, *et al.* Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle *J Clin Invest.* **2000**. 105:1791-1797.
- Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* **2001**. 276(14):
- Kim S, Claycombe KJ, Wang Y, Jones BH, Wilkison WO, Zemel MB, Chun J, Moustaid-Moussa N. Transcriptional regulation of the adipocyte fatty acid synthase gene by agouti: interaction with insulin *Physiol Genomics.* **2000**. 8;3(3):157-62.
- Kim, J.Y.; Park, S.J.; Yun, K.J.; Cho, Y.W.; Park, H.J.; Lee, K.T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 584, 175–184.
- Kim, Y.J.; Cho, S.Y.; Yun, C.H.; Moon, Y.S.; Lee, T.R.; Kim, S.H. Transcriptional activation of Cidec by PPAR $\gamma$ 2 in adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 377, 297–302.
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M., Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* **1999**. 19: 6286–96.
- Klimes, S.M. Haffner, E. Sebokova, B.V. Howard, L.H. Storlien. *Lipids and Syndromes of Insulin Resistance: From Molecular Biology to Clinical Medicine (Annals of the New York Academy of Sciences).* **1997**.
- Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol.* **2005**. 46(11):1978.
- Kougiyas P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease *J Surg Res.* **2005**. 126:121-9
- Kovacic, J.C.; Moreno, P.; Nabel, E.G.; Hachinski, V.; Fuster, V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Clinical vascular disease in the elderly. *Circulation* **2011**, 123, 1900–1910
- Kramer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M, Schmidt B, Boger RH, Forssmann WG, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin II receptor independent antiinflammatory and antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179. *Circ Res* **2002**. 90;770-776.
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, *et al.* Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* **2002**. 277(29):25863-25866.
- Laclaustra M, Corella D and Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2007**. 17: 125–39.

- Lam TK, Caepentier A, Lewis GF, van de Berve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2003.** 284:E863-73.
- Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* **1997.** 46(8):
- Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Metha JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res.* **1999.** 84:1043-10449
- Li JJ, Fang CH, Hui RT. Is hypertension an inflammatory disease? *Med Hypotheses.* **2005.** 64:236-240.
- Li JJ, Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular disease. *Med Hypotheses.* **2004.** 62: 499-506
- Li Li Y, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology.* **2007.** 113: 115–124.
- Li P, Fukuhara M, Diz DI, Ferrario CM, Brosnihan KB. Novel angiotensin II AT(1) receptor antagonist irbersartan prevents thromboxane A(2)-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* **2000.** 292;238-246.
- Lijnen HR, Maquoi E, Morange P, Voros G, Van Hoef B, Kopp F, *et al.* Nutritionally induced obesity is attenuated in transgenic mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003.** 23(1):78-84.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, *et al.* Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet.* **2002.** 360(9326):57-58.
- Ling PR, Mueller C, Smith RJ, Bistrian BR; Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metabolism.* **2003.** Jul;52(7):868-74
- Longo L y Vesapollo G. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food chemistry.* **2006.** 94: 226–231.
- Lopez JM, Bennett MK, Sanchez HB, *et al.*, Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1996.** 93: 1049–53.
- Lorenzo C, Williams K, *et al.* The National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation and World Health Organization Definitions of the Metabolic Syndrome as Predictors of incident Cardiovascular Disease and Diabetes. *Care.* **2007.** 30:8-13.
- Low Wang C, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes.* **2004.** 53: 2735-2740.
- Lowell B, Shulman I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Sc.* 2005; 307:384-387.
- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.* **2005.** 21(307):384-387.
- Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, *et al.* Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially

- dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*. **2002**. 51: 1437-42.
- Maassen JA, Romijn JA, Heine RJ. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. **2007**. 50:2036-41.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, *et al*. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* **2002**. 8(7):731-737.
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, *et al*. PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **2001**. 50(9):2094-2099.
- Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, *et al*. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med*. **2001**. 7(6):699- 705.
- Manzur F, Alvear Ciro, Alayón Norma. Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease. *Revista Colombiana de Cardiología*. **2010**. Vol. 17 No. 5.
- Marchand-Brustel YL, Gual P, Grémeaux T, *et al*. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling; *Biochem Soc Trans*. **2003**. 31:1152-1156
- Marchesi C, Paradis P and. Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008. Vol.29 No.7. 367-74.
- Marette A, Burdett E, Douen A, Vranic M, Klip A. Insulin induces the translocation of GLUT 4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes* .**1992**. 41:2562-1569.
- Maria Masori, MSc, Akiko Hamamoto MSc, Kazuaki Mawatari, Angiotensin II decreases glucose uptake by downregulation of GLUT1 in the cell membrane of the vascular smooth muscle cell line A10. *J Cardiovasc Pharmacol TM*. **2007**. 50:267-273.
- Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, *et al*. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *Faseb J*. **2001**. 15(14):2727-2729.
- Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulange A, Turban S, Saint-Marc P, *et al*. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology*. **2001**. 142(12):5220-5225.
- Matarese G. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *Eur Cyt Net*. **2000**; 11:7-14.
- Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: The link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension*. **2009**. 53:577-84.
- Mavri A, Alessi MC, Bastelica D, Geel-Georgelin O, Fina F, Sentocnik JT, *et al*. Subcutaneous abdominal, but not femoral fat expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is related to plasma PAI-1 levels and insulin

- resistance and decreases after weight loss. *Diabetologia*. **2001**. 44(11):2025-2031.
- Mavri A, Stegnar M, Krebs M, Sentocnik JT, Geiger M, Binder BR. Impact of adipose tissue on plasma plasminogen activator inhibitor-1 in dieting obese women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1999**. 19(6):1582-1587.
- McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C. elegans*: A model foreexploring the genetics of fat storage. *Dev Cell*. **2003**. 4:131-42
- McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, *et al*. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**. 87(5):2407.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008. 454: 428–35.
- Merrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein coupled receptors. *Biochem J*. **1999**. 343(Pt2):335-340.
- Mi-Kyung P, Jin-Sil P, Mi-La Cho, *et al*. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) differentially regulates Foxp3+ regulatory and IL-17+ pathogenic T cell in autoimmune arthritis. *Immunology letters*. **2011**. 135: 50-58.
- Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, *et al*. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* **2002**. 10(11):1095-1103.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **2002**. 415(6869):339-343.
- Miyazaki Y, Pipek R, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **2003**. 27:88-94.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, *et al*. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. **1997**. 82: 4196-200.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1998**. 22(12):1145-1158.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1998**. 22: 1145-58.
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. **2000**. 85:2970-3.
- Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. **2000**. 11(6):212- 217.
- Monteiro R. Chronic Inflammation in the Metabolic Syndrome: Emphasis on Adipose Tissue. In *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*. Edited by Raquel Soares and Carla Costa. **2009**. First edition. 65-84.
- Morales Villegas E. Síndrome X vs síndrome metabólico. Entendiendo sus coincidencias y sus diferencias hacia una "nueva cardiología". *Archivos de Cardiología de México*, Vol. 76. **2006**. pp. 173-188.

- Morange PE, Lijnen HR, Alessi MC, Kopp F, Collen D, Juhan-Vague I. Influence of PAI-1 on adipose tissue growth and metabolic parameters in a murine model of diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2000.** 20(4):1150-1154.
- Moreno M.J y otro. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Sis San Navarra*, Vol 25, Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL. Murray I, Havel PJ, Sniderman AD, Cianflone K. Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein. *Endocrinology* **2000.** 141(3):1041.
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, *et al.* Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parentes. *J Clin Invest.* **2005.** 115:3587-3593.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, *et al.* Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* **1991.** 351:233-326.
- Must A, Dallal G, Dietz W. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht<sup>2</sup>) and triceps skinfold thickness. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:839-46.
- Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001.** 285(2):561-564.
- Najjar, S.S.; Scuteri, A.; Lakatta E.G. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* **2005,** 46, 454–462.
- Nesto RW; Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome; *Am J Cardiovasc Drugs.* **2005.** 5:379-387
- Nilolajczyk BS, Jagannathan-Bogdan M, Shin H, Gyurko R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun.* 2011; doi:10.1038/gene:**2011.**14.
- Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship. *J Periodontol.* **2003.** 74: 97-102
- Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, Nakagawa K, Nacahara Y, Kitamura H. Angiotensin II increases plaminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expresión without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor phatway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1997. 77:1189-1195.
- Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, *et al.* Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* **1995.** 136(5):2143-2149.
- Obregon Oswaldo A, Gestine Navas C *et al.* Proteina C reactiva (PCR), Niveles de Malondialdehido (MDA) y resistencia a la insulina en la evolución de eventos aterotrombóticos agudos de pacientes con niveles bajos de lipoproteína de alta densidad (HDL). *Rev. Fac. Med.* **2007.** vol. 15, no. 2, p. 163-169. ISSN 0121-5256.



- Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, *et al*, Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing surviving expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res*. **2004**. 94:785-793.
- Olaiz G, Rivera-Dommarco J, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M, *et al*. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, Mexico.: Instituto Nacional de Salud Pública. **2006**.
- Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar-5. Salinas C, Cravioto P, *et al*. Encuesta Nacional de Salud 2000. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública. **2003**.
- Olaiz-Fernández G, Rivera D-Dommarco J, Shamah-Levy T y col Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2006. Cuernavaca Morelos México Instituto Nacional de Salud Pública. **2006**.
- Olds T, Maher C, Zumin S, Peneau S, Lioret S, Castetbon K. Evidence that the prevalence of childhood overweight is plateauing: data from nine countries. *Int J Pediatr Obes*. **2011**. 6(5-6):342-360
- Oparil S, Weber AM. Hipertensión, el riñón de Brenner y Rector. México: McGraw-Hill Interamericana. **2004**. 4; 77-94.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, *et al*. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. **1999**. 100(25):2473-2476.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, *et al*. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. **2001**. 103(8):1057-1063.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. **2011** Feb;11(2):85-97.
- Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha by transcriptional and transnational mechanism. *J Biol Chem*. **2002**. 277:48403-48409.
- Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, *et al*. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/ adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*. **2003**. 278(11):9073-9085.
- Parhofer KG and Barrett PH. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res*. **2006**. 47:1620–30.
- Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. **2005**. 69: 29-35.
- Parks EJ1, Parks EJ. Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content. *Proc Nutr Soc*. **2002**. 61(2):281-6.
- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, *et al*., Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. **1999**. 100(15):1646-52.

- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, III, Criqui M, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. **2003**. 107: 499-511.
- Pérez Miguelsanz, M.<sup>a</sup> J, Cabrera Parra, W., Varela Moreiras G. y Garaulet M. Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr Hosp*. **2010**. 25(2):207-223.
- Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006; 119:10S-15S.
- physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta*. **2003**. 1609(2):127-
- Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*. **1998**. 41(10):1241-1248.
- Pinzón JB, Serrano NC, Díaz LA, Mantilla G, Ve6. Iasco HM, Martínez LX, *et al.* Impacto de las nuevas definiciones en la prevalencia del síndrome metabólico en una población adulta de Bucaramanga, Colombia. **2007**. 27:172-9.
- Piper RC, Hess LJ, James DE. Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol* **1991**. 260:C570-C580.
- Pirola L, Johnston AM and Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. **2004**. 47: 170–84.
- Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. **2004**. 89(2):447-452. Putnam, K.; Shoemaker, R.; Yiannikouris, F.; Cassis, L.A. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **2012**, 302, H1219–H1230.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. **2007**. 21: 1443-55.
- Rahman, A.U.; Bhatti, M.K.; Akhtar, F.; Choudhary, M.I. Alkaloids of *Fumaria Indica*. *Phytochemistry* **1992**, 31, 2869–2872.
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*. **2003**. 111(2):225-230.
- Ramírez-Vargas E, Arnaud-Viñas MR, Delisle H. 8. Prevalence of the metabolic syndrome and associated lifestyles in adult males from Oaxaca, Mexico. *Salud Publica Mex*. **2007**. 49:94-102.
- Ranilla, L.G.; Kwon, Y.I.; Apostolidis, E.; Shetty, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour. Technol*. 2010, 101, 4676–4689
- Reaven GM. Insulin resistance and its consequences. In *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. D LeRoith, SI Taylor, JM Olefsky (eds). Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins. **2004**. pp. 899-915.
- Reaven GM. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia, and coronary heart disease: syndrome X revisited. In *Handbook of Physiology, Section 7 The Endocrine System, Vol. II The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. LS Jefferson, AD Cherrington, (eds). New York, Oxford University Press. **2001**. pp. 1169-1197.

- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **1988**. 37: 1595-607.
- Reaven, G.M. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* **2005**, 47, 201–210.
- Ridker PM, Gaboury CL, Conclin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusión of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation.* **1993**. 87:1969-1973.
- Rivera-Dommarco J, Shamah T, Villalpando-Hernandez S, Gonzalez de Cossio T, Hernandez B, Sepulveda J. Encuesta Nacional de Nutricion. 1999. Cuernavaca, Mor., Mexico: INSP, SSA, INEGI; **2001**.
- Rodríguez CA. Factores ambientales y propagación de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia*) especie forestal no maderable de uso tradicional en Veracruz. Tesis. Xalapa- Veracruz. **2010**.
- Roger S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Handerson MA, Soeller WC, *et al.* Identification of a novel glucose transporter-like protein GLU12. *Am J physiol Endocrinol Metab.* **2002**. 282:E733-E738.
- Romanski SA, Nelson RM and Jensen MD. Meal fatty acid uptake in adipose tissue: gender effects in nonobese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2000**. 279: E455–62.
- Ron D, Brasier AR, McGehee RE, Jr., Habener JF. Tumor necrosis factor induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest.* **1992**. 89(1):223-233.
- Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Volanakis JE, Damm D, *et al.* Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science.* **1989**. 244(4911):1483-1487.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes.* **2002**. 51(11):3176-3188.
- Rubio AF. Fisiopatología. En Rubio AF editor. Hipertensión arterial. México: El Manual Moderno. **2005**. pp9-24.
- Rzedowski CG, Rzedowski J. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. **1994**. Fascículo 26.
- Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology.* **2001**. 142(1):487-492.
- Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Philajamäki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, *et al.* Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation.* **2004**. 110:3842-8.
- Sanchez Muñoz, Fausto y otros. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx* Vol.141 No. 6, **2005**.

- Sanchez-Castillo CP, Velazquez-Monroy O, Berber A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyer R, James WP. Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Health Survey. 2000. *Obes Res.* **2003**. 11(3):442-451.
- Sandler S, Bendtzen K, Eizirik DL, Welsh M. Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology.* **1990**. 126(2):1288-1294.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, *et al.* Resistin/ Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* **2001**. 50(10): 2199-2202.
- Schafer K, Fujisawa K, Konstantinides S, Loskutoff DJ. Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. *Faseb J.* **2001**. 15(10):1840-1842.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* **2003**. 14: 281-7.
- Schneider H, Dietrich E, Venetz W. Trends and Stabilization up to 2022 in Overweight and Obesity in Switzerland, Comparison to France, UK, US and Australia. *Int J Environ Res Public Health.* **2010**. 7(2):460-472.
- Secretaria de Salud. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. México, D.F.: Dirección de Epidemiología - Secretaria de Salud. **1993**.
- Seedek H, Llinas T, Drummond H, Fortepiani L, Abram R, Alexander T, *et al.*, Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension; hypertension. **2003**. 42:806-810.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* **2002**. 51(12):3391-3399.
- Sepulveda-Amor J, Angel Lezana M, Tapia-Conyer R, Luis Valdespino J, Madrigal H, Kumate J. Nutritional status of pre-school children and women in Mexico: results of a probabilistic national survey. Spanish. *Gaceta Médica de Mexico.* **1990**. 126(3):207-24.
- Shao B, Guo H, Cui Y, Ye M, Han J, Guo D. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry.* **2007**. 68:623-630
- Sharma AM, Staels B. Review. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue-understandig obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007**. 92:386-95.
- Sharma N, Okere I, Duda M, Chess D, O'shea K, Stanley W;; Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy; *Cardiovascular Research.* **2006**. 73:257-268.
- Shevac E.M., From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells, *Immunity.* **2006**. pp. 195–201.
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, *et al.* Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997**. 94(9):4637-4641.
- Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1998**. 95(5):2498-2502.
- Shimano H, Yahagi N., Amemiya Kudo M., Hasty A.H., Osuga J., Tamura Y., Shionoiri F., Iizuka Y., Ohashi K., Harada K., *et al.* Sterol regulatory element-binding

- protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* **1999**. 274:35832–35839
- Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. **1999**. 401(6748):73-76.
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmako Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*. **2000**. 77-86.
- Skidgel RA, Erdos EG. Biochemistry of angiotensin I converting enzyme. En: Nicholls MG, Robertson JS (ed). *The renin-angiotensin system*. London:Gower Medical, **1993**:10.1-10.10.
- Skidgel RA, Erdos EG. The broad substrate especificity of human angiotensin I-converting enzyme. *Clin Exper Hyperten*. **1987**. A9:243-259.
- Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G. A promoter Soares MR, Costa Viana PS, *et al.*: Antihypertensive, vasodilatator and antioxidants effects of vinifera grape-skin extract. *J Pharm Pharmacol*. **2002**. 54: 1515–1520.
- Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. **2008**. May;124(1):13-22
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, *et al.* Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. **2003**. 361(9353):226-228.
- Steckelings U, Lebrum C, Qadri F, *et al.* Role of brain angiotensin in cardiovascular regulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. **1992**. 19(suppl 6):S72-S79.
- Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin ceptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. **1997**. 272(2):971-976.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. **2001**. 409(6818):307-312.
- Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance.
- Stevens G, Dias RH, Thomas KJA, Rivera JA, Carvalho N, Barquera S, *et al.* Characterizing the Epidemiological Transition in Mexico: National and Subnational Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *PLoS Med*. **2008**. 5(6):e125.
- Sunil K. Panchal and Lindsay Brown. RodentModels forMetabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2011**. Article ID 351982, 14 pagesdoi:10.1155/2011/351982.
- Suzuki H, Motley ED, Franck GD, *et al.* Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requiriment. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agentes*. **2005**. 3:305-322.
- Suzuki T, Hirata K, Elkind MSV, *et al.* Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan study (NOMAS) *American Heart Journal*. **2008**. 156(2):405–410.

- Takata K, Kasahara, T, Kasahara M, Ezaki O, Hirano H. Localization of erithrocyte HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in human placental villi. *Cell Tissue Res* **1992**. 267:407-412.
- The Diabetes Preventions Program Research Group. Impact of lifestyle and metformin therapy on cardiovascular risk factors and events in the diabetes Prevention Program. *Diabetes*. **2003**. 52 (Suppl 1):A169.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. **2006**. 6: 772-83.
- Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, *et al*. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase
- Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. **2000**. 290(5489):134-138.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. **1998**. 93(2):241-252.
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* **2000**. 35:927-945.
- Touyz R, Berry C; Recent advances in angiotensin II signalin, *Braz J Med Biol Res*. **2002**. 35: 1001-1015.
- Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hipertension*. 200. 444,248–252.
- transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes*. **2002**. 51(6):1876-1883.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. **2004**. 92, 374-355.
- Trends Endocrinol Metab* 2002. 13(1):18-23.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P., Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. **2003**. 2882-7.
- Tsakiridis T, Vranic M, Klip A. Disassembly of the actin network inhibits insulin dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J Biol Chem*. **1994**. 269:29934-29942.
- Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol*. **2002**. 440(2-3):213-221.
- Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, Waesberghe JHT, Schindhelm RK, *et al*. Pancreatic fat content and  $\beta$ -Cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **2007**. 30:2916-2921.
- Unger T, Chung O, Csikos T, *et al*. Angiotensin receptors. *J Hypertens*. **1996**. 14:S95-S103.
- Valen G, Yan Z, Hanson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol*. 2001. 38:307-314. Calabró P. Willerson JT, Yeh ETH. Inflammatory cytokines stimulated C reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. **2003**. 108:1930-1932

- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Cianflone K, Degerman E, Hoffstedt J, Nilsell K, *et al.* Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J Biol Chem.* **1999.** 274(26):18243-18251.
- Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* **2008.** 39:715-28.
- Vazquez-Vela, MEF.; Torres, N.; Tovar, AR. "White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity". *Archives of Medical Research.* **2008.** 39(8):715-728.
- Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol.* **2005.** 166:1265–71.
- Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Resistin: a new link between obesity and insulin resistance?. *Clin Endocrinol (Oxf).* **2001.** 55(4):437-8.
- Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett.* **2002.** 532(3):345-350.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* **2008.** 8(7):523-32.
- Voss LD, Metcalf BS, Jeffery AN, Wilkin TJ. IOTF thresholds for overweight and obesity and their relation to metabolic risk in children (EarlyBird 20). *Int J Obes (Lond).* **2006.** 30(4):606-9.
- Wang D, Sul HS. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem.* **1998.** 273(39):25420-6.
- Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.* **2002.** 87(6):2520-2524.
- Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium diverse signals and effects. *Hypertension.* **2005.** 45:163-169.
- Watson TD, Caslake MJ, Freeman DJ, *et al.* Determinants of LDL subfraction distribution and concentrations in young normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb.* **1994.** 14(6):902-10.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* **2003.** 112(12):1796-1808.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* **2003.** 112:1785-8.
- WHO. Measuring change in nutrition status: Guidelines for assessing the nutritional impact of supplementary feeding programs. Geneva: World Health Organization. **1983.** Report 845.
- WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva: WHO (Technical Report Series No. 894). **2000.**
- WHO. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization. **1995.** Report 845.
- Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* **2005.** 26(2): 19–39.

- Wojtczak L, Schonfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. **1993**. 1183: 41-57.
- Wolf, G “Brown adipose tissue: the molecular mechanism of its formation”. *Nutr Rev*. **2009**. 67(3):167-71.
- Wong CP, Nguyen LP, Noh SK, *et al*. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett*. **2011**. Sep 30;139(1-2):7-13.
- World Health Organization (WHO). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, Resolution of the Fifty-seventh World Health Assembly. Geneva: World Health Organization. **2004**.
- Wozniak, SE.; Gee, LL.; Wachtel, MS.; Frezza, EE. “Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article”. *Digestive Diseases and Sciences*. **2009**. 54(9):1847-1856.
- Wright, J.W.; Mizutani, S.; Harding, J.W. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. *Heart Fail. Rev*. **2008**, 13, 367–375.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, *et al*. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. **2006**. 126(2):375-87.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, *et al*., FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. **2006**. 126(2):375-87.
- Xiang L, Marshall GD Jr. Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroimmunomodulation*. **2011**. 18(1):1-10.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, *et al*. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. **2003**. 112(12):1821-1830.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, *et al*. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J Clin Invest*. **2002**. 112: 1821-30.
- Xu H, Hirosumi J, Uysal KT, Guler AD, Hotamisligil GS. Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology*. **2002**. 143(4):1502-1511.
- Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P, Hotamisligil GS. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of Yamagishi S, Nakamura K, Jinnouchi Y, Takenaka K, Imaizumi T. Molecular mechanisms for vascular injury in metabolic syndrome. *Drugs Exptl Clin Res*. **2005**.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, *et al*. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. **2003**. 423(6941):762-769.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, *et al*. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002. 8(11):1288-1295.
- Yanovski S, Yanovski J. Obesity Prevalence in the United States Up, Down, or Sideways? *N Eng J Med*. 2011. 364(11):987-989.



- Yiannikouris, F.; Gupte, M.; Putnam, K.; Thatcher, S.; Charnigo, R.; Rateri, D.L.; Daugherty, A.; Cassis, L.A. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. *Hypertension* 2012, 60, 1524–1530.
- Yu YH, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *CircRes*. **2005**. 96: 1042-52.
- Yudkin J, Stock A. Nutrient intake of subjects on low carbohydrate Diet Used in Treatment of Obesity; *The American Journal of Clinical Nutrition*. **1970**. 23:948-952.
- Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 2007. 39: 707-9.
- Yusuf, I.; Yamaoka, K.; Otsuka, H.; Yamasaki, K.; Seyama, I. Block of sodium channels by tyramine and its analogue (N-feruloyl tyramine) in frog ventricular myocytes. *Jpn. J. Physiol.* 1992, 42, 179–191.
- Zak A, Tvrzická E, Vecka M, Jáchymová M, Duffková L, Stanková B, *et al*. Severity of metabolic syndrome unfavorably influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. *Tohoku: J Exp Med*. **2007**. 212:359-371.
- Zak A, Tvrzická E, Vecka M, Jáchymová M, Duffková L, Stanková B, *et al*. Severity of metabolic syndrome unfavorably influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. *Tohoku: J Exp Med*. **2007**. 212:359-371.
- Zhang L, Liao CC, Huang HC, Shen YC, Yang LM, Kuo YH. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. *Phytochemistry*. **2008**. 69:1398-1404.
- Zhang QF, Zhang ZR, Cheung HY. Antioxidant activity of *Rhizoma Smilacis Glabrae* extracts and its key constituent-astilbin. *Food Chemistry*. 2009. 115:297–303.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*.1994. 372:425–432.
- Zhang, L.; Liao, C.C.; Huang, H.C.; Shen, Y.C.; Yang, L.M.; Kuo, Y.H. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. *Phytochemistry* 2008, 69, 1398–1404.
- Zhang, L.; Liao, C.C.; Huang, H.C.; Shen, Y.C.; Yang, L.M.; Kuo, Y.H. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. *Phytochemistry* **2008**, 69, 1398–1404.
- Zhong L, Georgia S, Tschén SI, Nakayama K, Bhushan A. Essential role of Skp2-mediated p27 degradation in growth and adaptive expansion of pancreatic  $\beta$ -cells *J Clin Invest*. **2007**. 117:2869-2876.
- Zimmer P, Boyko EJ, Collier GR, de Courten M. Etiology of the metabolic syndrome, potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. *Ann NY Acad Sci*.**1999**. 892:25-44.

Article

## Hypoglycemic and Hypotensive Activity of a Root Extract of *Smilax aristolochiifolia*, Standardized on N-*trans*-Feruloyl-Tyramine

Carol Arely Botello Amaro <sup>1,2</sup>, Manasés González-Cortazar <sup>1</sup>, Maribel Herrera-Ruiz <sup>1</sup>, Rubén Román-Ramos <sup>3</sup>, Lucia Aguilar-Santamaría <sup>1</sup>, Jaime Tortoriello <sup>1</sup> and Enrique Jiménez-Ferrer <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, C.P. 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico; E-Mails: carolarely@hotmail.com (C.A.B.A.); gmanases@hotmail.com (M.G.-C.); cibis\_herj@yahoo.com.mx (M.H.-R.); llasmusic@hotmail.com (L.A.-S.); jtortora2@yahoo.es (J.T.)

<sup>2</sup> Programa de Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, México D.F., Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, México D.F., Mexico; E-Mail: rrr@xanum.uam.mx

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: enriqueferrer\_mx@yahoo.com; Tel.: +52-777-361-215-5.

Received: 17 June 2014; in revised form: 30 June 2014 / Accepted: 1 July 2014 /

Published: 31 July 2014

---

**Abstract:** The metabolic syndrome (MS) is a condition consisting of various metabolic abnormalities that are risk factors for developing kidney failure, cardiovascular, vascular and cerebrovascular diseases, among others. The prevalence of this syndrome shows a marked increase. The aim of this study was to investigate the pharmacological effect of *Smilax aristolochiifolia* root on some components of MS and obtain some of the active principle using chromatographic techniques. The compound isolated was N-*trans*-feruloyl tyramine NTF (1), and its structure was determined by spectroscopic and spectrometric analyses. The whole extract and the standardized fractions were able to control the weight gain around 30%; the fraction rich in NTF was able to decrease the hypertriglyceridemia by 60%. The insulin resistance decreased by approximately 40%; the same happened with blood pressure, since the values of systolic and diastolic pressure fell on average 31% and

37% respectively, to levels comparable to normal value. The treatment also had an immunomodulatory effect on the low-grade inflammation associated with obesity, since it significantly decreased the relative production of pro-inflammatory cytokines regarding anti-inflammatory cytokines, both kidney and adipose tissue. Therefore it can be concluded that the extract and fractions of *Smilax aristolochiifolia* root with NTF are useful to counteract some symptoms of MS in animal models.

**Keywords:** N-*trans*-feruloyl-tyramine; *Smilax aristolochiifolia* Smilacaceae; metabolic syndrome

---

## 1. Introduction

The metabolic syndrome (MS) is a complex and heterogeneous clinical entity that includes obesity, hyperglycemia, hypertriglyceridemia and elevated blood pressure [1]. Its expression is strongly influenced by environmental, social, cultural and economic factors [2]. The parallel increase of the frequency of the metabolic syndrome and obesity is a worldwide phenomenon, particularly important in México [3]. These pathologies are major risk factors for developing coronary heart disease, heart failure and cerebrovascular atherosclerosis [1], which are the leading cause of death in the country [4]. Obesity appears to be one of the most important factors for triggering MS [5]. By controlling the pathophysiological alterations that are included in the MS, the morbidity and mortality of this syndrome is reduced [6].

It has been shown that mice of the C57/BL/6 strain respond in a relatively short time to a high-caloric diet (saturated fat and carbohydrates) developing several parameters of MS (obesity, hypertension, insulin resistance and hypertriglyceridemia) [7]. The morbidly obese condition generates a state of low-grade inflammation, which differs from the states of chronic and acute inflammation, and alters the levels of pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  [8] regarding anti-inflammatory cytokines like IL-10. In addition, angiotensin II (AGII) was administered at a low dose to produce endothelial damage, since this produces an inflammatory response, and it was maintained throughout the period of time in which the drug was administered [9].

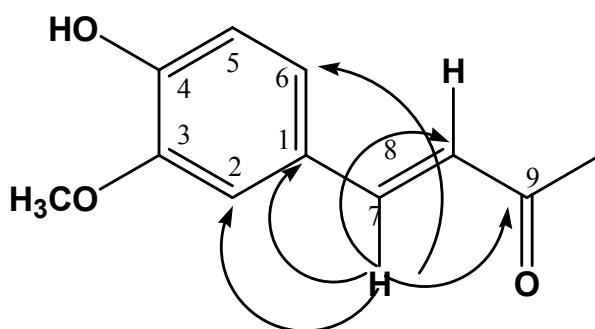
There are reports in the literature of some chemical compounds in the genus *Smilax*, such as steroidal saponins with anti-inflammatory properties [10], flavonoids with anti-oxidant [11] and anti-fungal [12] activity. The root of *Smilax aristolochiifolia* Miller (Smilacaceae) is widely used in the food industry as a flavoring; its medicinal use is indicated for weight loss, as diuretic, anti-diabetic, sudorific and depurative [13]. The aim of this study was to evaluate the pharmacological effect of extracts of *S. aristolochiifolia* on some degenerative components of MS and the underlying inflammatory condition, in a model of MS induced by high-caloric diet and chronic administration of AGII.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemical Characterization

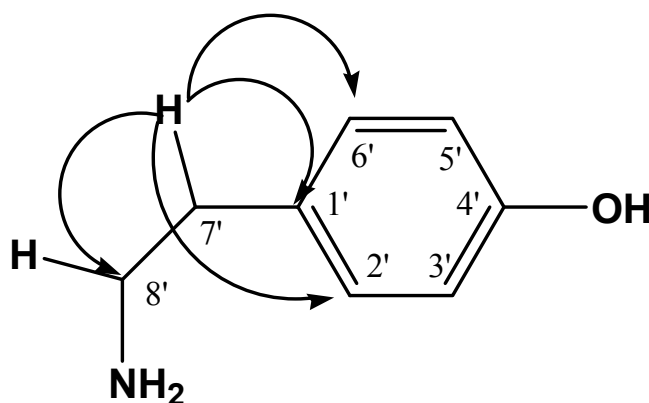
Chromatographic fractionation of the F2, allowed us to obtain compound **1** as a yellow precipitate, soluble in methanol, with a melting point of 74–75 °C. In the UV-vis spectrum, the compound showed the following  $\lambda_{\text{max}}$ : 220, 293, and 318 nm. The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum showed four systems: an aromatic ABX system [ $\delta$  7.10 (1H, d,  $J = 2$  Hz), 6.79 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz) and 7.0 (1H, dd,  $J = 2, 8.2$  Hz)] assigned a H-2, H-5 and H-6 respectively; another aromatic  $\text{A}_2\text{B}_2$  system [ $\delta$  7.05 (2H, d,  $J = 6.8$  Hz) and 6.72 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz)] assigned H-2', H-6' and H-3', H-5' respectively; a *trans* double bond AB system [ $\delta$  7.43 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz) and 6.40 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz)] assigned a H-7 and H-8 respectively, and a AB system [ $\delta$  2.75 (2H, dd,  $J = 7.1, 7.5$  Hz) and 3.46 (2H, dd,  $J = 7.2, 6.5$  Hz)] assigned a H-7' and H-8' respectively. According to a HMBC experiment, H-7 ( $\delta$  7.43) correlated at two and three bonds with five carbon signals at  $\delta$  128.39, 111.6, 123.33, 118.8 and 169.28 which are assigned to C-1, C-2, C-6, C-8 and C-9 respectively, indicating the presence of a *trans*-feruloyl group (see Figure 1).

**Figure 1.** HMBC correlations of H-7.



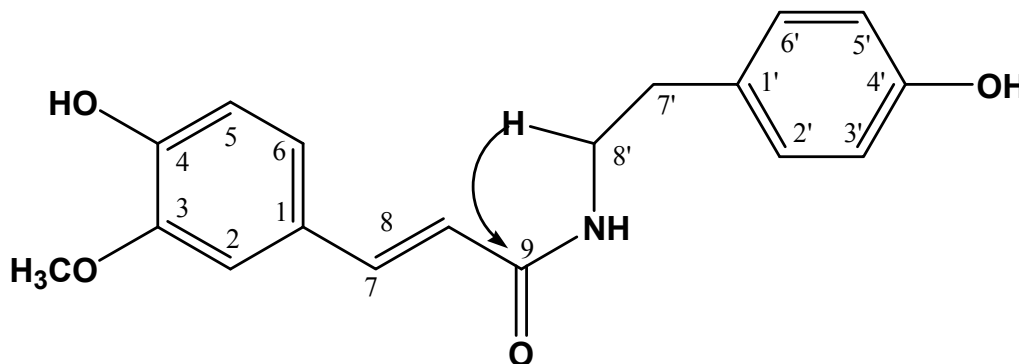
On the other hand the signal of H-7' ( $\delta$  2.75) correlated to  $J_{2-3}$  with four signals  $^{13}\text{C}$  in  $\delta$  131.41, 130.85, 130.85 and 42.66 assigned to C-1', C-2', C-6' and C-8' respectively, indicates the presence of ethyl benzene (see Figure 2).

**Figure 2.** HMBC correlations of H-7'.



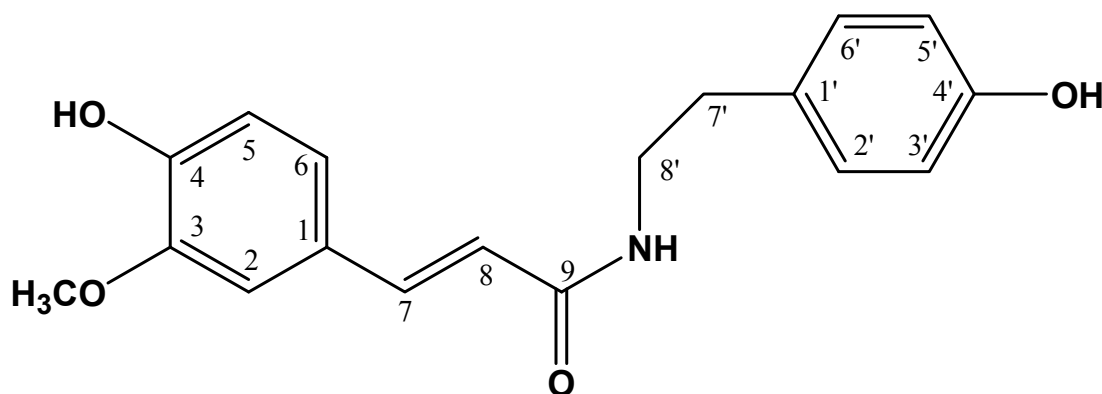
Additionally, the signal H-8' ( $\delta$  3.46) is attached to a group containing a nitrogen atom for its chemical shift. This allowed us to determine the presence of a terminal amine group, forming the skeleton of tyramine. This group is attached to the *N-trans*-feruloyl moiety, according to the observed coupling of H-8' to  $J_{2,3}$  with the signal of the C-9 carbonyl group (169.28) of an amide ester (see Figure 3).

**Figure 3.** HMBC correlations of H-8'.



In conformity with NMR analysis data and comparison of the literature data [14], the chemical structure was established as *N-trans*-feruloyltyramine or NTF (**1**) (see Figure 4).

**Figure 4.** Chemical structure of *N-trans*-feruloyltyramine.



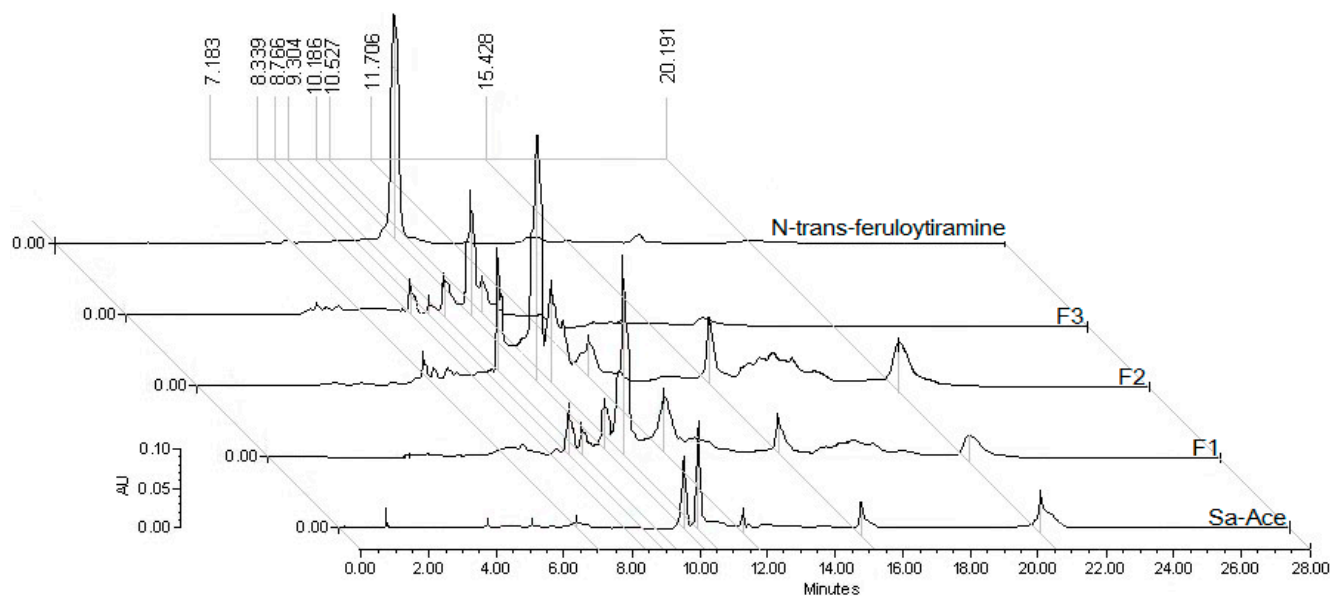
The mass spectrum gave a molecular ion of  $m/z$  314  $[M + H]^+$ , 192 [M-ethylbenzene], 177 [M-ethylaminobenzene]. This compound has not been reported previously for *S. aristolochiifolia*. However, phenylethylcinnamide has been isolated from other species, and possesses activities such as antioxidative [15,16],  $\alpha$ -glucosidase inhibitor [17] and antiarrhythmic [18]. It was used for the standardization of the extract of *S. aristolochiifolia* by HPLC and the content of NTF in each sample of mg/g of extract was: acetone extract (AceSa, 2.77), F1 (2.63), F2 (60.22), F3 (8.76).

## 2.2. Chemical Analysis

The analysis by HPLC showed a different chromatographic profile of samples from *S. aristolochiifolia* (Figure 5). The retention time (RT) for NTF is 10.18 min, and the AUC for the peak of this compound in each sample indicated that the fraction F2 contains a higher concentration of NTF than AceSa, F1 or F3. The calibration curve allowed us to calculate the doses of NTF administered in each treatment.

AceSa was administered at a dose of 69.25 µg/kg, F1 65.75 µg/kg, F2 600 µg/kg, and F3 219 µg/kg (see Figure 5).

**Figure 5.** Chromatographic profile by HPLC of different samples from *Smilax aristolochiifolia* (AceSa, F1, F2 and F3, and *N-trans-feruloyl-tyramine* which had a RT = 10.186 min).



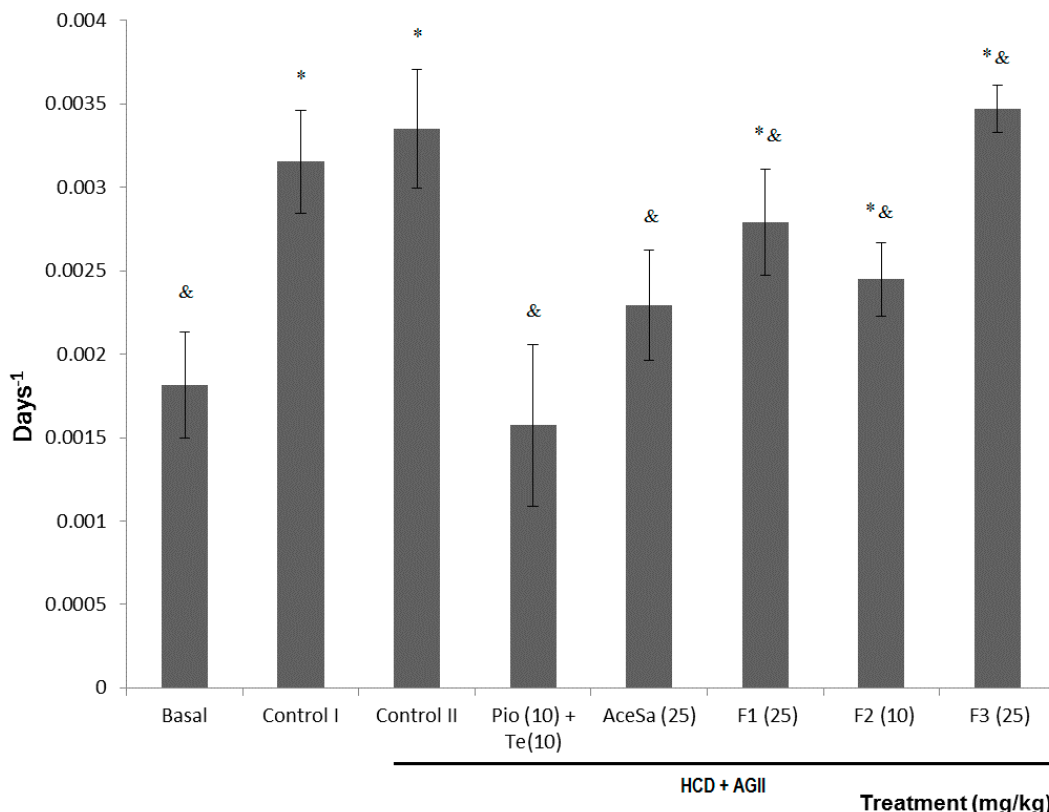
### 2.3. Pharmacological Characterization

The effect of the administration of a high-caloric diet (HCD, control I group) for 20 weeks was compared against the effect of a regular diet (basal group) and against the negative control of the experiment (HCD + AGII, control II group). In both cases, a twofold increase was observed in growth rate values (which corresponds to the slope of the logarithmic phase of the change of weight with respect to time in days) compared to the values observed in the basal group; these data were significantly different from those of the basal group (\*  $p < 0.05$ ) (see Figure 6).

The treatments with AceSa extract and positive control (Pio + Tel) showed no significant change ( $p > 0.05$ ) compared to baseline conditions. But when these groups were compared with the damage group (control II) it is showed a significant decrease ( $p < 0.05$ , Figure 6). Although the effect of F1, F2 and F3 was lower than AceSa and it was significantly different from the basal group (\*  $p < 0.05$ ), these treatments also induced a statistically decrement of the growth velocity curve with respect to the control II group ( $p < 0.05$ ).

Mice fed with a regular diet (basal) showed an increment dependent on the increase of lean tissue, reaching a value of body density of  $1.05 \pm 0.02$  g/mL (Figure 7). In the groups with HCD or HCD + AGII, control group I and II respectively, was observed a significant decrement of the body density with respect to the basal group (\*  $p < 0.05$ ); this effect results from the increase in weight that can be calculated from the values in the growth rate (Figure 6).

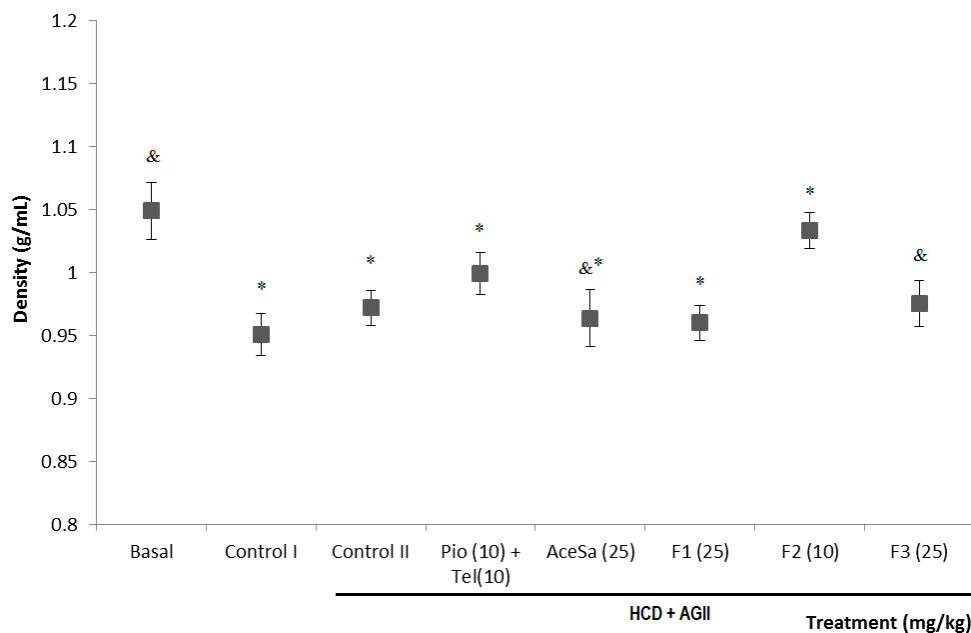
**Figure 6.** Effect of different treatments on the growth rate of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSa, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet. ANOVA followed by Tukey *post-test* (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ); \*  $p < 0.05$  (in comparison with the basal group), &  $p < 0.05$  (in comparison with control II).



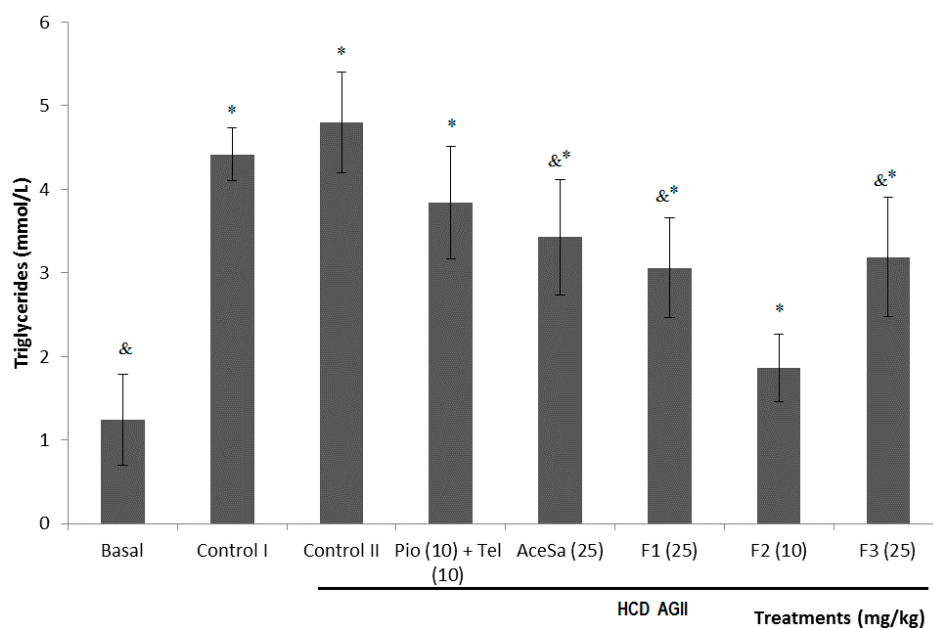
The treatments AceSa, F1 and F3 from *S. aristolochiifolia* did not prevent the effect of HCD and AGII on the body density. Data from these groups were significantly different from the basal (Figure 7, \*  $p < 0.05$ ), but not from the damage group (Figure 7, \*  $p > 0.05$ ). However, the fraction F2 and the positive control group (Pio + Tel) were able to inhibit the decrement of body density induced with HCD and AGII. This effect was different to the damage group (HCD + AGII, &  $p < 0.05$ ), but statistically similar to the basal ( $p > 0.05$ ).

Hypertriglyceridemia is a cardinal alteration of MS associated with dyslipidemia. In this work, the administration of HCD and HCD + AGII caused a significant increase (\*  $p < 0.05$ ) in the concentration of plasma triglycerides, which increased in respect to the basal group up to 3 and 4 times, respectively. Although the treatments from *S. aristolochiifolia* were higher and statistically different to basal group (\*  $p < 0.05$ ), they provoked a statistical significant diminish of the triglyceride serum concentration in regard to the damage group with HCD + AG II (&  $p < 0.05$ ), and it was worth noting that the group of mice treated with F2 responded better, given that the triglycerides were lower than HCD + AG II but statistically equal to basal (Figure 8), while the group with Pio + Tel, did not diminish this parameter in respect to the control II group ( $p > 0.05$ , Figure 8).

**Figure 7.** Effect of different treatments on the body density of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSa, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet. ANOVA followed by Tukey *post-test* (mean ± SD, *n* = 10); \* *p* < 0.05 (in comparison with the basal group), & *p* < 0.05 (in comparison with control II).



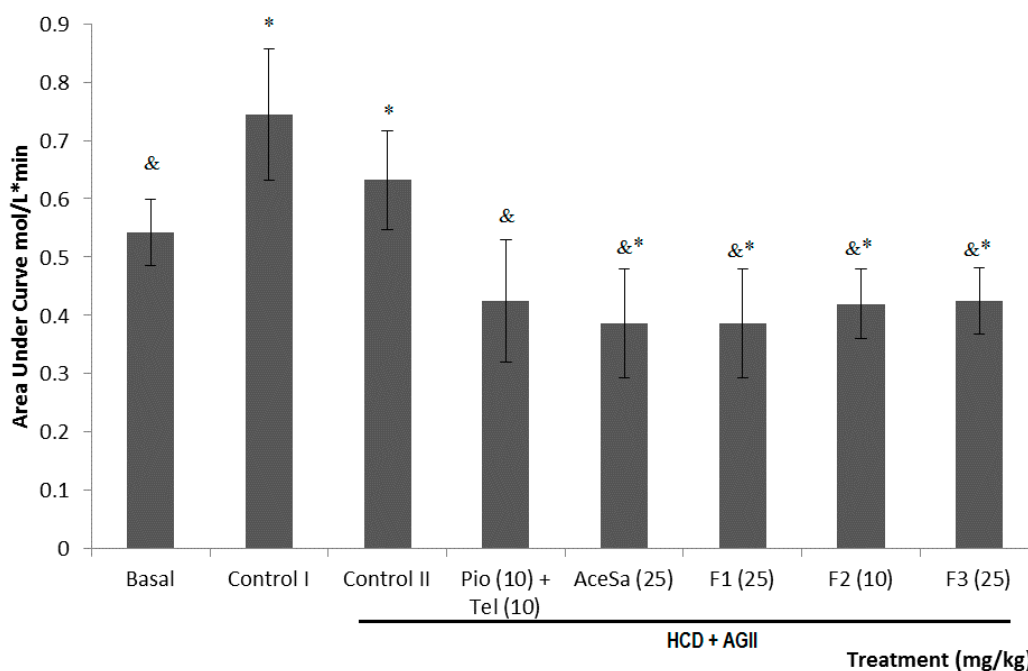
**Figure 8.** Effect of different treatments on the serum concentration of triglycerides of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSA, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet. ANOVA followed by Tukey *post-test* (mean ± SD, *n* = 10); \* *p* < 0.05 (in comparison with the basal group), & *p* < 0.05 (in comparison with control II).





Another component of MS is the insulin resistance that leads to type 2 diabetes mellitus. This parameter is shown as the area under the curve (AUC) of plasma glucose concentration with the administration of a dose of insulin. The animals exposed to both HCD and HCD + AGII showed a significant increment value of the AUC respect to basal (\*  $p < 0.05$ , Figure 9). All treatments from *S. aristolochiaefolia* decreased the insulin resistance parameter by decreasing the value of AUC data, that were statistically different to the group with damage (&  $p < 0.05$ , Figure 9). The positive control treatment (Pio + Tel) was the best to cause a decrement of this parameter (&  $p < 0.05$ ), even with a greater reduction than the observed for the basal (\*  $p < 0.05$ ).

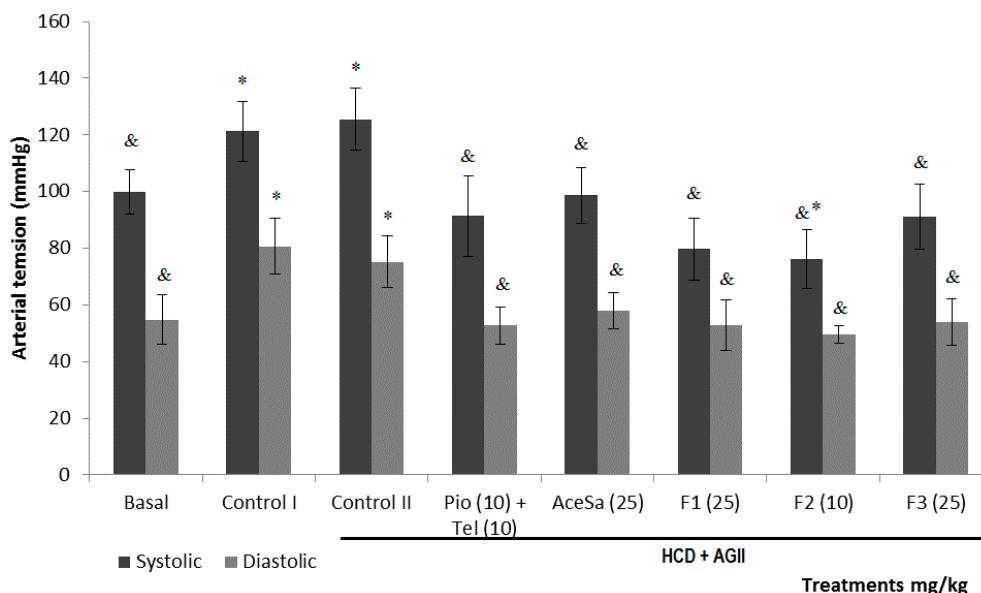
**Figure 9.** Effect of different treatments on the insulin resistance (measured as the area under the curve) of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSA, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet. ANOVA followed by Tukey *post-test* (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ); \*  $p < 0.05$  (in comparison with the basal group), &  $p < 0.05$  (in comparison with control II).



When the diastolic (DBP) and systolic (SBP) blood pressure were measured, it was observed that groups of mice with HCD or HCD + AGII showed a substantial and statistically significant increase in both, in comparison to the basal situation (\*  $p < 0.05$ , Figure 10). This increment was controlled with the administration of extract (AceSa) and fractions (F1, F2 and F3) from *S. aristolochiifolia* to different animal groups; therefore a decrease of SBP and DBP could be observed (&  $p < 0.05$ , Figure 10).

The levels of cytokines were quantified in kidney and adipose tissue from animals with different experimental conditions associated with MS. The kidney administration of treatments and HCD or HCD + AGII established an inflammatory environment, in comparison to the basal conditions (Figure 11a). When this inflammatory process was evaluated in the groups of mice with extract or fractions from *S. aristolochiifolia* (Figure 11a), a decrease of the pro-inflammatory conditions was generally observed, in the same way as it happened with the positive control treatment (Pio + Tel).

**Figure 10.** Effect of different treatments on systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSA, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet. ANOVA followed by Tukey *post-test* (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ ); \*  $p < 0.05$  (in comparison with the basal group), &  $p < 0.05$  (in comparison with control II).



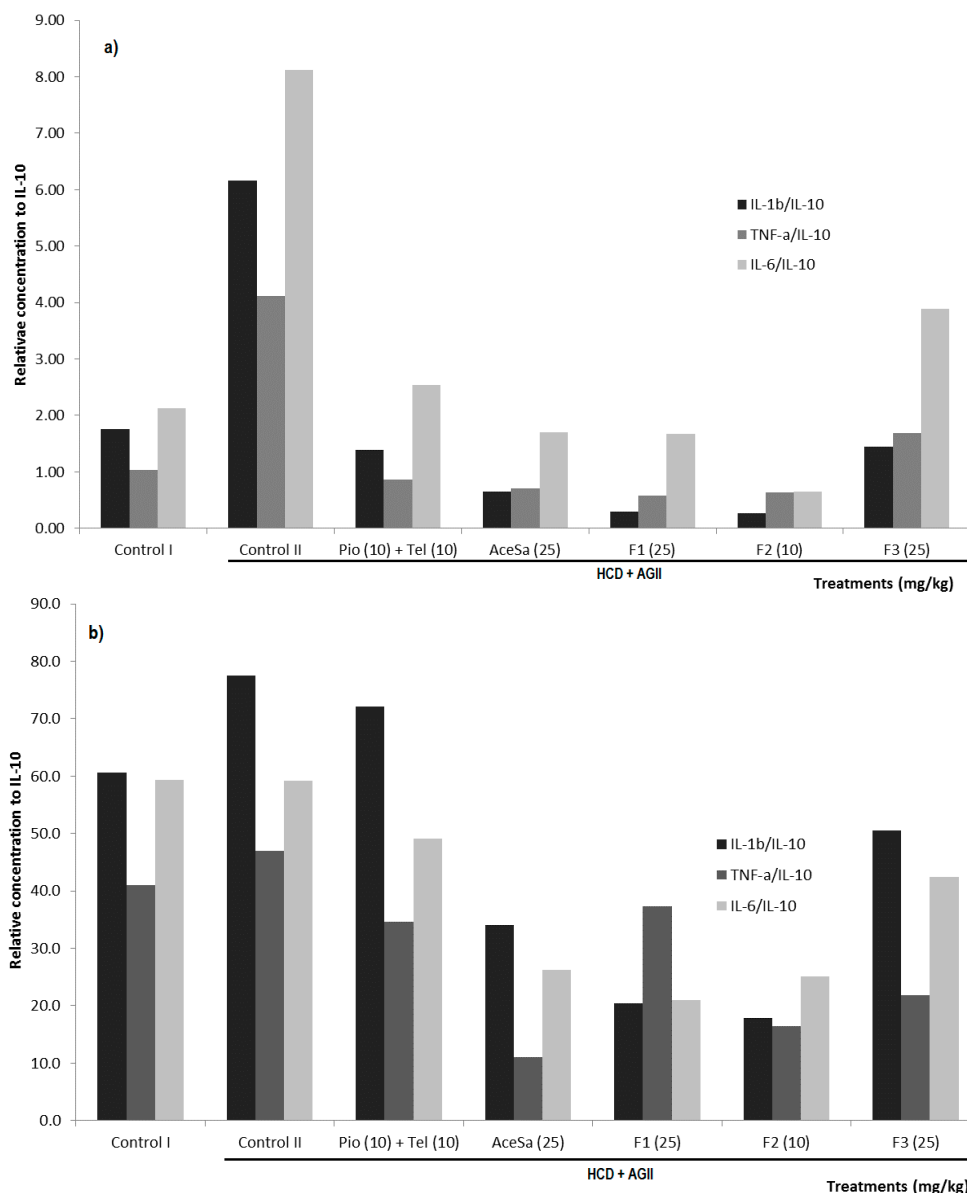
In regard to the response of the adipose tissue that can be observed in Figure 11b, both treatments HCD and HCD + AGII had a similar effect. Positive control treatment (Pio + Tel) was not able to decrease the pro-inflammatory response in adipose tissue (Figure 11b), in contrast to mice with treatments from *S. aristolochiifolia* which generally showed decreased tissue pro-inflammatory responses, although fraction F3 did so to a lesser extent (Figure 11b).

In this work, a high-caloric diet was administered to C57BL6 mice, control group I, increasing their weight gain and generating damage associated with MS: overweight, hyperglycemia, hypertension, and hypertriglyceridemia. These alterations may eventually cause vascular damage, but not necessarily because of the short period of exposure time. Due to the above control group II that was used, potential vascular disorders associated with SM ailments were exacerbated with the chronic administration of the potent vasoconstrictor AG II. The latter caused the establishment of organic damage to vasculature, through the oxidative stress and inflammatory processes in endothelial cells.

The increase in glucose concentration, triglycerides and chronic hypertension associated with obesity and diabetes is the major pathological factor for endothelial dysfunction, which is a key element of the mechanisms underlying vascular disease [19]. It is also a predictor of clinical events that have a high rate of comorbidity, such as cerebral vascular accidents [20,21], mainly due to the fact that endothelial cells play an important role in regulating vascular structure and function [19].

Obesity is a risk factor for the development of hypertension and dyslipidemia. Weight gain induced by HCD produces an increase in the plasma concentrations of AG II, which raises systolic blood pressure in male mice [22]. Adipocytes, the main cells of adipose tissue, are capable of expressing angiotensinogen and angiotensin peptides [22].

**Figure 11.** Effect of different treatments on concentration of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 with respect to the concentration of IL-10, in kidney (a) and fat tissue (b) of C57/BL-6 mice exposed to hypercaloric diet and chronic angiotensin II (control II): acetone extract of *Smilax aristolochiifolia* (AceSa), fractions F1, F2 and F3 from AceSA, pioglitazone and telmisartan (Pio + Tel). Control I = hypercaloric diet.



In humans, AG II produced by adipocytes seems to inhibit the differentiation of adipocyte precursors, decreasing the percentage of small adipocytes sensitive to insulin. Thus, the storage capacity of lipids in the adipose tissue is reduced, and the triglycerides can accumulate in the liver and in the skeletal muscle, contributing to insulin resistance [23]. Besides, the steady increase in the level of AGII producing a prolonged vascular constriction induces release of aldosterone, retention of sodium and water and increase of fluids, ultimately leading to a state of hypertension [24]. Thus, a chronic imbalance of AG II regulation induces chronic hypertension and vascular damage, as well as dyslipidemia and hyperglycemia; this was reproduced in the model used in this work with an HCD and AG II diet. Prolonged hyperglycemia and insulin resistance result in hyperinsulinemia; it up-regulates

the components of the renin-angiotensin system and sharpens the pro-inflammatory and pro-fibrotic condition mediated by AG II, which is associated with macrovascular complications of diabetes. The imbalance of RAS due to the increase of AG II in tissues such as kidney, liver and adipose tissue by hyperglycemia may contribute to hypertension associated with MS and to the organ damage observed in diabetes mellitus II [23].

The data obtained in this work showed for the first time the effect of *S. aristolochiifolia* on an injury model associated with MS. The previous pharmacological use of this plant indicated only the diuretic effect [14]. There are other works which have shown that species of the same genus induced a beneficial effect on different alterations associated to MS. For example, *S. officinalis*, inhibits  $\alpha$ -glucosidase enzymes and possesses an antioxidant effect [25]; *S. canariensis* has a diuretic effect [26]; *S. aspera* and *S. china* Linn decrease the plantar inflammation induced by carrageenan [27,28]. The latter possesses the compound sieboldogenin that inhibits the activity of lipoxygenase [28]. Glycosides (smilasides G-L) from *S. bracteata* have scavenger activity against DPPH radicals [29] and *S. glabra* has shown a hypoglycemic effect in a test of insulin tolerance in mice [30].

In the present study, the administration of the AceSa extract and fractions F1, F2 and F3 from *S. aristolochiifolia* were an effective treatment to control the major alterations associated with the MS, in C57BL6 mice with damage induced by HCD and chronic administration of AG II. This is the case of the AceSa extract, which counteracted the effect of the HCD diet and AG II on the growth curve (corroborated by the decrease of body density), and kept the animals under conditions similar to those of the baseline group. This effect was also observed in the group that received the combination of drugs pioglitazone and telmisartan. This is likely due to the presence of phenolic compounds in AceSa extract, since they have the capacity of inhibiting  $\alpha$ -glucosidase enzymes, which are a therapeutic target for the treatment of obesity in humans [17]. Furthermore, triglyceride levels in mice with a HCD + AGII diet were higher than in animals that received only an HCD diet. This parameter decreased significantly in all groups that received some treatment from *S. aristolochiifolia* (AceSa, F1, F2 and F3), in comparison with the control II group. Although the results with F2 are worth noting, this treatment was better than all groups including the treatment with pioglitazone and telmisartan. Serum glucose levels, hypertension, and the local concentration of pro-inflammatory cytokines induced by HCD + AGII diet (control II) also decreased in the animals that received any treatment of *S. aristolochiifolia*.

The chemical analysis indicated that all *S. aristolochiifolia* preparations used for the treatment of animals with MS contained different concentrations of isolated compound NTF; the highest level of this substance is in fraction F2. Then, all the pharmacological effects against MS in mice could be attributed mainly to the presence of NTF, because F2 possesses the major effect and the concentration of this compound is higher in it. This does not rule out the possibility of pharmacological interaction with other active principles, and that the pharmacological effect observed could be the result of different activities related to the complex composition of the fraction.

It is worth noting that the effects of different treatments of *S. aristolochiifolia* could be due to NTF because it has been described as a noncompetitive inhibitor of  $\alpha$ -glucosidases, which explains its anti-hyperglycemic capacity [17]. Also, it was shown that NTF has an antioxidant capacity through the sequestration of free radicals [15]. On the other hand, NTF counteracts the inflammatory disorders of

MS, and a dose-dependent regulation effect on the release of nitric oxide (respiratory burst) stimulated by LPS in a cell culture RAW 264.7 has been demonstrated [31].

However, the most remarkable pharmacological effect of NTF, which might explain part of the effect of the extract of *S. aristolochiifolia* as anti-MS, is that it acts as ligand for the gamma receptor activated by the peroxisome proliferator (PPAR- $\gamma$ ). Therefore, NTF is capable of improving the morbid state of visceral obesity and the conditions resulting from this disease. This occurs because PPAR- $\gamma$ 2 is expressed specifically in adipose tissue and is a master regulator in the differentiation and maturation of adipocytes [32]. It has been shown that ligands for PPAR- $\gamma$ 2, improve the condition of insulin resistance. For all this, the administration of these substances can be an effective treatment for the prevention and/or improvement not only of type 2 diabetes mellitus, but also of the insulin resistance syndrome with hyper-insulinemia, abnormal lipid metabolism, obesity, hypertension and atherosclerotic disease [33].

It is noteworthy that the administrations of synthetic drugs of the type of glitazones (which act on PPAR) have shown adverse side effects, especially cardio-toxicities such as congestive heart failure, arrhythmias and peripheral edema [34]. Nevertheless, the widespread use of the extract of *Smilax aristolochiifolia* in soft drinks such as “zarzaparilla” root beer allows us to assume that NTF might be free of any toxic effects. Furthermore, MS-associated inflammation was monitored by quantifying the concentration in kidney and in adipose tissue of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , as well as the anti-inflammatory IL-10.

It was observed that the group with HCD diet had a non-significant increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines with respect to the level of IL-10 in the kidney; even so, the injury model fed with HCD and AG II showed a significant increase of these molecules in the kidney, indicating that the chronic administration of AG II induces an exacerbated pro-inflammatory state.

Obesity and hypertension are recognized as diseases with an important inflammatory background; a study showed that hypertensive and obese patients had low levels of IL-10 and high serum concentrations of IL-8, compared with hypertensive subjects with normal weight [35]. The mechanism of AG II-mediated chronic hypertension also activates T cells by AGII, which promotes vascular inflammation and elevated pressure [36]. This explains the essential role described for TNF- $\alpha$  as a blood pressure regulator. Regarding the increase in blood pressure caused by the infusion of AG II in hypertensive rats fed with high salt diet, etanercept (TNF- $\alpha$  inhibitor) retards the progression of hypertension, an effect that is attributed to a reduction of kidney damage, due to a decrease of proteinuria and of the infiltration of macrophages/monocytes [37]. Another study indicates that in knockout mice for TNF- $\alpha$ , the infusion of AG II for two weeks fails to cause hypertension [38].

### 3. Experimental Section

#### 3.1. General Procedures

The melting point of the isolated compounds was obtained on Thermo Scientific equipment IA1900 series (Thermo Scientific Inc., Hudson, NH, USA); the results shown are uncorrected. NMR spectra were recorded on Varian INOVA-400 at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , and two-dimensional spectroscopy experiments COSY, HSQC, HMBC in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemical shifts are reported in parts per million (ppm)

relative to tetramethylsilane (TMS). We used a Hewlett Packard 5985-B and a JEOL-AX 505 HA mass spectrophotometer

### 3.2. Plant Material

This project was approved by the research committee of the IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) on June 17, 2010, with registration number R-2010-1701-41. The root of *Smilax aristolochiifolia* was obtained in Monte Blanco (19°23'02.20" N and 96°56'09.60" W at 1773 masl), in the municipality of Teocelo, Veracruz, Mexico. A specimen was identified and deposited for reference in the Herbarium of INAH-Morelos (Medicinal Plant Herbarium of the Institute of Anthropology and History-Morelos). The registration number given was 2053 and the identification was made by Margarita Avilés Flores.

### 3.3. Extraction and Fractionation of the Root of *Smilax aristolochiifolia*

The dried and ground root (3.88 kg) was extracted three times with acetone (20 L) at 25 °C for 24 h. The acetone extract of *S. aristolochiifolia* (Ace-Sa) was concentrated in a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000, Schwabach, Germany). The Ace-Sa (35 g) was suspended in *n*-hexane (3.0 L) to give 3 g of a soluble fraction and 30.0 g of a precipitate. This precipitate was dissolved in chloroform (1.2 L) to give 6.2 g of a soluble fraction and 16.0 g of insoluble precipitate (called **F1**). The fraction **F1** was dissolved in acetone (2,000 mL) to give 11.5 g of the soluble fraction (called **F2**) and 3.0 g of the insoluble precipitate (called **F3**).

**F2** (11.5 g) was fractionated using silica gel (345 g, 70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) column chromatography (9 × 28 cm). The column was eluted with a gradient of dichloromethane/acetone, increasing the polarity of the eluting system with acetone, collecting volumes 350 mL, to obtain seven fractions; Fr-A (1.5 g, 95:5), FrB (0.8, 90:10), FrC (3.0 g, 80:20), FrD (2.5, 70:30), FrE (0.4, 60:40), FrF (1.3, 50:50,) and FrG (0.9, 0:100).

The FrC fraction (2.8 g) was fractionated on a chromatographic column (5 × 30 cm) with silica gel (90 g, 70-230 mesh, Merck). The column was eluted with a gradient of dichloromethane/acetone/methanol, increasing the polarity of the system by acetone and methanol, collecting volumes of 100 mL to give six fractions; FrC-1 (100:0:0), FrC-2 (95:5:0), FrC-3 (90:10:0), FrC-4 (80:20:0), FrC-5 (50:50:0), FrC-6 (50:50:50).

A yellow amorphous solid (54 mg) was obtained from the FRC-2 fraction; the structure of this compound was identified on the basis of 1D and 2D NMR techniques, and comparing with certain literature data [38]. It was identified as *N-trans*-feruloyltyramine (NTF), with a purity of 98%; mp 74–75 °C. UV (MeOH) nm ( $\lambda$ ); 220, 293,318. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (see Supplementary Information); FABMS *m/z* 314[M + H]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 314 [M+ H]<sup>+</sup>; calculated for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>.

### 3.4. Standardization of Fractions with *N-Trans-Feruloyltyramine* by HPLC

The extract Ace-Sa and fractions (F1, F2 and F3) were analyzed by a HPLC technique, and a calibration curve was used with NTF; this allowed us to standardize the samples from *S. aristolochiaefolia*.

The concentrations analyzed of compound 1 were: 2.77 mg/g for Ace-Sa, 26.34 mg/g for F1, 60.22 mg/g for F2 and 8.76 mg/g for F3. The method was carried out in a Waters system (Separation Module 2695, Milford, MA, USA) coupled to a diode array detector (2996) with a 190–600 nm detection range and operated Empower 1 software system [39]. Separations were performed in a Superspher RP-18 column (125 × 4 mm, 5 µm; Merck) employing a constant temperature of 25 °C during analyses. Mobile phase is composed by solvent A (H<sub>2</sub>O, TFA 0.1%) and B (CH<sub>3</sub>CN, TECSQUIM, Toluca, Edo Mex, Mexico) gradient system with a flow of 1.0 mL/min during 28 min. The ratio mobile phase remained in the following way: A:B = 100:0 (0–1 min), 90:10 (2–4 min), 80:20 (5–7 min), 70:30 (8–14 min), 60:40 (15–18 min), 20:80 (19–22 min), 0:100 (23–26 min) and 100:0 (27–28 min). The sample injection volume was 20 µL and the detection wavelength was scanned at 190–400 nm.

### 3.5. Animals

Male C57/BL-6 mice (Harlan México, Mexico City, Distrito Federal, México) were used for all experiments, which were housed and maintained under the following laboratory conditions: 25 °C ± 3, a 12 h:12 h light/dark cycle (lights on at 7:00), free access to water and food, either normal diet (pellets from Harlan rodent lab diet) or high-caloric diet, depending on the experimental group concerned. All studies were carried out in accordance with the official Mexican regulations NOM-062-ZOO-1999 (Technical Specifications for Production, Care, and Use of Laboratory Animals). The experimental protocol was authorized by the Local Health Research Committee (IMSS, Register number: R-2010-1701-41).

### 3.6. Feeding the Mice with a High-Caloric Diet and a Normal Diet

A batch of 96 mice was divided into eight groups. Basal condition: received a regular diet (RD); mice with only high-caloric diet (HCD, control I). All other groups were subjected to chronic damage with HCD and angiotensin II (AGII, 0.1 mg/kg i.p.) by twenty weeks and then animals without any treatment represented the negative control group (control II). The experimental treatments for next groups were: acetone extract from *S. aristolochiifolia* (Ace-Sa) and F1, 25.0 mg/kg; F2, 10 mg/kg and F3, 25 mg/kg, all orally. The positive control group was administered with Pioglitazone (≥99% purity, Sigma-Adrich, St Louis, MO, USA) (10 mg/kg) and telmisartan (≥98% purity, Sigma-Adrich) (10 mg/kg). The different treatments were administered from week 10 to 20. During the trial period, the weight gain of each mouse was recorded weekly to establish the growth curve. At the end of the trial period, the following parameters were measured: body density, fasting glucose, insulin tolerance curve, triglycerides, blood pressure.

### 3.7. Determination of Body Density

Under surgical anesthesia (pentobarbital sodium 50 mg/kg ip, Pfizer, México City, Distrito Federal, México), the mice were immersed in a graduated volumetric device with 100 mL of water, keeping the nose of the rodents out of the water. The volume of water displaced is measured and recorded; the ratio between weight and displaced volume is calculated and this index corresponds to body density.

### 3.8. Determination of Fasting Glucose

To determine the glucose concentration of the animals exposed to different treatments, previously fasted for 12 h, a blood sample of 5  $\mu$ L was obtained from the tail vein and the glucose was quantified (mg/dL) using a Bayer Contour<sup>®</sup> TS glucometer.

### 3.9. Insulin Tolerance Curve

The insulin tolerance curve was traced at the end of the treatments. Five  $\mu$ L of blood from non-fasting mice were obtained from the tail vein; the glucose was quantified (mg/dL) using a Bayer Contour TS glucometer. Subsequently, a dose of 0.1 U/kg of rapid insulin was applied (Humulin R, Lilly<sup>®</sup>, Indianapolis, IN, USA) via i.p. and the glucose was quantified in the manner already described, 15, 30, 60 and 120 min after the application. The response curve was constructed with the data obtained, and the area under the curve was calculated.

### 3.10. Determination of Plasmatic Triglycerides

The plasmatic concentration of triglycerides was determined in plasma from mice exposed to the different treatments by enzymatic colorimetric assay using the Wiener lab Color TG GPO/PAP AA, (Rosario, Santa Fe, Argentina) following the recommendations of the supplier. The plates were read in an ELISA reader (Awareness Technology Inc. [40]) model Stat Fax-2100, city, state abbrev if US, country) and the sample absorbance at 492 nm was recorded.

### 3.11. Euthanasia

After 20 weeks of treatment, the mice were deeply anesthetized i.p. with pentobarbital sodium at a dose of 80 mg/kg and blood samples were quickly obtained from the infraorbital sinus of each mouse. The plasma was obtained by centrifugation (2500 rpm for 15 min) at room temperature; then the samples were stored individually at  $-10$  °C for the various determinations.

### 3.12. Quantification of Cytokines from Mouse Kidney and Adipose Tissue

The kidney and adipose tissue of mice was transferred to 15-mL tubes, placed on dry ice, and suspended in phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich) 0.1 mM in PBS (1 mL/200 mg of tissue). Samples were homogenized (Potter-Elvehjem homogenizer Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) and then centrifuged for 10 min at 14,000 rpm at 4 °C. The supernatants were transferred to 1.5-mL Eppendorf tubes and were ready for analysis. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF $\alpha$  were measured using ELISA BD OptEIA<sup>™</sup> (San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Concentrations for each cytokine were calculated from calibration curves using individual recombinant proteins as standards, also according to the manufacturer's instructions. Density (OD) readings were performed at 30 and 60 min of incubation at 450 nm. The value of the concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ ) was divided by the value of the concentration of anti-inflammatory cytokine (IL-10). Finally, the resulting index was compared with the baseline value.



### 3.13. Blood Pressure Measurement

The mice exposed to the different treatments were anesthetized (pentobarbital 50 mg/kg i.p., Pfizer) and placed in a LETICA Storage Pressure Meter, LE 5002, (Biopac System MP150, Goleta, CA, USA [41]). Ten measurements were recorded for each mouse and an average was obtained to report the PAS and PAD of each case.

### 3.14. Statistical Analyses

The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) with a Tukey *post-test* (\*  $p < 0.05$ ).

## 4. Conclusions

It is concluded that the extract and fractions with NTF are options in the treatment of the symptomatology associated with the MS.

## Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/8/11366/s1>.

## Acknowledgments

This work was supported by a basic grant 240846 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT, México) for Carol Arely Botello Amaro, who studies her PhD in biological and health sciences in UAM-Iztapalapa, and by a complementary grant 99183983 from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, México). The research had financial support provided by CONACYT and FIS-IMSS-PROT/649. We thank Atilano Gutiérrez Carrillo, from UAM-Iztapalapa, for his technical assistance.

## Author Contributions

(MSc. Carol Arely Botello Amaro) Coordination and execution of research protocol; (Dr. Manasés González-Cortazar) Chromatographic process design, interpretation of spectroscopic information for structural elucidation; (Dra. Maribel Herrera-Ruiz) Assay design for evaluation of inflammatory and metabolic disorder; (Rubén Roman-Ramos) Statistical analysis of data; (Dra. Lucía Aguilar-Santamaría) Design and implementation of model of the metabolic syndrome; (Dr. Jaime Tortoriello) Design of production, purification of NTF; (Dr. Enrique Jiménez-Ferrer) General design of the research protocol, analysis of pharmacological behavior of NTF, achievement of the funds to finance the project.

## Conflicts of Interest

All authors contributed to and have approved the final manuscript, we declare not to have any conflict of interest in the publication of this manuscript.

## References and Notes

1. Yun, J.E.; Won, S.; Sung, J.; Jee, S.H. Impact of metabolic syndrome independent of insulin resistance on the development of cardiovascular disease. *Circ. J.* **2012**, *76*, 2443–2448.
2. Hutcheson, R.; Rocic, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: The great exploration. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 271028.
3. Rojas-Martínez, R.; Aguilar-Salinas, C.A.; Jiménez-Corona, A.; Gómez-Pérez, F.J.; Barquera, S.; Lazcano-Ponce, E. Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Pública Mexico* **2012**, *54*, 7–12.
4. Gómez-Dantés, O.; Sesma, S.; Becerril, V.M.; Knaul, F.M.; Arreola, H.; Frenk, J. Sistema de Salud de México (In Spanish). *Salud Pública Mexico* **2011**, *53*, S220–S232.
5. Kalupahana, N.S.; Claycombe, K.J.; Moustaid-Moussa, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: Mechanistic insights. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 304–316.
6. Ferdinand, K.C. Improved Identification and Antihypertension Pharmacotherapy in Cardiorenal Metabolic Syndrome: Focus on Racial/Ethnic Minorities, Olmesartan Medoxomil, and Combination Therapy. *Cardiorenal. Med.* **2012**, *2*, 256–267.
7. Fraulob, J.C.; Ogg-Diamantino, R.; Fernandes-Santos, C.; Águila, M.B. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *46*, 212–223.
8. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867.
9. Touyz, R.M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: Role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* **2005**, *90*, 449–455.
10. Bo, S.; Hongzhu, G.; Yajun, C.; Min, Y.; Jian, H.; Dean, G. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 623–630.
11. Qing-Feng, Z.; Zhong-Rong, Z.; Hon-Yeung, C. Antioxidant activity of *Rhizoma smilacis* Glabrae extracts and its key constituent-astilbin. *Food Chem.* **2009**, *115*, 297–303.
12. Sautour, M.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M.A. Bioactive Steroidal Saponins from *Smilax medica*. *Planta Med.* **2006**, *72*, 667–670.
13. Argueta, A.; Gallardo-Vazquez, M.C. *Smilax/Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana/Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana* (in Spanish). Available online: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/> (accessed on 3 August 2013).
14. DellaGreca, M.; Cutillo, F.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Pacifico, S.; Zarrelli, A. Antioxidant and radical scavenging properties of *Malva sylvestris*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 893–896.
15. Fan, P.; Terrier, L.; Hay, A.E.; Marston, A.; Hostettmann, K. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia* **2010**, *81*, 124–131.
16. Liu, X.; Luo, J.; Kong, L. Phenylethyl cinnamides as potential alpha-glucosidase inhibitors from the roots of *Solanum melongena*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 851–853.
17. Yusuf, I.; Yamaoka, K.; Otsuka, H.; Yamasaki, K.; Seyama, I. Block of sodium channels by tyramine and its analogue (N-feruloyl tyramine) in frog ventricular myocytes. *Jpn. J. Physiol.* **1992**, *42*, 179–191.

18. Faraci, F.M. Protecting against vascular disease in brain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H1566–H1582.
19. Kovacic, J.C.; Moreno, P.; Nabel, E.G.; Hachinski, V.; Fuster, V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Clinical vascular disease in the elderly. *Circulation* **2011**, *123*, 1900–1910.
20. Najjar, S.S.; Scuteri, A.; Lakatta, E.G. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* **2005**, *46*, 454–462.
21. Yiannikouris, F.; Gupte, M.; Putnam, K.; Thatcher, S.; Charnigo, R.; Rateri, D.L.; Daugherty, A.; Cassis, L.A. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. *Hypertension* **2012**, *60*, 1524–1530.
22. Putnam, K.; Shoemaker, R.; Yiannikouris, F.; Cassis, L.A. The renin-angiotensin system: A target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *302*, H1219–H1230.
23. Wright, J.W.; Mizutani, S.; Harding, J.W. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. *Heart Fail. Rev.* **2008**, *13*, 367–375.
24. Ranilla, L.G.; Kwon, Y.I.; Apostolidis, E.; Shetty, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4676–4689.
25. Abdala, S.; Martín-Herrera, D.; Benjumea, D.; Gutiérrez, S.D. Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140*, 277–281.
26. Amira, S.; Dade, M.; Schinella, G.; Ríos, J.L. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2012**, *25*, 65–72.
27. Khan, I.; Nisar, M.; Ebad, F.; Nadeem, S.; Saeed, M.; Khan, H.; Samiullah, K.; Khuda, F.; Karim, N.; Ahmad, Z. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: Experimental and computational studies. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *121*, 175–177.
28. Zhang, L.; Liao, C.C.; Huang, H.C.; Shen, Y.C.; Yang, L.M.; Kuo, Y.H. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1398–1404.
29. Fukunaga, T.; Miura, T.; Furuta, K.; Kato, A. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Smilax glabra* in normal and diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 44–46.
30. Kim, J.Y.; Park, S.J.; Yun, K.J.; Cho, Y.W.; Park, H.J.; Lee, K.T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *584*, 175–184.
31. Kim, Y.J.; Cho, S.Y.; Yun, C.H.; Moon, Y.S.; Lee, T.R.; Kim, S.H. Transcriptional activation of Cidec by PPARgamma2 in adipocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 297–302.
32. Reaven, G.M. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* **2005**, *47*, 201–210.
33. Hoffmann, B.R.; El-Mansy, M.F.; Sem, D.S.; Greene, A.S. Chemical proteomics-based analysis of off-target binding profiles for rosiglitazone and pioglitazone: Clues for assessing potential for cardiotoxicity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8260–8271.

34. Fonseca, H.A.; Fonseca, F.A.; Monteiro, A.M.; Bianco, H.T.; Boschcov, P.; Brandão, S.A.; Jualiano, L.; Gidlund, M.; Izar, M.C. Obesity modulates the immune response to Oxidized LDL in hypertensive Patients. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *67*, 1451–1460.
35. Zubcevic, J.; Waki, H.; Raizada, M.K.; Paton, J.F. Autonomic-immune-vascular interaction: An emerging concept for neurogenic hypertension. *Hypertension* **2011**, *57*, 1026–1033.
36. Elmarakby, A.A.; Quigley, J.E.; Pollock, D.M.; Imig, J.D. Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **2006**, *47*, 557–562.
37. Guzik, T.J.; Hoch, N.E.; Brown, K.A.; McCann, L.A.; Rahman, A.; Dikalov, S.; Goronzy, J.; Weyand, C.; Harrison, D.G. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 2449–2460.
38. Rahman, A.U.; Bhatti, M.K.; Akhtar, F.; Choudhary, M.I. Alkaloids of *Fumaria Indica*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2869–2872.
39. *Empower 2 Guía para el administrador del sistema* (In Spanish), 715081098ES; Waters Corporation: Boston, MA, USA, 2008. Available online: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat053020tpr1.pdf> (accessed on 3 July 2014).
40. *Stat Fax<sup>®</sup> 2100. Operator's Manual*, Revised 01/05. Doc 2100 Rev J; Awareness Technology Inc: Palm City, FL, USA, 1988. Available online: [https://extranet.fisher.co.uk/webfiles/fr/Pjointes/Mdemploi/AWA002\\_EN%20Operating%20manual%202100.pdf](https://extranet.fisher.co.uk/webfiles/fr/Pjointes/Mdemploi/AWA002_EN%20Operating%20manual%202100.pdf) (accessed on 2 July 2014).
41. *AcqKnowledge 4 Software Guide*. Data Acquisition and Analysis with BIOPAC Hardware System. BIOPAC Systems Inc: Goleta, CA, USA, 2012. Available online: <http://www.biopac.com/Manuals/acqknowledge%204%20software%20guide.pdf> (accessed on 2 July 2014).

*Sample Availability:* Samples of the compounds N-trans-feruloyl tyramine are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).