



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE PREPARADOS Y METABOLITOS
SECUNDARIOS DE *Artemisia ludoviciana* Nutt. (ASTERACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. GERARDO DAVID ANAYA EUGENIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. Junio 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE PREPARADOS Y METABOLITOS
SECUNDARIOS DE *Artemisia ludoviciana* Nutt. (ASTERACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. GERARDO DAVID ANAYA EUGENIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. Junio 2016.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/274/16
ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de marzo de 2016**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **ANAYA EUGENIO GERARDO DAVID** con número de cuenta **300194881** con la tesis titulada: "**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE PREPARADOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Artemisia ludoviciana* NUTT. (ASTERACEAE)**", realizada bajo la dirección del (la) **RA. RACHEL MATA ESSAYAG**:

| | |
|-------------|------------------------------------|
| Presidente: | DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA |
| Vocal: | DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ |
| Secretario: | DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA |
| Suplente: | DR. RICARDO REYES CHILPA |
| Suplente: | DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTNER |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de mayo de 2016



M. del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

MCAA/MJFM/ASR/mnm

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM., por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al CONACyT por la beca proporcionada para realizar mis estudios de posgrado. A los proyectos de investigación DGAPA, IN 212913, 217516 y CONACyT 150966, 219765.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo.

A los miembros de Comité Tutor; Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta y Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por su interés y aporte al presente trabajo de investigación.

Agradecimientos a título personal

Al ser supremo que en ningún momento me ha abandonado y me supo iluminar y cuidar en situaciones adversas durante mis estudios de Posgrado. Gracias Dios, por todo...

Agradezco a mi amada familia que nunca me ha dejado de apoyar en cada una de mis decisiones; y por que siempre han estado ahí cuando los necesite.

A Mis padres Lilia Eugenio Andraca y Marcos Nava García, porque sin su sacrificio no hubiese alcanzado la presente meta y por hacer de mi una persona de provecho

A mis hermanas Yanet Anaya Eugenio y Diana Laura Nava Eugenio y, a mi carnalito Marcos Oscar Nava Eugenio. Gracias por estar ahí y por soportarme.

A mis otros carnales: Uri Nimrod Ramírez Jarquín, Abraham Madariaga Mazón y Francisco Suarez Escamilla, por todos los consejos y experiencias vividas.

A todos mis compañeros del laboratorio 124 del conjunto E, de la Facultad de Química, UNAM.

A Mariana Yetlanezy Hernández Aramburo por ser la pareja perfecta para mi

A los miembros del jurado, que dedicaron tiempo para leer, revisar y mejorar la versión final de la tesis:

Dra. Marcia Hiriati Urdanivia

Dr. Réne de Jesús Cárdenas Vázquez

Dra. Marta Alicia Iraeta Menjívar

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dr. Robert Arthur Bye Boettler

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE | I |
| Lista de Figuras | VI |
| Lista de Tablas | X |
| Lista de Abreviaturas | XI |
| | |
| I. RESUMEN | 1 |
| Abstract | 4 |
| | |
| II. ANTECEDENTES | 6 |
| 1. Género <i>Artemisia</i> | 6 |
| 2. Generalidades sobre <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. | 8 |
| 2.1. Morfología | 8 |
| 2.2. Distribución | 10 |
| 2.3. Aspectos etnobotánicos | 10 |
| 2.4. Actividad biológica | 14 |
| 2.5. Composición química | 16 |
| 3. Especies del genero <i>Artemisia</i> con propiedades hipoglucemiantes | 29 |
| 4. Síndrome Metabólico | 32 |
| 5. Antecedentes Generales sobre la Diabetes Mellitus | 35 |
| 5.1. Definición y clasificación | 35 |
| 5.2. Prediabetes y diagnostico de DMT2 | 37 |
| 5.3 Impacto de la DMT2 en el Mundo y en México | 38 |
| 5.4. Tratamientos farmacológicos para la DMT2 | 40 |
| | |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 47 |
| | |
| IV. HIPÓTESIS | 49 |
| | |
| V. OBJETIVOS | 50 |
| 1. Objetivo General | 50 |
| 2. Objetivos Particulares | 50 |

| | |
|---|----|
| VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 52 |
| 1. Material Vegetal | 52 |
| 2. Procedimientos Generales de Análisis | 52 |
| 2.1. Análisis cromatográficos | 52 |
| 2.2. Caracterización de los productos naturales | 53 |
| 3. Preparación del Extracto Acuoso y Aceite Esencial | 54 |
| 4. Evaluaciones Farmacológicas | 54 |
| 4.1. Evaluación del efecto sobre los niveles de glucosa en sangre de los preparados y/o compuestos puros | 55 |
| 4.1.1. Inducción experimental del estado de hipergluce- mia en ratones | 55 |
| 4.1.2. Evaluación del efecto agudo hipoglucemiante | 56 |
| 4.1.3. Evaluación del efecto antihiperglucemiante | 56 |
| 4.1.4. Prueba de tolerancia a la insulina (PTI) | 57 |
| 4.2. Evaluación del efecto del EA sobre el síndrome metabólico (SM) | 57 |
| 4.2.1. Inducción del SM | 57 |
| 4.2.2. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas con SM | 58 |
| 4.2.3. Efecto del tratamiento subcrónico del EA en ratas con SM | 58 |
| 4.2.4. Recolección de muestras sanguíneas e hígados | 59 |
| 4.2.5. Determinación de algunos parámetros bioquímicos | 59 |
| 4.2.6. Determinación de la concentración de glucógeno hepático | 59 |
| 4.3. Determinación del efecto antinociceptivo | 60 |
| 4.3.1. Prueba de la formalina | 60 |
| 4.3.2. Prueba de la placa caliente | 60 |
| 4.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio | 61 |
| 4.4.1. Prueba de la carragenina | 61 |
| 4.5. Evaluación del efecto de los preparados sobre el | |

| | |
|--|----|
| sistema nervioso central | 61 |
| 4.5.1. Modelo del rotarod | 61 |
| 4.5.2. Modelo de campo abierto | 62 |
| 4.6. Evaluación del efecto de los preparados y/o compuestos puros aislados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas | 62 |
| 4.6.1. Estudios de cinética enzimática | 63 |
| 5. Análisis Estadístico | 64 |
| 6. Estudios de Acoplamiento Molecular | 64 |
| 7. Estudio Fitoquímico | 65 |
| 7.1. Aislamiento de la eupatilina (63), la jaceosidina (64), la arglanina (8), la salvinina (166) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico (165) | 65 |
| 7.2. Aislamiento de la aquilina (31) y la deshidroleucodina (164) | 66 |
| 7.3. Establecimiento del perfil cromatográfico | 66 |
| 8. Validación del método analítico | 67 |
| 8.1. Linealidad del sistema | 67 |
| 8.2. linealidad y exactitud del método | 67 |
| 8.3. Precisión del método | 68 |
| 8.4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) | 68 |
| 8.5. Cuantificación de los componentes 31 y 164 presentes en la fracción de AcOEt | 69 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 70 |
| 1. Determinación de los Efectos Hipoglucemiante y Antihiper glucémico de Preparados y Metabolitos de <i>Artemisia ludoviciana</i> | 70 |
| 1.1. Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso (EA) y del aceite esencial (AE) de <i>A. ludoviciana</i> | 70 |
| 1.2. Efecto antihiper glucémico del extracto acuoso (EA) y del aceite esencial (AE) de <i>A. ludoviciana</i> | 72 |
| 1.3. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de <i>A. ludoviciana</i> | 74 |
| 1.4. Efecto hipoglucemiante de la eupatilina (63), | |

| | |
|---|-----|
| la arglanina (8) y la aquilina (31) | 75 |
| 1.5. Estudios sobre el mecanismo de acción de la eupatilina (63), la arglanina (8) y la aquilina (31) | 77 |
| 1.6. Efecto de la aquilina (31) en la prueba de tolerancia a la insulina en ratones sanos | 79 |
| 1.7. Efecto del EA y los metabolitos secundarios sobre la actividad enzimática de la α -GL | 82 |
| 1.8. Estudios de acoplamiento molecular de la salvinina (166) | 85 |
| 1.9. Efecto antihiper glucémico de la deshidroleucodina (164) en la prueba oral de tolerancia a la sacarosa | 87 |
| 2. Determinación de los efectos del EA de <i>A. ludoviciana</i> sobre el síndrome metabólico (SM) | 88 |
| 3. Determinación del efecto antinociceptivo, antiinflamatorio del EA, AE y metabolitos secundarios de <i>A. ludoviciana</i> | 92 |
| 3.1. Efecto antinociceptivo del EA en el modelo de la formalina | 92 |
| 3.2. Efecto antiinflamatorio de EA en el modelo de la carragenina | 93 |
| 3.3. Efecto antinociceptivo del AE en la prueba de la formalina | 95 |
| 3.4. Efecto antinociceptivo del AE en la prueba de la placa caliente | 96 |
| 3.5. Estudios sobre el mecanismo de acción antinociceptivo del AE | 97 |
| 3.6. Efecto sedante del EA y del AE | 100 |
| 3.7. Efecto antinociceptivo de la aquilina (31) y la deshidroleucodina (164) en la prueba de la formalina | 100 |
| 3.8. Efecto antiinflamatorio de la aquilina (31) y la deshidroleucodina (164) en la prueba de la carragenina | 102 |
| 4. Efecto antihiperalgésico del EA | 103 |
| 4.1. Inducción del estado de hiperalgnesia en ratones | 103 |
| 4.2. Efecto antihiperalgésico del EA en ratones NA-STZ | |

| | |
|---|-----|
| en el modelo de la formalina | 105 |
| 4.3. Efecto antihiperalgésico del EA en ratones NA-STZ en el modelo de la placa caliente | 106 |
| 5. Establecimiento del perfil cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM) | 107 |
| 6. Validación de un método analítico (CLUE-EM) para cuantificar las lactonas 31 y 164 en la droga cruda de <i>A. ludoviciana</i> | 108 |
| 6.1. Linealidad el sistema | 108 |
| 6.2. Linealidad y exactitud del método | 109 |
| 6.3. Precisión del método | 109 |
| 6.4. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) | 110 |
| 6.5. Cuantificación de los compuestos 31 y 164 presentes en la fracción de AcOEt | 111 |
| VIII. CONCLUSIONES | 112 |
| IX. PERSPECTIVAS | 114 |
| X. BIBLIOGRAFÍA | 115 |
| ANEXO | 127 |
| PUBLICACIONES | 132 |

| Lista de Figuras | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Distribución global del género <i>Artemisia</i> . | 6 |
| Figura 2. Descripción general de <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. A. <i>Artemisia ludoviciana</i> ; B. cabezuela; C. corola y ramas del estilo de la flor periférica; D. corola de la flor central; E. anteras; F. Ramas del estilo; G. Aquenio. | 9 |
| Figura 3. Estimación a nivel global del número de enfermos con diabetes por región y su estimación para el año 2040. | 38 |
| Figura 4. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo según entidad federativa en México. | 39 |
| Figura 5. Principales fármacos para el tratamiento de la DMT2. | 44 |
| Figura 6. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial (AE) y del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> . A) Ratones normoglucémicos, B) ratones hiperglucémicos. | 72 |
| Figura 7. Efecto antihiperoglucémico del aceite esencial (AE) y del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en la prueba de tolerancia a la glucosa. A) Ratones normoglucémicos, B) ratones hiperglucémicos. | 74 |
| Figura 8. Metabolitos secundarios aislados e identificados de <i>Artemisia ludoviciana</i> : eupatilina (63), jaceosidina (64), arglanina (8), salvinina (166), ácido 3,5-dicafeoilquinico (165), aquilina (31) y deshidroleucodina (164). | 75 |
| Figura 9. Efecto agudo hipoglucemiante de la eupatilina (63), la arglanina (8) y la aquilina (31) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos. | 77 |

- Figura 10.** Proceso de liberación de la insulina en condiciones de homeostasis. 78
- Figura 11.** Efecto agudo hipoglucemiante de la eupatilina (EUP, 17.7 mg/kg), la arglanina (ARG, 17.7 mg/kg) y la aquilina (AQL, 17.7 mg/kg) en ratones hiperglucémicos pretratados con nicorandil (NIC, 6.8 mg/kg) o nifedipina (NIF, 13.6 mg/kg). 80
- Figura 12.** Efecto agudo hipoglucemiante de la aquilina (**31**, 17.7 mg/kg) en ratones normoglucémicos en la tolerancia a la insulina. 80
- Figura 13.** Transducción de señales de la insulina en una célula muscular. 82
- Figura 14.** Reacción de hidrólisis de pNPG en presencia de una enzima α -G. 83
- Figura 15.** A) Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitor de las fracciones con HEX, AcOEt de la infusión, B) de la salvinina (**166**) de la deshidroleucodina (**164**) sobre la enzima α -GL. 83
- Figura 16.** Gráfica de los dobles recíprocos de Lineweaver–Burk de la inhibición de la salvinina (**166**) con diferentes concentraciones de sustrato (pNPG) sobre la enzima α -GL. 84
- Figura 17.** Estereoisómeros de la salvinina (**166**). 85
- Figura 18.** (A) Modelo estructural de la interacción de los diastereoisómeros **166a-166d** (verde, turquesa, naranja y café, respectivamente) y la acarbosa (amarillo) con la enzima α -GL. Representación en 3D de la interacción entre la enzima y los diastereoisómeros **166a** (B), **166b** (C), **166c** (D) y **166d** (E) en el sitio de unión predicho . 86
- Figura 19.** A) Efecto antihiperglucémico de la deshidroleucodina (DHL, **164**)

en la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones sanos, **B)** e hiperglucémicos. 87

Figura 20. Efecto antihiper-glucémico del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en la prueba de tolerancia a la glucosa en ratas con SM inducido con fructosa. 89

Figura 21. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa. 90

Figura 22. **A)** Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana*, y sus fracciones de hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt) en la prueba de la formalina en ratones. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 93

Figura 23. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* detectado en el ensayo de edema inducido por la administración de carragenina. 95

Figura 24. **A)** Efecto antinociceptivo del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana* en ratones en la prueba de la formalina. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 96

Figura 25. Efecto antinociceptivo del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana* detectado mediante el modelo de la placa caliente en ratones. 97

Figura 26. Efecto antinociceptivo de AE (17.7 mg/kg, i.p.) en ratones pretratados con naloxona (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropina (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamida (GLI, 10 mg/kg, i.p), o N^G-L-nitro arginina metil ester (L-NAME, 3mg/kg, i.p.) en el modelo de la placa caliente. 98

Figura 27. **A)** Efecto antinociceptivo de AE (31.6 mg/kg, i.p.) en ratones pretratados con naloxona (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropina (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamida (GLI, 10 mg/kg, i.p), o N^G-L-nitro arginina metil ester

- (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) en la prueba de la formalina. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 99
- Figura 28.** **A)** Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6 mg/kg) y del aceite esencial (AE, 31.6 mg/kg) de *A. ludoviciana* en el rotarod y **B)** Campo abierto. 100
- Figura 29.** **A)** Efecto antinociceptivo de la aquilina (**31**) y de la deshidroleucodina (**164**) en la prueba de la formalina. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 101
- Figura 30.** Efecto de la aquilina (**31**) y deshidroleucodina (**164**) sobre la formación de edema inducido por la administración de carragenina en ratones 102
- Figura 31.** **A)** Efecto hiperalgésico en ratones detectado mediante la prueba de la formalina tras la administración de NA-STZ. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 104
- Figura 32.** **A)** Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratones hiperglucémicos (NA-STZ) en la prueba de la formalina. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. 105
- Figura 33.** Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratones hiperglucémicos en el modelo de la placa caliente. 106
- Figura 34.** Perfil cromatográfico mediante la CLUE-EM de la aquilina (**31**) y deshidroleucodina (**164**) obtenidos de la fracción de AcOEt de la infusión de *A. ludoviciana*. 107

Lista de Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Artemisia ludoviciana</i> . | 17 |
| Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de <i>A. ludoviciana</i> . | 28 |
| Tabla 3. Comparación de las diferentes definiciones para el síndrome metabólico. | 34 |
| Tabla 4. Límites de circunferencia de cintura para determinar obesidad abdominal de acuerdo a la definición armonizada (2009) y organizaciones nacionales. | 35 |
| Tabla 5. Efecto del extracto acuoso (EA) de <i>A. ludoviciana</i> en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa (Parámetros físicos). | 91 |
| Tabla 6. Parámetros de validación de la fracción de AcOEt de la infusión de las partes aéreas de <i>A. ludoviciana</i> . | 110 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| AAC | Asociación Americana del Cardiología |
| AcOEt | Fracción de acetato de etilo |
| ADA | Asociación Americana de Diabetes |
| AE | Aceite esencial |
| AGA | Alteración de la glucosa en ayunas |
| AGL | Ácidos grasos libres |
| AM | Acoplamiento molecular |
| ATR | Atropina |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria media |
| cm | Centímetros |
| COX-2 | Ciclooxigenasa-2 |
| DE ₅₀ | Dosis efectiva media |
| DG | Diabetes gestacional |
| DIC | Diclofenaco |
| DM | Diabetes mellitus |
| DMT1 | Diabetes mellitus tipo 1 |
| DMT2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DPP-IV | Enzima dipeptidil peptidasa IV |
| DZP | Diazepam |
| EA | Extracto acuoso |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| ECV | Enfermedades cardiovasculares |
| FCME | Herbario de la Facultad de Ciencias |
| FOR | Formalina |
| GA | Glucosa en ayunas |
| GBP | Gabapentina |
| GIP | Péptido insulínico dependiente de glucosa |
| GLI | Glibenclamida |
| GLP-1 | Péptido 1 análogo de glucagón |
| GLUT-4 | Transportadores para glucosa tipo 4 |

| | |
|-------------------|--|
| GSK3 | Glucógeno sintasa cinasa-3 |
| HbA _{1c} | Hemoglobina glucosilada A _{1c} |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HEX | Fracción de hexano |
| IDF | Federación internacional de Diabetes |
| IG | Intolerancia a la glucosa |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de masa corporal |
| IMN | Instituto Medico Nacional |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IRS | Sustrato del receptor de insulina |
| L-NAME | L-nitro-metil ester arginina |
| m | Metros |
| MET | Metmorfina |
| MEXU | Herbario nacional |
| mg/kg | Miligramos entre kilogramo |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| MOR | Morfina |
| NA | Nicotinamida |
| NDP | Neuropatia diabética periférica |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| NGS | Niveles de glucosa en sangre |
| NLX | Naloxona |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ON | Oxido nítrico |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAS | Presión arterial sistólica en mmHg |
| PC | Perímetro de la cintura |
| PGA | Prueba de glucosa en ayunas |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinasa |
| PITI | Prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina |

| | |
|---------------|--|
| <i>p</i> NP | para-Nitrofenol |
| <i>p</i> NPG | <i>p</i> -nitrofenol- α - <i>D</i> -glucopiranosido |
| p.o. | Por vía oral |
| POTG | Prueba oral de tolerancia a la glucosa |
| POTS | Prueba oral de tolerancia ala sacarosa |
| PPAR γ | Receptor proliferador-activador γ del peroxisoma |
| SGLT | Transportadores de glucosa dependientes de sodio |
| SM | Síndrome metabólico |
| SOP | Síndrome de ovario poliquístico |
| STZ | Estreptozotocina |
| TG | Triglicéridos |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TZD | Tiazolidinedionas |
| VEH | Vehículo |
| α -GL | α -Glucosidasa de levadura |
| μ M | Micromolar |

I. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se inició con el propósito de determinar el potencial del extracto acuoso (EA), aceite esencial (AE) y metabolitos secundarios derivados de *Artemisia ludoviciana* para el tratamiento de la diabetes y desordenes dolorosos. Para ello se utilizaron experimentos farmacológicos *in vivo* con ratones (ICR) y ratas (Sprague-Dawley), *in vitro*, midiendo el efecto de extractos y productos puros sobre la enzima α -glucosidasa de levadura (α -GL), e *in silico*, aplicando cálculos de acoplamiento molecular.

Los resultados de los estudios del potencial hipoglucemiante en ratones hiperglucémicos (NA-STZ, 50-130 mg/kg, i.p) demostraron que la administración (p.o) de EA (31.6 mg/kg) disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre en comparación con el grupo vehículo. En la prueba de tolerancia a la glucosa ambos preparados (EA y AE, 31.6, 100 y 316 mg/kg, p.o) inhibieron la formación del pico posprandial después de la carga del carbohidrato.

Mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas (columna abierta, placa fina y líquida de alta eficiencia) se aislaron siete compuestos que fueron identificados por métodos espectroscópicos y espectrométricos como eupatilina (**63**), jaceosidina (**64**), arglanina (**8**), salvinina (**166**), ácido 3,5-dicafeoilquinico (**165**), aquilina (**31**) y deshidroleucodina (**164**). Los metabolitos **63**, **8** y **31** (5.6, 17.7 y 31.6 mg/kg, p.o) mostraron un efecto hipoglucemiante en ratones hiperglucémicos. Los estudios preliminares para establecer su mecanismo de acción permitieron concluir que los metabolitos podrían estimular la síntesis o liberación de insulina. En pruebas de tolerancia a la insulina el compuesto **8** (17.7 mg/kg, p.o) potenció el efecto de la insulina.

En las pruebas *in vitro* con la enzima α -GL se comprobó que las fracciones de hexano y acetato de etilo de EA (CI₅₀= 476 y 2486 ppm, respectivamente), y los compuestos **164** y **166** (CI₅₀= 0.375 y 1.2 mM, respectivamente) inhibían su actividad. De acuerdo a los estudios de cinética enzimática **166** se comporta como un inhibidor de tipo mixto. Los estudios de acoplamiento molecular fueron congruentes con estos resultados. El efecto inhibitorio de la enzima α -GL del producto **164** (1, 5.6 y 17.7 mg/kg, p.o) se corroboró mediante una prueba de tolerancia a la sacarosa *in vivo*.

El EA presentó un efecto antihiper glucémico en ratas con síndrome metabólico (SM) inducido por administración de fructosa al 10% en el agua de beber. Después de la administración de una dosis única del EA (316 mg/kg, p.o) durante siete días en ratas con SM, los niveles de insulina incrementaron significativamente en comparación con los animales que recibieron el vehículo. También se redujeron los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, ácido úrico, peso corporal, grasa abdominal, peso del hígado y el índice de Lee, sin embargo no se observaron cambios en la cantidad de glucógeno hepático.

Los preparados de *A. ludoviciana* (EA y AE a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg) demostraron un efecto antinociceptivo importante cuando se analizaron mediante las pruebas de la formalina y placa caliente en ratones. En el primer ensayo, los extractos redujeron el tiempo que el roedor utilizaba en lamerse la pata tratada con formalina. En el ensayo de la placa caliente, los tratamientos provocaron un incremento del tiempo de respuesta de los roedores ante el estímulo térmico. El EA (31.6, 100 y 316 mg/kg) también inhibió el tamaño del edema que se genera por la administración intraplantar de carragenina en ratones.

Para determinar el mecanismo de acción antinociceptivo del AE, los ratones se pretrataron con diversos antagonistas. En el modelo de la formalina, el efecto antinociceptivo del AE (31.6 mg/kg) fue abatido únicamente en el grupo pretratado con naloxona (NLX, 1 mg/kg). Este mismo efecto se observó en el modelo de la placa caliente (AE), por ello es posible inferir que AE es un agonista del sistema opioide.

De acuerdo a los resultados en los modelos de campo abierto y rotarod el efecto antinociceptivo de EA y AE no está relacionado con alguna modificación en la coordinación y actividad motora, tal como lo hace el diazepam.

Los metabolitos **31** y **164** (10, 17.7 y 31.6 mg/kg) también se evaluaron en la prueba de la formalina y mostraron un efecto antinociceptivo importante en la segunda fase. Por esta razón se evaluó su efecto antiinflamatorio utilizando el modelo de la carragenina. Los resultados demostraron que los dos productos (10, 17.7 y 31.6 mg/kg) inhibieron la formación del edema, y que por lo tanto son antiinflamatorios. Los efectos fueron comparables al del diclofenaco (31.6 mg/kg).

En ratones hiper glucémicos (NA-STZ) e hiper algésicos, el EA (31.6, 100 y 316 mg/kg) también disminuyó el tiempo de lamida a todas las dosis ensayadas durante la

prueba de la formalina, principalmente en la segunda fase. En la primera etapa del ensayo el efecto solo se observó a la dosis de 316 mg/kg. En el modelo de la placa caliente también se obtuvo una respuesta antihiperalgésica a las dosis de 100 y 316 mg/kg y los efectos fueron similares a los de la morfina (5 mg/kg).

Se desarrolló y validó un método analítico adecuado (lineal, preciso y exacto) para la cuantificación de las dos lactonas (**31** y **164**) mayoritarias presentes en el EA de la planta.

En resumen, los preparados (EA y AE) de *A. ludoviciana* ejercen un efecto hipoglucemiante, antihiperglucémico, antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiperalgésico en ratones. Estas propiedades farmacológicas podrían estar relacionadas con los usos populares de la especie para el tratamiento de la diabetes y padecimientos dolorosos.

Abstract

This research was undertaken to investigate the preclinical efficacy as antinociceptive and antidiabetic agents of an aqueous extract (AE), an essential oil (EO) and secondary metabolites obtained from *Artemisia ludoviciana*. Different *in vitro*, *in silico* and *in vivo* pharmacological experiments using mice (ICR) and rats (Sprague-Dawley) were used.

The results of the hypoglycemic and antihyperglycemic assays in mice (NA-STZ, 50-130 mg/kg, i.p) showed that administration (p.o.) of AE (31.6 mg/kg) significantly decreased the levels of blood glucose compared to vehicle group. In the glucose tolerance test both preparations AE and EO (31.6, 100 and 316 mg/kg) reduced the formation of the postprandial peak after the carbohydrate load.

Chromatographic techniques allowed the isolation of seven compounds, which were identified by spectroscopic and spectrometric methods as eupatilin (**63**), jaceosidin (**64**), arglanin (**8**), salvinin (**166**), 3,5-dicaffeoylquinic (**165**), achilin (**31**) and dehydroleucodin (**164**). Metabolites **63**, **8** and **31** (5.6, 17.7 and 31.6 mg/kg) showed a hypoglycemic effect mainly in hyperglycemic mice. The initial studies to establish their mechanism of action led to the conclusion that these compounds are involved in the synthesis and release of insulin. In the insulin tolerance test, compound **8** (17.7 mg/kg) potentiated the effect of insulin.

AE and its primary fractions [hexane and ethyl acetate (IC₅₀=476 and 2486 ppm, respectively)] and compounds **164** and **166** (IC₅₀=0.375 and 1.2 mM, respectively) inhibited the activity of the enzyme α -glucosidase from yeast (α -GY). According to kinetic studies, **166** behaved as a mixed type of inhibitor. Molecular docking studies were consistent with these results. The inhibitory effect of **164** on α -GY was confirmed by means of a sucrose tolerance test in mice.

AE showed an antihyperglycemic effect in rats with metabolic syndrome (MS) induced by administration of fructose 10% in the drinking water. After administration of a single dose of the AE (316 mg/kg) to the rats with MS for seven days, insulin levels increased significantly compared to animals only receiving vehicle. Likewise, the values of glucose, triglycerides, total cholesterol, uric acid, body weight, abdominal fat, liver weight and Lee index were reduced, but no changes were observed in the amount of liver glycogen.

When tested in the formalin and hot plate assays, AE and EO (31.6, 100 and 316 mg/kg) showed significant antinociceptive effect. In the first model, the effect of the extracts was determined measuring the time the animal spend licking the formalin-treated paw. In the hot plate test, the responses were measured considering the time the animals spent in the plate. AE (31.6, 100 and 316 mg/kg) also showed anti-inflammatory action. To establish the mechanism of action of EO, mice were pretreated with various antagonists. In the formalin and hot plate tests, the antinociceptive effect of EO was reversed only in the groups pretreated with naloxone (NLX). Thus, EO might be acting as an opioid agonist.

According to results obtained in the open field and rota-rod tests, the antinociceptive effect of AE and EO is not related to any change in the coordination or motor activity, as did diazepam.

Metabolites **31** and **164** (10, 17.7 and 31.6 mg/kg) were also evaluated in the formalin test and showed significant antinociceptive effect in the second phase. For this reason its anti-inflammatory effect was evaluated using the carrageenan model. The results showed that the two products inhibited edema formation in mice. The effects were comparable to that of diclofenac.

In hyperalgesic and hyperglycemic mice (NA-STZ), AE also decreased the time of licking at all doses tested in the formalin test, mainly in the second phase. In the first stage the effect was only observed at the doses of 316 mg/kg. In the hot plate model, AE showed antihyperalgesic response at the doses of 100 and 316 mg/kg.

A suitable method for quantifying lactones **31** and **164** in AE was developed and validated.

In summary, traditional preparations (AE and EO) and compounds from *A. ludoviciana* exerted hypoglycemic, antihyperglycemic, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents. These pharmacological properties could be related with the folk medicinal uses of the species for treatment of diabetes and pain disorders.

II. ANTECEDENTES

1. Género *Artemisia*.

La familia Asteraceae es una de las más diversas, cosmopolitas y ampliamente distribuidas entre las angiospermas. El número de géneros y especies que la constituyen varía según el autor; así, se estiman entre 950 y 1,400 géneros, y entre 20,000 y 30,000 especies. En América esta familia se encuentra abundantemente repartida, y en México se localiza su principal centro de diversificación (Rzedowski, 1985, 2001; Sánchez, 1980). El desarrollo de estas plantas se ha visto favorecido por los efectos de perturbación en muchos ecosistemas; en consecuencia, son especies abundantes en vegetación secundaria donde crecen como ruderales, aunque también pueden crecer como arvenses (Rzedowski, 1985).

Uno de los géneros más importantes de esta familia es *Artemisia*, nombre que se refiere a Artemis, deidad griega de la fecundidad, quien se dice, describió las virtudes del ajeno (*Artemisia absinthium* L.). El género *Artemisia* L. (tribu Antheramidae) está constituido por alrededor de 500 especies, que se distribuyen principalmente en las zonas templadas del hemisferio norte (**Figura 1**). Investigaciones recientes han permitido establecer que en América del Norte se encuentran más de 50 especies del género, 21 de las cuales se encuentran en México (Bora y Sharma, 2010; Castelo et al., 2003-2005; Turi et al., 2014).

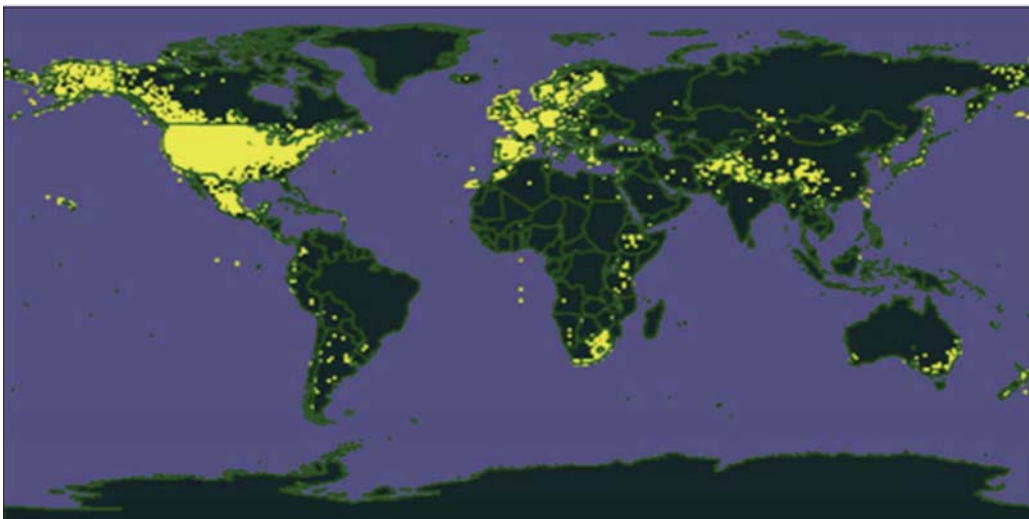


Figura 1. Distribución global del género *Artemisia* (Turi et al., 2014)

Besser (1829), publicó el primer estudio racional acerca de la taxonomía del género *Artemisia*; en ese trabajo agrupó a las especies del género en cuatro secciones considerando la morfología de la estructura floral. Las secciones propuestas fueron: *Abrotanum*, *Absinthium*, *Dracunculus* y *Seriphidium*. Filogenéticamente las dos primeras secciones son las más antiguas. Posteriormente, otros taxónomos transformaron estas secciones en subgéneros y agruparon *Abrotanum* y *Absinthium* en el subgénero denominado *Artemisia*. Cada subgénero (*Artemisia*, *Dracunculus* y *Seriphidium*) consiste de varias secciones; investigaciones quimiotaxonómicas posteriores sustentaron esta división; en estos estudios se consideró a los flavonoides como marcadores taxonómicos (Belenovskaja, 1996). Recientemente, tras numerosas revisiones intragenéricas, los diferentes estudios fitoquímicos, cariológicos, fitogeográficos y de micromorfología del polen han permitido dividir al género *Artemisia* en cinco subgéneros: *Absinthium*, *Artemisia*, *Dracunculus*, *Seriphidium* y *Tridantatae* (Muhammad et al., 2010). Sin embargo, numerosos autores indican que éstos cinco grupos necesitan más estudios científicos para generar un consenso global a niveles específicos e infra-específicos (Hayat et al., 2009).

Muchas especies de este género se han utilizado desde tiempos inmemoriales y por diferentes culturas con fines medicinales, culinarios, cosméticos y ceremoniales. Además muchas especies constituyen materias primas invaluableles para la obtención de productos y preparados de interés terapéutico. Así por ejemplo, la especie *Artemisia annua* L. (Qing Hao) es la fuente natural de artemisinina, un potente antipalúdico que sirvió de prototipo para el diseño de una nueva generación de fármacos para combatir al protozooario *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina (Anon, 1982). La aplicación de estos fármacos ha sido de importancia para combatir el paludismo a nivel global. La hierba Qing Hao se ha empleado por miles de años en la medicina tradicional china para la cura de varios padecimientos, en particular como agente antipirético, en el tratamiento de las fiebres asociadas al paludismo (Anon, 1979). Cabe mencionar, que la investigadora China Youyou Tu fue galardonada con el premio Nobel en medicina 2015 por el descubrimiento de la artemisinina.

El ajeno (*A. absinthium*), nativo de regiones templadas de Europa, Asia y norte de África, fue ampliamente utilizado por los egipcios; sus atributos medicinales como agente antihelmíntico, antiséptico, antiespasmódico, carminativo y tónico fueron transmitidos

posteriormente a los griegos (Simon et al., 1984). Hoy en día, además de sus usos culinarios, se utiliza principalmente para tratar trastornos digestivos, como tónico y en la elaboración de bebidas alcohólicas incluyendo el licor de ajeno, vermouth, pernod y aguardiente de ajeno, por mencionar algunas (Lanier, 1995).

2. Generalidades sobre *Artemisia ludoviciana* Nutt.

De las especies mexicanas, quizás la más importante por su amplio uso medicinal, mismo que se remonta a la época precolombina, es *Artemisia ludoviciana* Nutt. Esta especie fue descrita por primera vez por Thomas Nuttall en la obra “The Genera of North American Plants” en 1818 (Heinrich, 2002).

2.1. Morfología

Artemisia ludoviciana es una planta herbácea, que puede alcanzar hasta 1.5 m de alto; es perenne, aromática, con varios tallos estriados, flocoso-tomentosos que se hacen glabros con la edad; sus hojas miden hasta 15 cm de largo, indivisas y lineares a lanceoladas, elípticas u ovobadas, profundamente divididas, blanco tomentosas en ambas caras, pero pubescentes en el haz; cabezuelas a menudo péndulas, agrupadas en panículas o racimos foliosos; involucreo campanulado, sus brácteas 6 a 16, las interiores de 2 a 4 mm de largo, más o menos tomentosas por fuera; receptáculo hemisférico; flores periféricas 5 a 12, sus corolas angostamente cilíndricas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco 6 a 15, sus corolas tubulosas o con la garganta campanulada, de ± 1 mm de largo, glabros (Rzedowski, 2001; **Figura 2**). En México, la planta florece entre los meses de agosto y noviembre (McVaugh, 1984).

Artemisia ludoviciana Nutt. presenta varias sinonimias; de acuerdo a Castelo y colaboradores (2003-2005) las más importantes son:

Artemisia albula Wooton

Artemisia ghiesbreghtii Rydb.

Artemisia ludoviciana subsp. *albula* (Wooton) D.D. Keck

Artemisia ludoviciana subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck

Artemisia ludoviciana subsp. *redolens* (A. Gray) D.D. Keck

Artemisia ludoviciana subsp. *sulcata* (Rydb.) D.D. Keck

Artemisia ludoviciana var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Fernald

Artemisia mexicana Less.

Artemisia mexicana Willd. ex Spreng.

Artemisia muelleri Rydb.

Artemisia redolens A. Gray

Artemisia revoluta Rydb.

Artemisia sulcata Rydb.

Artemisia vulgaris L.

Artemisia vulgaris subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) H.M. Hall & Clem.

Artemisia vulgaris var. *ludoviciana* (Nutt.) Kuntze

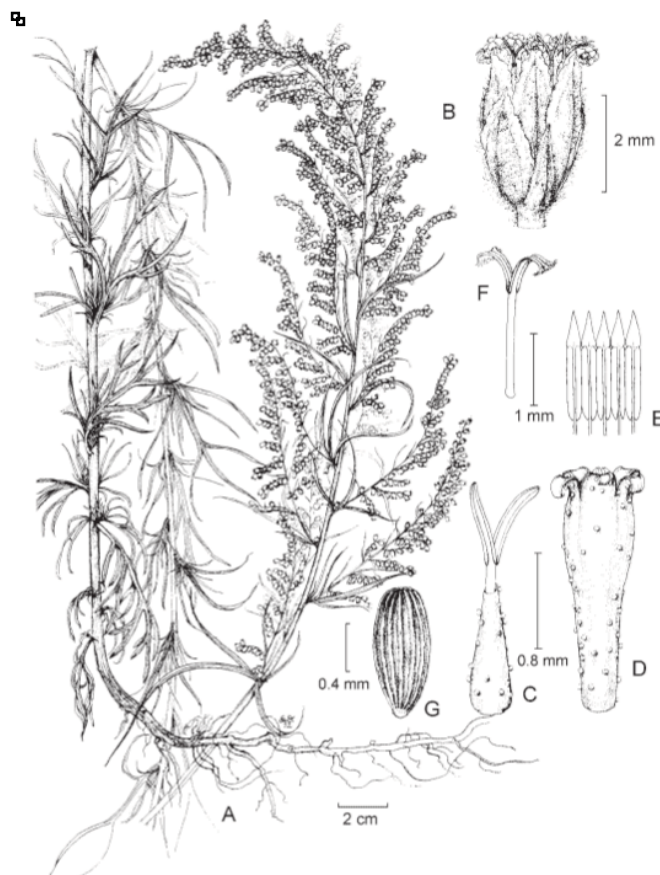


Figura 2. Descripción general de *Artemisia ludoviciana* Nutt. A. *Artemisia ludoviciana*; B. cabezuela; C. corola y ramas del estilo de la flor periférica; D. corola de la flor central; E. anteras; F. ramas del estilo; G. aquenio (Tomado de Rzedowski y Rzedowski, 1997).

2.2. Distribución

Artemisia ludoviciana se distribuye desde el sur de Canadá hasta Guatemala. En México se le encuentra principalmente en las regiones templadas del Valle de México (Balderas, 2006) aunque también habita en climas cálido, semicálido y semiseco. De acuerdo a los registros de los Herbarios Nacional (MEXU), de la Facultad de Ciencias (FCME, UNAM), el Missouri Botanical Garden, y a Villaseñor y Espinosa (1998), la planta se distribuye en todo el territorio mexicano con excepción del estado Yucatán.

Su distribución altudinal puede variar; así, en el oeste de México se encuentra entre 1500 y 2300 m s.n.m. (McVaugh, 1984); y en el Valle de México crece hasta una altura de 2900 m s.n.m. (Rzedowski, 2001)

2.3. Aspectos etnobotánicos

Artemisia ludoviciana se conoce con una gran variedad de nombres comunes incluyendo estafiate (nombre corrupto de iztauhyatl), ajenjo, azúmate de Puebla, ajenjo del país, altamiza, altaniza, artemisia, cola de zorrillo, ensencio de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maistra, incienso, incienso verde e istafiate (Martínez, 1992). Asimismo, de acuerdo a distintos registros etnobotánicos la planta se designa como istafiatl, iztauhyatl en náhuatl; quite-tes, quietee en lengua zapoteca; ambfe, mexmitzi en otomí (Martínez, 1979); guitee, iztauhyatl, haway, kaway si' isim ts'tsim, osomiate, xun, tsakam ten huitz, ten ts'ojol en dialecto tenek; ros'sabl'i en rarámuri; y kamaistra en popolca, (Argueta et al., 1994).

La referencia más antigua sobre el uso de *A. ludoviciana* se encuentra en el trabajo “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*” o mejor conocido como Códice De la Cruz-Badiano de Martín de la Cruz publicado en 1552, donde se consigna su eficacia para tratar la debilidad de las manos, mal del ano, pies lastimados, el cuerpo cansado o agobiado por demasiado calor, al tocado por el cielo o fulminado y piojos en la cabeza (De la Cruz, 1991).

En el Códice Florentino escrito entre 1555-1580 y publicado entre 1829-30, se describen algunos de los usos medicinales del iztauhyatl; en esta obra se le indica para “la caspa, tos, las angustias del corazón, los granos de la cabeza, asperezas del rostro, para la

toba de los dientes (sarro), el dolor de los pechos y de todo el cuerpo, así como para el adormecimiento de los pies, echar cólera y flema; para el ahíto, la fiebre y purificar la orina”.

Francisco Hernández en su obra “Historia Natural de Nueva España” escrita entre 1571-1577, relata “aplicada esta planta a las almorranas o atada en el brazo las seca y arruga, quita dolores que provienen de frío o de flatulencia, es favorable al pecho y cura los cólicos y dolores de intestinos, agregándole quáuhyetl o picietl fortalece las partes internas; alivia, instilado en la boca, a los infantes que vomitan leche o sufren empacho; abre las obstrucciones; mezclado con ecapatli o laurel de indias, cura a los relajados y con su cocimiento se lavan con muy buen resultado las piernas débiles o hinchadas” (Hernández, 1959).

Fray Francisco Ximénez, fiel traductor de Francisco Hernández, en la “Obra Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas y Animales en la Nueva España” y publicada en México en 1615, señala que “el iztauhyatl es una hierba de forma y propiedades semejantes al absintio, que los españoles la designan con el nombre corrupto de estafiate, del cual se hallan dos géneros, uno de hojas angostas y el otro de más anchas. En cuanto a los usos, ambas quitan los dolores nacidos de causa fría y de ventosidades, son útiles para el pecho, curan los dolores cólicos, y de ijada, socorre a los niños que vomitan la leche” (Ximénez, 1888).

En el Atlas de Medicina Tradicional publicado por el Instituto Nacional Indigenista (Argueta et al., 1994) se indica textualmente que en el siglo XVI “las Relaciones Geográficas” proporcionan la siguiente información acerca de la planta: aprovechada para dolor de cabeza, molida y bebida es muy saludable para las pechugueras.

En el siglo XVIII, el misionero jesuita Juan de Esteyneffer en su obra “Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades” indica la efectividad de la planta para tratar problemas gastrointestinales, la perlesía, sordera, gusanos, vómitos, obstrucción del hígado, hidropesía, mal de loanda, pujos y lombrices (Esteyneffer, 1978). A finales de ese siglo, el botánico y farmacéutico Vicente Cervantes como parte de su discurso inaugural del Jardín Botánico en 1791, escribió su Ensayo a la Materia Medica Vegetal de México (Cervantes, 1889) donde describe la utilización de 293 plantas, entre ellas el estafiate como estomática, balsámica, antihelmíntica, febrífuga, antivenérea y expelente. Esta obra se publicaría años

después. Para el siglo XIX, se señalan usos similares en la obra Ensayo para la Materia Medica Mexicana arreglada por una comisión nombrada por la Académica Médico-Quirúrgica, coordinada por De la Cal y Bracho, y publicada en Puebla en 1832. Posteriormente, en la Farmacopea Mexicana publicada por la Academia Farmacéutica de México en 1846, mencionan al ajenjo del país como *Artemisia laciniata*, misma que es utilizada como parte del vino alhucema, recomendado como tónico y resolutivo. En la Nueva Farmacopea Mexicana publicada en 1876 por la sociedad farmacéutica mexicana, la refieren como tónico amargo y estimulante, emenagogo y antihelmíntico. En ambas farmacopeas se enlistan varias preparaciones incluyendo extractos, elixires, alcoholatos, vinos, pomadas, vinagres, aceites esenciales y mezclas de polvo para tisanas que contienen el ajenjo del país (*Artemisia ludoviciana*) y el extranjero (*Artemisia absinthium*).

La Sociedad Mexicana de Historia Natural indica el uso del estafiate como antiparasitario, eupéptico, emenagogo y para heridos por el rayo. Francisco de Asís en 1886 la reseña como útil para la neurosis, los vómitos de leche de los infantes, disentería y para reumatismos articulares mezclada con mecapatli y otras yerbas. Menciona que médicos nahoas trataban la pitiriasis, que es un tipo de escamación de la piel de la cabeza, con un preparado que contenía estafiate. También para los sudores abundantes de los pies y como antiespasmódica. Dato curioso que apunta es que: “esta yerba el que la trae consigo junto al corazón, da esfuerzo, ánimo y osadía, su polvo bebido con vino quita el cansancio del camino, ahuyenta las moscas, cociéndola con leche de cabra y untar con esto las paredes”. Agrega, es usada para las hemicranias, la falta de sueño debido a una indigestión y para corroborar los órganos genitales (Flores, 1982). A finales del mismo siglo, Eleuterio González menciona sus usos como tónico amargo, estomático, emenagogo y antihelmíntico; ha sido usado también como antiperiódico y contra las leucorreas y la caquexia palustre”. En Datos para la Materia Médica Mexicana, se retoma la información de Ximénez y de Cervantes al experimentar con diversos extractos de la planta. En los últimos años de este siglo, el Instituto Médico Nacional (IMN) la consigna como: antiparasitaria, eupéptica, antipalúdica, catártica, oxitócica, y que produce parálisis.

Fernando Altamirano (1904), en su texto “Materia Medica Mexicana: A Manual of Mexican Medicinal Herbs” señala que el extracto alcohólico de la planta no es tóxico para animales, retarda la acción de los jugos gástricos en lugar de acelerarla; atribuye el retardo

a la neutralización de la acidez estomacal. Describe también que el aceite esencial de la especie mexicana es menos tóxico que el del ajeno europeo. Alfonso Herrera (1921) señala que “esta planta puede emplearse como antihelmíntica y como modificador de la sensibilidad”; añade, “es falsa la creencia vulgar de que obra como estomático; en algunos casos parece haber obrado como ligero aperitivo”. Maximino Martínez por otra parte, la indica como aperitiva, antirreumática, analgésica, antiparasitaria, eupéptica, advierte que produce parálisis y sirve para la hipoclorhidria. Luis Cabrera (1958) consigna al estafiate para la bronquitis, como antiespasmódico y catártico, en cólicos hepáticos por cálculos, para las congestiones hepáticas, y en dispepsia.

En publicaciones recientes sus usos más documentados incluyen el tratamiento de varios padecimientos gastrointestinales como dolor de estómago, cólicos estomacales, indigestión, dolor e inflamación en la boca del estómago, estreñimiento, gastritis, diarrea, vomito, disentería, afecciones parasitarias, dolores de cabeza y oído, y cólicos menstruales (Ruiz-Salazar, 1989; Martínez, 1992; Argueta et al., 1994; Mendoza et al., 1997; Heinrich, 2002; Jiménez, 2011). Otros reportes señalan su efectividad para el tratamiento de la bronquitis (Amo, 1979), congestión del pecho, mareos, nervios (Bye, 1986), enfermedades del corazón (Morton, 1981), neumonía, tos (Molina-Salinas et al., 2006), infecciones e inflamaciones, diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Romero-Cerecero et al., 2009), así como problemas vesiculares y de fertilidad (Heinrich, 2002). Tradicionalmente la planta se consume bajo la forma de una infusión que se elabora a partir de las hojas, partes aéreas (hojas, tallos y flores) o las flores (Heinrich, 2002), es común que esta planta se ingiera mezclada dependiendo del uso.

Ortiz de Montellano (1994) recopiló abundante información acerca de los usos precoloniales y coloniales del iztauhyatl. De acuerdo al autor, el uso principal del iztauhyatl era para las limpias rituales; así el iztauhyatl, se asociaba con las enfermedades “causadas” por Tláloc y por otras deidades del complejo agricultura-fertilidad. Por tal motivo, durante los sacrificios a Tláloc los espectadores llevaban flores de iztauhyatl; se creía que si se abanicaba a los niños pequeños con las flores, resistirían las infestaciones por gusanos. También se usaba para curar los padecimientos de origen mágico, por ejemplo muchas culturas incluídas la azteca, creían que ciertas enfermedades eran consecuencia de la introducción de pequeños objetos, como trocitos de hueso, pedernales debajo de la piel de

la víctima; el remedio solía entrañar la eliminación del objeto por succión, luego, el curador mascaba iztauhyatl y lo salpicaba en la piel del paciente (Ortiz de Montellano, 1994). De la información anterior, concluye el historiador la clara asociación del iztauhyatl con el rayo y la fiesta de huehuateotl (dios viejo), porque sólo a los viejos se les permitía hacer limpias. Finalmente señala, que el estafiate sigue conservando sus propiedades mágicas y rituales en la cura de enfermedades culturales tradicionales como el mal de ojo, la caída de mollera o los malos aires, por mencionar algunas.

Como se puede apreciar, desde tiempos precoloniales y hasta nuestros días, *A. ludoviciana* se ha utilizado con fines curativos para aliviar numerosos padecimientos. Al igual que en el caso de otras plantas sus usos han sufrido un continuo proceso de adecuación a las enfermedades emergentes o con una alta incidencia en la población (Aguilar y Xolalpa. 2002). En la actualidad, algunos de los usos consignados por las culturas precolombinas aún se siguen conservando, por ejemplo como analgésico, pero otros, como su efecto antidiabético (Alarcón-Aguilar, et al., 1998; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Romero-Cerecero et al., 2009), son recientes. En los trabajos de Andrade-Cetto y Heinrich (2005), Romero-Cerecero y colaboradores (2009), se indica que para tratar la diabetes las partes aéreas del estafiate deben consumirse bajo la forma de infusión.

2.4. Actividad biológica

Numerosos estudios científicos realizados sobre *Artemisia ludoviciana* han permitido demostrar que algunos de sus preparados poseen varias propiedades farmacológicas, algunas de las cuales correlacionan con los usos medicinales que se le atribuyen a la planta en la medicina vernácula. En nuestro país los primeros trabajos científicos encaminados a comprobar sus usos medicinales atribuidos se realizaron a finales del siglo XIX y principios de siglo XX en el IMN. Así en el volumen III de los Anales del Instituto Médico Nacional (Armendáris, 1897) y en la Materia Medica Mexicana (1904) de Fernando Altamirano se asienta, que su uso como estomáquico no pudo comprobarse ya que en conejos tratados con el extracto de la planta se observó una disminución de la acción de los jugos gástricos. En otros experimentos se demostró que la esencia del estafiate paraliza la movilidad de ranas, dejando intacta su sensibilidad. Por otro lado, se realizaron

experimentos para comprobar si el estafiate era capaz de inducir el aborto en conejas preñadas a la dosis de 0.8 a 3 g; los resultados fueron negativos. Más adelante en el volumen 9 de los Anales (Villaseñor, 1907) se menciona que el estafiate aumenta la secreción salivar y la secreción gástrica, y que no es tóxico.

En pacientes del hospital San Andrés en la ciudad de México se realizaron estudios con diversos preparados del estafiate encontrándose que el extracto hidroalcohólico en algunos casos sirve como un aperitivo suave; la tintura de la misma planta produjo mejores resultados, comprobándose entonces su eficacia como aperitivo. En otro estudio, el extracto fluido de estafiate se utilizó como eupéptico en un paciente nefrítico, obteniéndose de nueva cuenta resultados satisfactorios (Castanedo, 1908). Pero, el mejor efecto observado de esta planta fue el antihelmíntico, ya que en varios enfermos con signos y síntomas de parásitos se les suministró la planta bajo la forma de cápsulas, aceite esencial o polvo de las flores obteniéndose una mejoría notable de los pacientes. Por tanto se comprobó que el estafiate presenta efectos antiparasitarios y eupépticos (Terres, 1897; Castanedo 1906).

Malagón y colaboradores (1997) demostraron que el extracto etanólico del estafiate presenta un efecto antiprotozoario contra *Plasmodium yoelii*. Asimismo, a varios extractos (acuoso, metanólico, hexánico y acetónico) del estafiate se les comprobó una buena actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Fernández et al., 2005; Calzada et al., 2006). Zavala-Sánchez y colaboradores (2002) demostraron que el nonanal del aceite esencial de *A. ludoviciana* es el responsable de la actividad antidiarreica de la planta. En otros trabajos se comprobó que el extracto metanólico del estafiate presenta un efecto antibacteriano ya que inhibió de manera significativa el crecimiento de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri-2* (Alanís et al., 2005; Dubal et al., 2009) así como de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Navarro et al., 1996). García y colaboradores (2006) demostraron que el extracto etanólico presenta también un efecto inhibitorio del crecimiento y producción de enterotoxinas en cepas de *Vibrio cholerae*, esta actividad se correlaciona con lo observado por Sánchez y colaboradores (2010), donde la incubación de *V. cholerae* con el extracto metanólico de estafiate generó un daño en la membrana plasmática. Jiménez-Arellanes y colaboradores (2003) encontraron que los extractos hexánico y metanólico de estafiate inhibieron el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis. Más recientemente, Castillo-Juárez y

colaboradores (2009) demostraron que el extracto acuoso de *A. ludoviciana* inhibe de manera importante el crecimiento de *Helicobacter pylori*, principal causante de la gastritis y úlceras pépticas. El estafiate también inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Navarro et al., 1996), y de diferentes especies del género *Phytophthora* (Damian et al., 2010) por otra parte, afecta el desarrollo del gorgojo del maíz (Juárez-Flores et al., 2010) e inhibe el crecimiento de otras plantas (Rodríguez et al., 1976); éste efecto alelopático se atribuye a la presencia de la lactona sesquiterpenica aquilina en la planta. En este mismo trabajo se encontró que la eudesmanolida ludovicina A es citotóxica. Bork y colaboradores (1996, 1997) demostraron que el extracto etanólico presenta un efecto antiinflamatorio *in vitro* ya que inhibe al factor de transcripción NF- κ B. Alarcón-Aguilar y colaboradores (1998), realizaron el primer estudio del potencial antihiper glucémico de *A. mexicana* en conejos sanos utilizando una prueba de tolerancia a la glucosa; ellos concluyeron que la dosis administrada no modificaba los niveles de glucosa con respecto al control. Años más tarde, Anaya- Eugenio (2012) demostró en diferentes pruebas farmacológicas que la administración oral del extracto orgánico de *A. ludoviciana* a ratones normoglucémicos e hiper glucémicos reduce significativamente los niveles de glucosa en sangre (Anaya- Eugenio et al., 2012). Por último, Estrada-Soto y colaboradores (2012) comprobaron que el extracto metanólico de *A. ludoviciana* posee propiedades vasorrelajantes mediadas por un antagonismo del sistema muscarínico y por el bloqueo de los canales de calcio.

2.5. Composición química

En las últimas cuatro décadas se han realizado un gran número de estudios químicos sobre la especie *A. ludoviciana*. Estos trabajos han permitido establecer que los metabolitos más abundantes de la planta pertenecen a la categoría de los monoterpenoides (1-7), lactonas sesquiterpénicas (8-60) y flavonoides (61-80). Las lactonas sesquiterpénicas pertenecen en su mayoría a la categoría de las eudesmanólidas (8- 30), aunque también se han reportado algunas guayanólidas (31-51) y germacranólidas (52-60). Los flavonoides pertenecen principalmente a los grupos de las flavonas (63-80), flavanonas (62), y flavonoles (61). En la Tabla 1 se resumen los compuestos aislados a la fecha de *A. ludoviciana*.

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana*.

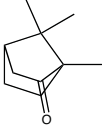

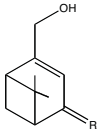
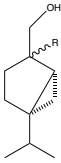
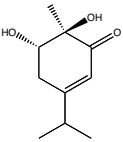
| MONOTERPENOIDES | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|-----------------------|--------------------------------|
| Alcanfor (1)  | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic <i>et al.</i> , 1991 |
| Borneol (2)  | | |
| 4-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3) R=O Mirtenol (4) R=H, β-OH  | | |
| (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-α-(hidroxi metil)-5-isopropilbiciclo[3.1.0]hexan-2-ol R=1α-OH (5) R=1β-OH (6)  | | |
| (5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5,6-dihidroxi-3-isopropil-6-metilciclohex-2-en-1-ona (7)  | | |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

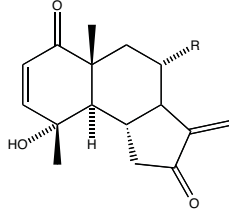
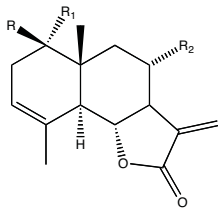
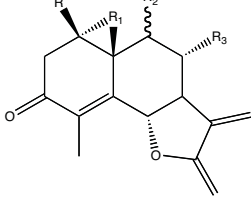
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|--|--|
|  <p>Arglanina (8) R= H</p> <p>Artemexifolina (9) R=OAc</p> | <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> | <p>Romo et al., 1970</p> <p>Mata et al., 1984</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993</p> <p>Balderas, 2006</p> <p>Mata et al., 1984</p> |
|  <p>Douglanina (10) R=R₂=H, R₁=OH</p> <p>Ludalbina (11) R=H, R₁=OH, R₂=OAc</p> <p>Santamarina (12) R=OH, R₁=R₂=H</p> | <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>albula</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> A. <i>mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> | <p>Sánchez-Viesca y Romo, 1963</p> <p>Romo et al., 1970</p> <p>Lee y Geissman, 1970</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993</p> <p>Geissman y Saitoh, 1971</p> <p>Mata et al., 1984</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993</p> <p>Mata et al., 1984</p> |
|  <p>Armexifolina (13) R=OH, R₁=R₂=R₃=H</p> <p>Ludovicina C (14) R₁= OH R=R₂=R₃=H</p> <p>8 α-Acetoxiarmexifolina (15) R=OH, R₁=R₂=H, R₃=OAc</p> <p>(16) R=R₁=R₃=H, R₂=OH</p> | <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> | <p>Mata et al., 1984</p> <p>Balderas, 2006</p> <p>Lee y Geissman, 1970</p> <p>Mata et al., 1984</p> |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

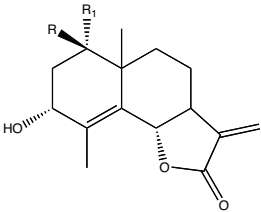
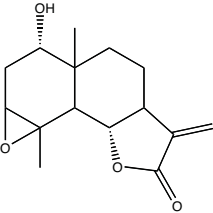
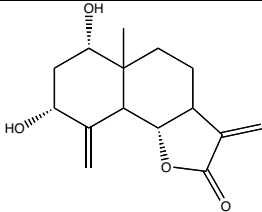
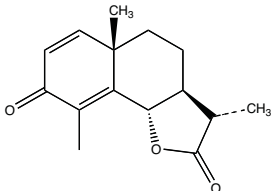
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|---|--|---|
|  <p>Armexina (17) R=H, R₁=OH</p> <p>Armefolina (18) R=OH, R₁=H</p> | <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. mexicana</i> var. <i>angustifolia</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> | <p>Romo y Tello, 1972</p> <p>Mata et al., 1984</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993</p> <p>Balderas, 2006</p> |
|  <p>Ludovicina A (19)</p> | <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> | <p>Lee y Geissman, 1970</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993</p> <p>Balderas, 2006</p> |
|  <p>Ludovicina B (20)</p> | <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> | <p>Lee y Geissman, 1970</p> |
|  <p>Santonina (21)</p> | <p><i>A. mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> | <p>Viehoever y Capen, 1923</p> <p>Rio de la Loza, 1897</p> <p>Lee y Geissman, 1970</p> |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

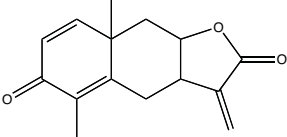
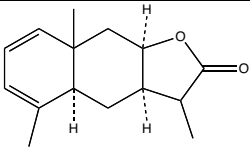
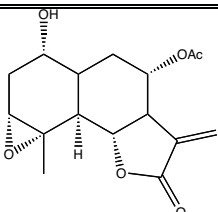
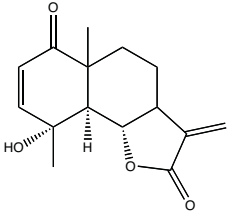
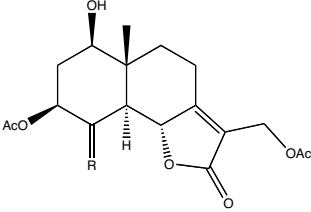
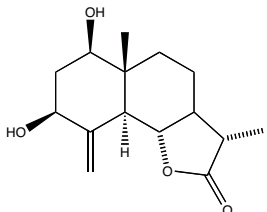
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|---|---|-------------------------|
|  Yomogina (22) | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Lee y Geissman, 1970 |
|  Antemidina (23) | <i>A. ludoviciana</i> | Epstein y Jenkins, 1979 |
|  α -Epoxiludalbina (24) | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Mata et al., 1984 |
|  Vulgarina (25) | <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> | Ohno et al., 1980 |
|  (26) R=CH ₂ (27) R= Me, α -OH | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  (28) | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

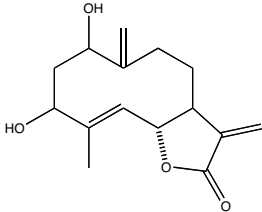
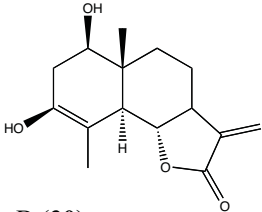
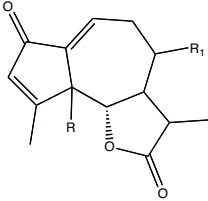
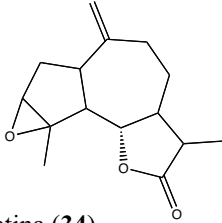
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Eudesmanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|--|--|
|  <p>Ridentina (29)</p> | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | <i>Ruiz-Cancino et al.</i> , 1993 <i>Balderas</i> , 2006 |
|  <p>Ridentina B (30)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | <i>Jakupovic et al.</i> , 1991 |
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas) | ESPECIE | REFERENCIA |
|  <p>Aquilina (31) R=R₁=H</p> | <i>A. ludoviciana</i> <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Domínguez y Cárdenas, 1975 Ohno et al., 1980 Balderas, 2006 |
| Deacetilmatricarina (32) R=H, R ₁ =OH | <i>A. ludoviciana</i> | Domínguez y Cárdenas, 1975 |
| Parisina (33) R=OH, R ₁ =H | <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> | Ohno et al., 1980 |
|  <p>Estafiatina (34)</p> | <i>A. mexicana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Sánchez-Viesca y Romo, 1963 Romo et al., 1970 Balderas, 2006 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

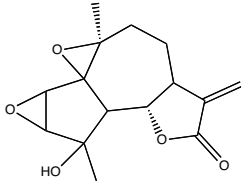
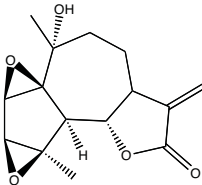
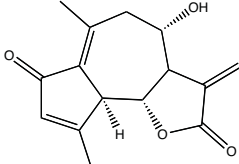
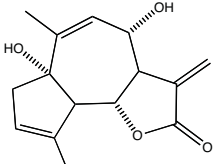
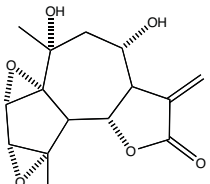
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|---|---|--|
|  <p>Crisartemina A (35)</p> | <i>A. mexicana</i> | Sánchez-Viesca y Romo, 1963 Romo et al., 1970 |
|  <p>Crisartemina B (36)</p> | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> | Ruiz-Cancino et al., 1993 Ohno et al., 1980 |
|  <p>11,13-Deshidrodesacetilmatricarina (37)</p> | <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> | Ohno et al., 1980 |
|  <p>Rupicolina A (38)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>Rupina A (39)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

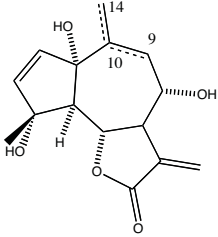
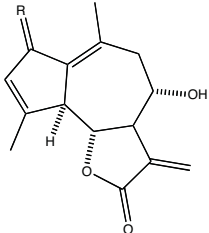
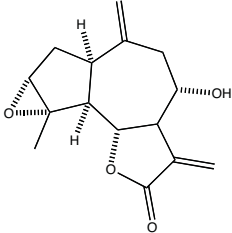
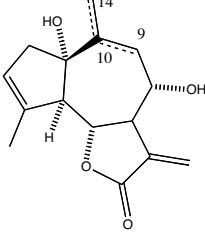
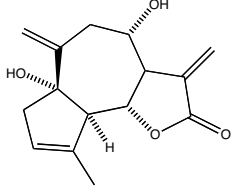
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|---|-----------------------|------------------------|
|  <p>(40) $\Delta^{10(14)}$ (41) Δ^9</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(42) R= CH₂ (43) R= O</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(44)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(45) $\Delta^{10(14)}$ (46) Δ^9</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(47)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

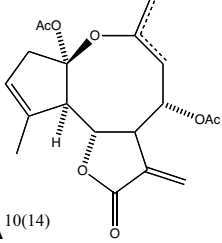
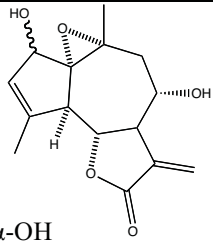
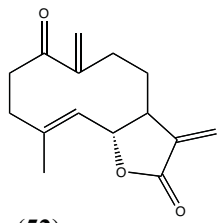
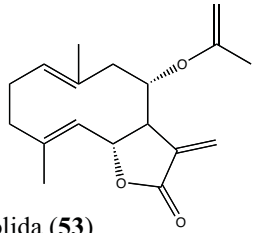
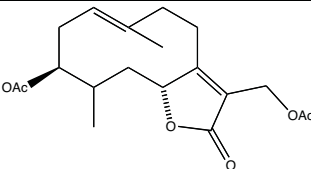
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Guayanólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|--|---------------------------|
|  (48) $\Delta^{10(14)}$ (49) Δ^9 | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  (50) 2 α -OH (51) 2 β -OH | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Germacranólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|  Artemorina (52) | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Ruiz-Cancino et al., 1993 |
|  Tulipinolida (53) | <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> | Mata et al., 1984 |
|  (54) | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

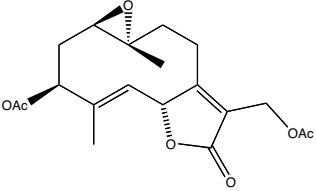
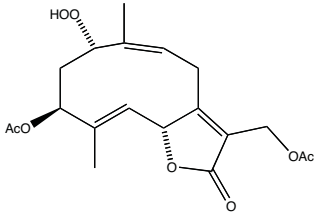
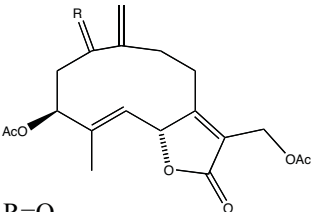
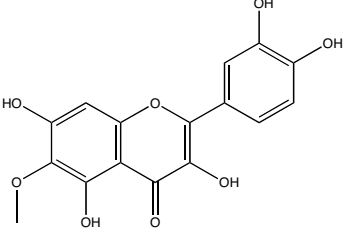
| LACTONAS SESQUITERPENICAS (Germacranólidas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|---|------------------------|
|  <p>(55)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(56)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
|  <p>(57) R=O (58) R=H, α-OH (59) R=H, β-OH (60) R=H, β-OOH</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
| FLAVONOIDES (Flavonol) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|  <p>Eupafolina (61)</p> | <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> | Liu y Mabry, 1982 |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

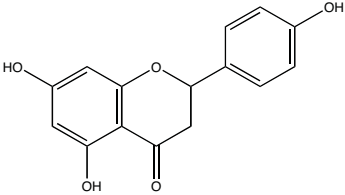
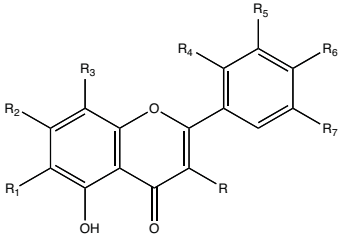
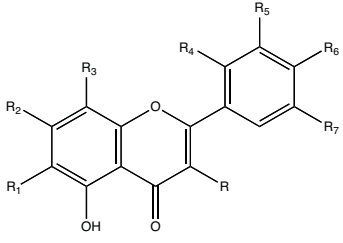
| FLAVONOIDES (Flavanonas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|---|--|--|
|  <p>Naringenina (62)</p> | <i>A. ludoviciana</i> | Jakupovic et al., 1991 |
| FLAVONOIDES (Flavonas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|  <p>Eupatilina (63) R=R₃=R₄=R₅=H, R₁=R₆=R₇=OMe, R₂=OH</p> <p>Jaceosidina (64) R=R₃=R₄=R₅=H, R₁=R₇=OMe, R₂=R₆=OH</p> <p>5,7,2',4'-Tetrahidroxi-6,5'- dimetoxiflavona (65) R=R₃=R₅=H, R₁=Me, R₂=R₄=R₆=OH, R₇=OMe</p> <p>5,7,4'-Trihidroxi-6,3',5'- trimetoxiflavona (66) R=R₃=R₄=H, R₁=R₅=R₇=OMe, R₂=R₆=OH</p> <p>5,7,3'-Trihidroxi-6,4',5'- trimetoxiflavona (67) R=R₃=R₄=H, R₁=R₆=R₇=OMe, R₂=R₅=OH</p> <p>5,7,3'4'-Tetrahidroxi-6,5'- dimetoxiflavona (68) R=R₃=R₄=H, R₁=R₇=OMe, R₂=R₅=R₆=OH</p> <p>5,7-Dihidroxi-3,6,8,4'- tetrametoxiflavona (69) R=R₁=R₆=OMe, R₂=OH, R₃=Me, R₄=R₅=R₇=H</p> <p>5,7,4'-Trihidroxi-3,6- dimetoxiflavona (70) R=R₁=OMe, R₂=R₆=OH, R₃=R₄=R₅=R₇=H</p> | <p><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> <i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i> <i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p> | <p>Liu y Mabry, 1982 Ruiz-Cancino et al., 1993 Balderas, 2006</p> <p>Ruiz-Cancino et al., 1993 Liu y Mabry, 1982</p> |

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *Artemisia ludoviciana* (Continuación).

| FLAVONOIDES (Flavonas) | ESPECIE/SINONIMIA | REFERENCIA |
|--|--|--|
|  <p>Axilarina (71) R=R₁=OMe, R₂=R₅=R₆=OH, R₃=R₄=R₇=H</p> <p>Selagenina (72) R=R₁=R₃=R₄=H, R₂=R₅=R₆=OH, R₇=OMe</p> <p>3',4'-Dimetil eter de la luteolina (73) R=R₁=R₃=R₄=R₇=H, R₂=OH, R₅=R₆=OMe</p> <p>Tricina (74) R=R₁=R₃=R₄=H, R₂=R₆=OH, R₅=R₇=OMe</p> <p>Hispidulina (75) R=R₃=R₄=R₅=R₇=H R₁=OMe, R₂=R₆=OH</p> <p>Crisoeriol (76) R=R₁=R₃=R₄=R₇=H, R₂=R₆=OH, R₅=OMe</p> <p>Campferol 3-metil eter (77) R=OMe, R₁=R₃=R₄=R₅=R₇=H, R₂=R₆=OH</p> <p>Apigenina (78) R₂=R₆=OH R=R₁=R₃=R₄=R₅=R₇=H</p> <p>Luteolina (79) R=R₁=R₃=R₄=R₇=H, R₂=R₅=R₆=OH</p> <p>5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona (80) R=R₃=R₄=R₇=H, R₁=R₂=R₅=R₆=OMe</p> | <p><i>A. ludoviciana</i> var. <i>ludoviciana</i></p> <p><i>A. ludoviciana</i> ssp. <i>mexicana</i></p> | <p>Liu y Mabry, 1982</p> <p>Balderas, 2006</p> |

También se ha constatado que la planta es rica en un aceite esencial constituido principalmente por monoterpenoides y sesquiterpenoides. Así por ejemplo, en un primer trabajo realizado con la esencia del *A. mexicana* recolectada en México, Manjarrez y Medina (1964) identificaron como componente mayoritario al (-) alcanfor (53%). Después, Blust y Hopkins (1987) encontraron como componentes mayoritarios del aceite esencial del

estafiate a los productos 1,8 cineol, alcanfor, borneol, y la guayanólida aquilina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zavala-Sánchez y cols. (2002), siendo el alcanfor el compuesto de mayor abundancia (44%). En un estudio más reciente realizado por Lopes-Lutz y colaboradores (2008) se identificaron cuarenta y cinco compuestos en el aceite esencial de *A. ludoviciana*; la mayoría de los constituyentes reportados pertenecen a monoterpenoides (48.8–75.6%) y sesquiterpenoides oxigenados (17.8%). Los productos mayoritarios de la esencia se caracterizaron como 1,8 cineol (21.5–27.6%), alcanfor (15.9–37.3%) y la davanona (11.5%). El análisis del aceite esencial de una de las colectas estudiadas en en el presente trabajo se identificaron como componentes mayoritarios al alcanfor (21.4 %), borneol (18 %) y γ -terpineol (18 %; Anaya-Eugenio, 2012. **Tabla 2**).

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de *Artemisia ludoviciana*. (1- Manjarrez y Medina, 1964. 2- Blust y Hopkins, 1987. 3- Zavala- Sánchez, 2002. 4- Lopes-Lutz et al., 2008; Anaya-Eugenio, 2012).

| | Identificación | % de Área | | | | | | Identificación | % de Área | | | | | |
|------------|---|-----------|-----|---|-----|-----|------------|----------------------------|-------------------------|------|------|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 81 | Hexanal | | | | 0.1 | | 102 | Gliceril butirato | | 1.6 | | | | |
| 82 | 1-Hidroxio- pentanona | | | | | 0.4 | 103 | α -Felandreno | 12.4 | | 0.2 | | | 0.3 |
| 83 | (Z)-Hex-3-en-1-ol | | | | | 0.1 | 104 | Mesitileno | | | | | 0.1 | |
| 84 | (2E)-Hexenal | | | | | 0.1 | 105 | α -Terpineno | | | | | 0.4 | |
| 85 | Santolina trieno | | | | | 0.2 | 106 | <i>p</i> -Cimeno | | 3.2 | | 0.8 | | 0.5 |
| 86 | 2,5-Dietenil-2-metil- tetrahidrofurano | | | | | 0.3 | 107 | Limoneno | 13.0 | | | | 0.2 | |
| 87 | Triciclono | | | | | 0.1 | 108 | β -Felandreno | 13.9 | | | | | |
| 88 | α -Tujeno | | 2.2 | | | 0.1 | 109 | 1,8-Cineol | | 44.4 | 0.7 | 22 | | 3.4 |
| 89 | α -Pino | | 4.4 | | | 1.6 | 110 | Lavander lactona | | | | | | 3.4 |
| 90 | Campfeno | | 8.7 | | | 2.3 | 0.1 | 111 | Artemisia cetona | | 1.0 | | | |
| 91 | Tuja-2,4(10)-dieno | | | | | 0.1 | 112 | Acetaldehido de benceno | | | | | | 0.3 |
| 92 | Benzaldehido | | | | | t | 1.0 | 113 | Ocimeno | | | 0.8 | | 0.1 |
| 93 | 2-(5H)-Furanona-5,5- dimetil | | | | | | 1.3 | 114 | <i>cis</i> -Arbusculona | | | | | 0.2 |
| 94 | Thuja-2,4(10)-diona | | | | | | 0.2 | 115 | γ -Terpineno | | | | | 0.8 |
| 95 | Sabineno | | | | | 0.6 | | 116 | Linalol | | 14.9 | | | |
| 96 | Artemiseol | | | | | 0.8 | | 117 | C-9-Aldehido | | | 4.9 | | |
| 97 | 2,3-Dehidro-1,8- cineol | | | | | | 0.2 | 118 | Filifolona | | | | | 1.8 |
| 98 | 3-Metil-hepta-1,6- dien-3-ol | | | | | | 0.1 | 119 | Isaforona | | | | | 0.3 |
| 99 | β -Pino | | 1.4 | | | | 0.4 | 120 | α -Tujona | | 2.8 | 1.5 | | 0.8 |
| 100 | 6-Metil-5-hepten-2- ona | | | | | | t | 121 | Feniletil alcohol | | | | | 0.2 |
| 101 | Mirceno | | 0.5 | | | | | 122 | Crisantemona | | | | | 1.3 |

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados del aceite esencial de *Artemisia ludoviciana*. (1- Manjarrez y Medina, 1964. 2- Blust y Hopkins, 1987. 3- Zavala- Sánchez, 2002. 4- Lopes-Lutz et al., 2008; Anaya-Eugenio, 2012, continuación).

| | Identificación | % de Área | | | | | | Identificación | % de Área | | | | | |
|-----|--|-----------|-----|------|------|------|-----|---|-----------|-----|-----|------|-----|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 123 | β -Tujona | | | | | 0.6 | 143 | Acetato de bornilo | 0.3 | | 0.1 | 2.2 | | |
| 124 | 6-Campfenol | | | | | 2.3 | 144 | Timol | | 1.3 | | | | |
| 1 | Alcanfor | 53.6 | 8.7 | 44.9 | 15.9 | 21.4 | 145 | 6-metil-5-Hepten-2-ona | | | | | 0.2 | |
| 2 | Borneol | 7.1 | 6.8 | 0.9 | 2.3 | 18.0 | 146 | Eugenol | | | 0.3 | | 0.4 | |
| 125 | <i>trans</i> -Pinocarveol | | | | | 0.5 | 147 | Acetil eugenol | | 1.7 | | | | |
| 126 | Isoborneol | | | | | 2.4 | 148 | C-12-Aldehido <i>cis</i> - Treo-davanfurano | | 1.0 | | | | |
| 127 | <i>cis</i> -Verbenona | | | | | 1.0 | 149 | Germacreno D | | | | 0.3 | | |
| 128 | <i>p</i> - α -Dimetilbenzil alcohol | | | 21.4 | | | 150 | β -Cariofileno | | | | | 0.2 | |
| 129 | Metil carvacrol | | | 1.4 | | | 151 | Davana eter (isomero) | | | | t | | |
| 130 | 4-Terpineol | | | | 2.2 | 3.5 | 152 | Davana eter (isomero) | | | | 2.9 | | |
| 131 | <i>p</i> -8-Cimenol | | | | 0.2 | | 153 | Oxido de artedouglasia A | | | | 1.0 | | |
| 132 | α -Terpineol | | | 1.2 | 0.7 | 0.9 | 154 | Nerolidol | | | | 0.4 | | |
| 133 | Carvacrol | | | 4.7 | | | 155 | (-)-Spatulenol | | | 1.9 | | | |
| 134 | Mirtenol | | | | 1.0 | 0.9 | 156 | Oxido de artedouglasia D | | | | | 0.8 | |
| 135 | γ -Terpineol | | | | | 18.0 | 157 | Benzoil benzoato | | | 0.8 | | | |
| 136 | <i>trans</i> -Piperitol | | | | t | 1.0 | 158 | Davanona B | | | | 0.2 | | |
| 137 | <i>trans</i> -Carveol | | | | 0.2 | 0.7 | 159 | Oxido de artedouglasia B | | | | 0.4 | | |
| 138 | <i>nor</i> -Davanona | | | | 1.0 | | 160 | Davanona | | | | 11.5 | 0.2 | |
| 139 | Carvona | | | | t | 0.3 | 161 | Oxido de cariofileno | | | | | 0.9 | |
| 140 | <i>p</i> -Cumenol | | | | | 0.7 | 162 | Longivebenona | | | | | 1.9 | |
| 141 | <i>trans</i> -Sabinil acetato | | | | | 2.2 | 163 | | | | | | | |
| 142 | Piperitona | | | | t | 0.6 | | | | | | | | |

3. Especies del genero *Artemisia* con propiedades hipoglucemiantes

Artemisia ludoviciana pertenece a un genero de plantas que ha sido usada por numerosas poblaciones alrededor del mundo para el tratamiento de la DMT2. Así por ejemplo, *A. pallens* se utiliza en el sur de la India (Mukherjee, 2006); en Arabia Saudita, tradicionalmente se consume la decocción de *A. abyssinica* (Mossa, 1985), en China se prescriben 33 especies de este género para el tratamiento clínico de la DMT2 (Li, 2004).

En este contexto, existen numerosos trabajos científicos que validan el uso de algunas especies del género *Artemisia* como especies potencialmente antidiabéticas. Entre las especies con mayor número de estudios destacan *A. dracunculus*, *A. herba alba*, *A. capillaris* y *A. princeps*.

En el caso de *A. dracunculus*, se comprobó que la administración oral de un extracto estandarizado de la planta preparado con etanol (Tarralin, PMI 5011), durante siete días a ratones, tanto KK-Ay como de la cepa ICR diabetizados con STZ, provocaba una disminución de los niveles de glucosa sanguínea y un incremento en los niveles de insulina (Ribnicky et al., 2006). En este mismo estudio se comprobó que el preparado provocaba una disminución de la expresión de la enzima PECK, principal indicador del metabolismo de la glucosa hepática, y un incremento de la unión del péptido similar a glucagón (GLP-1) a su receptor *in vitro*. Los dos últimos resultados fueron congruentes con el incremento de los niveles de insulina observado en los experimentos *in vivo* (Ribnicky y Raskin, 2007). Asimismo, otro estudio subsecuente *in vitro* reveló que el preparado mejoraba la acción de la insulina al incrementar la captación de glucosa en células musculares humanas, el efecto fue dependiente de la concentración; también se encontró que la concentración de glucógeno se restauraba en presencia del PMI 5011; finalmente, en este mismo estudio se observó una disminución de la expresión de la enzima PTP-1B (Wang et al., 2008). El efecto farmacológico de este extracto se atribuyó a la presencia de una serie de metabolitos pertenecientes a la categoría de los flavonoides davidigenina (**167**), 6-desmetoxicapilarisina (168), 2',4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (**169**) y sakuranetina (**170**) y del ácido 4,5-dicafeoilquínico (**181**) que fueron evaluados solo en las pruebas *in vitro*. Los resultados obtenidos en los trabajos descritos, permitieron proponer que el modo de acción del preparado PMI 5011 involucra, por una parte a la vía de señalización de la insulina, y por la otra, un proceso de la translocación de GLUT4 en la membrana (Scherp et al., 2012). También se estableció que el tratamiento de células musculares humanas de individuos obesos con DMT2, modula la expresión de los factores inflamatorios implicados en la resistencia a la insulina, sustentado que los preparados de la planta modifican la vía de señalización de la insulina. Por último, cabe mencionar que los derivados de los ácidos cafeoilquínico inhiben a la enzima aldosa reductasa (ALR), a las α -glucosidasas (Islam et al., 2013), y la formación de los productos finales de glucosilación (AGEs, por sus siglas en

inglés, Hyun et al., 2012; Cheng-Bi et al., 2009). Por lo tanto, su presencia contribuye a los efectos observados en los diferentes tratamientos.

Para la especie *A. herba alba*, Al-Waili (1986) realizó un primer estudio en 15 pacientes con diabetes mellitus, los resultados obtenidos después de la administración del extracto acuoso permitieron evidenciar una disminución en los niveles de glucosa en 14 de los pacientes tratados. Este mismo efecto se observó en modelos animales utilizando conejos y ratas diabéticas, además en estos animales la administración del extracto acuoso provocó una reducción en los niveles de lípidos, además de que previno el incremento de la HbA1c (Twajj y Al-Badr, 1988; Taştekin et al., 2006). Posteriormente, la administración del preparado hidroalcohólico a ratones C57BL/6J obesos durante 18 semanas, disminuyó de manera significativa los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total e insulina (Hamza et al 2010). En un estudio más reciente, realizado por Farhad y colaboradores (2013), se concluyó que este preparado mejora algunas complicaciones de la diabetes relacionadas con la fertilidad en ratas de la cepa Wistar. Cabe destacar que a pesar de que *A. herba alba* es una de las especies más estudiadas del género *Artemisia*, a la fecha no cuenta con estudios farmacológicos que evidencien la actividad de los compuestos presentes en los preparados evaluados en el tratamiento de la diabetes, así como un posible mecanismo de acción.

Por otro lado, *A. capillaris* es tal vez la especie del género *Artemisia* con un mayor número de trabajos enfocados a evaluar el efecto antidiabético de sus metabolitos secundarios. Así, diversos estudios *in vitro* indican que el extracto de metanol de la planta, y sus constituyentes capilarisina (171), 7-metilcapilarisina (172), escopoletina (173), 4-hidroxi-cumarina (175), umbeliferona (176), esculetina (177), cirsimaritina (178), quercetina (179) y quercitrina (180), tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima ALR (Yamaguchi et al, 1989; Okada et al 1995). Otros compuestos como: el ácido 4,5-dicafeoilquínico (181), 176, 177, esculina (182) y 173, además del extracto de metanol inhiben la formación de los AGEs (Hyun et al., 2012). Islam y colaboradores (2013) demostraron que el extracto de metanol y los productos 181, 179, la hiperósida (183), la isoramnetina (184), 177, 173, el ácido 3,4-dicafeoilquínico (185), el ácido 1,5-dicafeoilquínico (186), el éster metílico del ácido 3,5 dicafeoilquínico (165) y la 6-metoxi artemicapia C (187), obtenidos a partir de esta especie, inhiben la actividad enzimática de

las α -glucosidasas y de la PTP-1B (Islam et al., 2013). En otro estudio en células de insulinoma de rata RINm5F (RIN), el extracto acuoso de *A. capillaris*, presentó un potente efecto inhibitorio en la actividad tóxica de las citocinas en las células β del páncreas (Eun-Kyung et al., 2007). Así mismo, diversos metabolitos secundarios aislados de *A. capillaris*, presentan un efecto en la modulación de los procesos metabólicos de la glucosa. Con respecto a los estudios *in vivo*, la administración oral del extracto orgánico en ratones tratados con aloxana produjo la disminución de los niveles de glucosa sanguínea y de lípidos y un incremento en los niveles de HDL (Pan et al., 1998).

Los extractos alcohólicos de *A. princeps* administrados a ratones C57BL/KsJ-*db/db* inducen un efecto antihiperlipidémico importante (Jung et al., 2009; Yamamoto et al., 2001) y disminuyen los niveles de HbA1c, insulina y glucagón. También estos preparados incrementan la actividad de la enzima glucocinasa y disminuyen la de la enzima G6F (Jung et al., 2007). El tratamiento de los ratones con la eupatilina (**63**), un flavonoide aislado de esta y otras especies del género, redujo los niveles de glucosa, HbA1c y la actividad de las enzimas G6F y PECK; además se cuantificó un incremento en las concentraciones de glucógeno hepático, insulina, adiponectina y en la actividad de la glucocinasa en el hígado (Young-Jin et al., 2008). En humanos prediabéticos, el preparado de etanol de *A. princeps* disminuyó los niveles de glucosa, HbA1c y de ácidos grasos libres (Ji-Young et al., 2011; Yun-Young et al., 2012). Los productos **63**, la jaceosidina (**64**), **185**, el ácido 1,3,5-tricafeoilquínico (**188**) y el ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (**189**), son algunos de los principios activos más importantes identificados y aislados en esta planta.

4. Síndrome metabólico

La primera definición formal de síndrome metabólico fue propuesta por la Organización Mundial de la Salud en 1998. Sin embargo, varias instituciones del sector salud y asociaciones médicas varias, alrededor del mundo, han publicado diferentes definiciones del síndrome metabólico (SM). Las definiciones en conflicto han causado incertidumbre entre los médicos sobre la forma de diagnosticar a los pacientes con síndrome metabólico. En 2009, la IDF, la Asociación Americana de Cardiología, la Federación Mundial de Cardiología, la Sociedad Internacional de Aterosclerosis, y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad, entre otros, publicaron una

declaración conjunta con una definición armonizada del síndrome metabólico. De acuerdo con esta declaración, un paciente se diagnostica con SM si desarrolla tres de los siguientes padecimientos: obesidad central, dislipidemia, hiperglucemia, hipertensión e hiperinsulinemia o intolerancia a la glucosa. Por lo tanto el SM es un conjunto de signos que aumentan el riesgo de padecer DMT2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Hiriart et al., 2013). En la **Tabla 3** se resumen los criterios que se han seguido a largo del tiempo para el diagnóstico del SM.

En la definición armonizada de SM los valores de perímetro de cintura (PC) anormales que se sugirieron para cada población se muestran en la **Tabla 4**.

Muchos son los factores que incrementan el riesgo de sufrir SM. Entre ellos destacan: el estilo de vida, la dieta, la falta de actividad física, la obesidad, la predisposición genética, la inflamación crónica, ácidos grasos libres (AGL) elevados, disfunción mitocondrial, alteraciones en la señalización de la insulina y la presencia de citoquinas y adipocinas, (Kaur, 2014; Samson y Garber, 2014).

Tabla 3. Comparación de las diferentes definiciones para el síndrome metabólico.

| Institución | OMS | GEERI | NCEP/ATPIII | AAEC | AAC/ INCPS/AAD/ NCEP/ATPIII | IDF | Definición Armonizada ^a |
|------------------------------|--|--|---|--|---|--|--|
| Año | 1999 | 1999 | 2001 | 2003 | 2004 | 2005 | 2009 |
| Número de factores de riesgo | AGA, IG, DMT2, o RI y 2 de los siguientes... | RI y 3 o más de los siguientes... | Tres o más de los siguientes... | IG/AGA con cualquiera de los siguientes... | Tres o más de los siguientes... | Obesidad y dos de los siguientes... | Tres o más de los siguientes... |
| Obesidad | Cintura/radio de cadera >0.9 H, >0.85 M o IMC >30 kg/m ² | PC ≥ 94 cm H ≥ 80 cm M | PC ≥ 102 cm H ≥ 88 cm M | IMC ≥ 25 kg/m ² | PC ≥ 102 cm H ≥ 88 cm M | PC ≥ 94 cm H ≥ 90 cm H asiático ≥ 80 cm M | PC Geográfica y etnia específica ^b |
| Dislipidemia | HDL <0.91 mmol/L H (35 mg/dL) <1.0 mmol/L M (<39 mg/dL) TG ≥1.7 mmol/L (150 mg/dL) | HDL <1.0 mmol/L (39 mg/dL) TG ≥ 2.0 mmol/L (177 mg/dL) o con tratamiento | HDL <1.0 mmol/L H (40 mg/dL) <1.3 mmol/L M (50 mg/dL) TG ≥1.69 mmol/L (150 mg/dL) | HDL <1.0 mmol/L H (40 mg/dL) <1.3 mmol/L M (50 mg/dL) TG ≥ 1.69 mmol/L (150 mg/dL) | HDL <1.0 mmol/L H (40 mg/dL) <1.3 mmol/L M (50 mg/dL) TG ≥ 1.69 mmol/L (150 mg/dL) o con tratamiento | HDL <1.0 mmol/L H (40 mg/dL) <1.3 mmol/L M (50 mg/dL) TG ≥ 1.7 mmol/L (150 mg/dL) o con tratamiento | HDL <1.0 mmol/L H (40 mg/dL) <1.3 mmol/L M (50 mg/dL) TG ≥ 1.7 mmol/L (150 mg/dL) o con tratamiento |
| Hiperglucemia | DMT2 GA >6.1 mmol/L (110 mg/dL) 2 h POTG >7.7 mmol/L (140 mg/dL) | No DMT2 GA > 6.1 mmol/L (110 mg/dL) | DMT2 GA ≥ 110 mg/dL (6.1 mmol/L) | No DMT2 GA ≥ 110 mg/dL (6.1 mmol/L) 2 h POTG >7.7 mmol/L (140 mg/dL) | GA ≥ 5.6 mmol/L (100 mg/dL) | GA ≥ 5.6 mmol/L (100 mg/dL) | GA ≥ 5.6 mmol/L (100 mg/dL) o con tratamiento |
| Hipertensión | PAS ≥ 140 PAD ≥ 90 | PAS ≥ 140 PAD ≥ 90 o con tratamiento | PAS ≥ 130 PAD ≥ 85 | PAS ≥ 130 PAD ≥ 85 | PAS ≥ 130 PAD ≥ 85 o con tratamiento | PAS ≥ 130 PAD ≥ 85 o con tratamiento | PAS ≥ 130 PAD ≥ 85 o con tratamiento |
| Componentes adicionales | Microalbuminuria 20 ≥ µg/min Albumina/creatinina ≥ 30 mg/g | -- | -- | RI (Familiar con DMT2, edad, etnicidad, sedentarismo, estilo de vida, SOP) | -- | -- | -- |

Abreviaturas: AAC, Asociación Americana de Cardiología; IMC, índice de masa corporal; PAD, la presión arterial diastólica en mmHg; M, mujer; GA, glucosa en ayunas; HDL, lipoproteínas de alta densidad; AGA, alteración de la glucosa en ayunas; IG, intolerancia a la glucosa; H, hombre; INCPS, Instituto Nacional de Cardiología, Neumología y Hematología; POTG, prueba oral de tolerancia a la glucosa; SOP, síndrome de ovario poliquístico; PAS: presión arterial sistólica en mmHg; TG, triglicéridos; PC, perímetro de cintura.

^a Declaración conjunta de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), AAC / INCPS, la Federación Mundial de Cardiología, la Sociedad Internacional de Aterosclerosis, y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad.

^b Ver Tabla 4 para los valores de poblacionales específicas sugeridas

Tabla 4. Límites de circunferencia de cintura para determinar obesidad abdominal de acuerdo a la definición armonizada (2009) y organizaciones nacionales (Modificado de Samson y Garber, 2014).

| Población | Circunferencia de la cintura (cm) | |
|--|-----------------------------------|---------|
| | Hombres | Mujeres |
| Estados Unidos (NCEP/ATPIII) | ≥ 102 | ≥ 88 |
| Canadá | ≥ 102 | ≥ 88 |
| Europa | ≥ 94 | ≥ 80 |
| Sociedad Cardiovascular Europea | ≥ 102 | ≥ 88 |
| Sur de Asia | ≥ 90 | ≥ 80 |
| China | ≥ 90 | ≥ 80 |
| China, Grupo de Trabajo Cooperativo | ≥ 85 | ≥ 80 |
| Japón | ≥ 85 | ≥ 90 |
| Etnias del Sur y Centro América | ≥ 90 | ≥ 80 |
| Oriente del Mediterráneo y Oriente Medio | ≥ 94 | ≥ 80 |
| África | ≥ 94 | ≥ 80 |

5. Generalidades sobre la Diabetes Mellitus

5.1. Definición y clasificación

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos que tienen como común denominador un estado de hiperglucemia crónica, resultado de la falla en la secreción o acción de la insulina, o ambas (Muoio y Newgard, 2008; DeFronzo et al, 2015).

Los síntomas clásicos de un individuo enfermo de diabetes, i.e. polifagia, poliuria, polidipsia y glucosuria, son una consecuencia de la marcada deficiencia en el transporte de glucosa plasmática al interior celular. Así, el organismo reacciona como si se encontrara en estado de alimentación insuficiente lo que provoca la estimulación de la glucogenólisis, lipólisis y gluconeogénesis. Como estos procesos se realizan de manera incompleta se producen cuerpos cetónicos; además, se activa la cascada de señalización de consumo de alimentos (polifagia). Durante las comidas la glucosa no se absorbe correctamente, por ello las concentraciones de glucosa sanguínea incrementan significativamente; en el riñón la concentración de glucosa es anormalmente mayor en el filtrado glomerular, de tal manera que los transportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT2 y 1 por sus siglas en

inglés) se encuentran saturados, en consecuencia hay secreción de glucosa por medio de la orina (glucosuria); las cantidades anormales de glucosa en la orina generan un cambio osmótico que provoca diuresis, y en consecuencia un incremento en la producción de orina (poliuria). Todos estos cambios en el organismo incrementan la osmolaridad del plasma por lo que el consumo de agua es mayor (polidipsia) (DeFronzo et al., 2015).

La hiperglucemia crónica, a largo plazo, induce una serie de complicaciones clínicas como son el daño a pequeños vasos sanguíneos de la retina (retinopatía) que a su vez genera una marcada pérdida de la visión. Estas alteraciones micro vasculares también provocan insuficiencia renal crónica (nefropatía), daño en la fibras nerviosas periféricas (neuropatía), que principalmente se observan en los pies, donde comúnmente se producen ulceraciones de gravedad variable, y que pueden conllevar a la amputación de las extremidades inferiores (DeFronzo et al., 2015).

Existen diferentes tipos de DM; entre las más comunes se encuentran la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la gestacional (DG). La DMT1 inicia en edades tempranas o antes de los 30 años de edad; la enfermedad se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas (células que sintetizan y secretan insulina), y en consecuencia la producción de insulina en el organismo es nula. Así las personas que presentan este tipo de diabetes tienen que administrarse diariamente una cierta cantidad de insulina para poder sobrevivir (DeFronzo et al., 2015).

En el caso de la DMT2 si hay células β pancreáticas que producen insulina, pero el patrón de secreción de la hormona se encuentra afectado; además, hay un retraso en la respuesta ante una elevación de la cantidad de glucosa sanguínea. Las causas de este trastorno aún no se conocen en su totalidad, aunque múltiples factores juegan un papel causal en la disfunción progresiva de las células β incluyendo, la predisposición genética, la resistencia a la insulina, el aumento de la demanda de secreción de insulina, la glucotoxicidad, la lipotoxicidad, el deterioro en la liberación y acción de las incretinas, la acumulación de amilina, y la disminución de la masa de las células β .

La DMT2 representa el 95% de los casos de diabetes y la mayor tasa de incidencia se presenta en personas con antecedentes familiares. En años recientes se han descubierto varios genes que se relacionan con este padecimiento, pero este componente genético es complejo y aún no se define bien. Factores epigenéticos como una mala alimentación y el

sedentarismo contribuyen también al desarrollo de la enfermedad (Bergman, 2013; DeFronzo et al., 2015).

La DG se presenta en las mujeres embarazadas, aproximadamente a las 28 semanas de la gestación. Aún no se sabe claramente que es lo que la provoca, pero probablemente las hormonas que participan en el desarrollo del feto durante el embarazo son las causantes de que la insulina no ejerza su efecto en el cuerpo de la madre (Johnson et al., 2016).

Existen otros tipos específicos de diabetes relacionados con enfermedades varias, malfuncionamiento de las células β , deficiencias en la acción de la insulina, y el consumo de medicamentos, por mencionar algunos (Kleinberger et al., 2015; Leslie et al., 2016;).

5.2. Prediabetes y diagnóstico de DMT2

Existen una serie de pruebas que facilitan el diagnóstico de la enfermedad o la condición prediabética; en primera instancia se realiza una prueba de glucosa en ayunas (PGA) y luego una prueba de tolerancia a la glucosa (POTG). La Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés, 2015) recomienda la PGA porque es más económica, rápida y fácil de realizar.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, si una persona se somete a una PGA, y los niveles del azúcar resultan mayor a 110 mg/dL pero menor a 126 mg/dL, se considera prediabética. La ADA, por otro lado, considera un rango más amplio entre 100 y 125 mg/dL. En el caso de la POTG, ambas organizaciones consideraran que los niveles de glucosa de un prediabético oscilan entre 140 y 199 mg/dL después de la administración de la carga de glucosa (75 g).

La ADA también recomienda realizarse una medición aleatoria o casual de los niveles de glucosa en plasma (NGP) y se diagnostica un estado diabético cuando los niveles de glucosa en la sangre ≥ 200 mg/dL. Otro parámetro de gran relevancia para el diagnóstico de la DMT2 son los niveles de hemoglobina glucosilada A_{1c} (HbA_{1c}) en el torrente sanguíneo. Tanto la ADA como la OMS señalan que un valor de los niveles de HbA_{1c} mayor a 6.5 % es indicativo de diabetes; en tanto que los pacientes con un valor de HbA_{1c} entre 5.7 y 6.4 % presentan un alto riesgo de padecer la enfermedad (Bergman., 2013; Juárez et al., 2014; Ang et al., 2015).

Sí un paciente en estado de prediabetes toma medidas para el control de sus niveles

de glucosa sanguínea, como realizar ejercicio y cambiar sus hábitos alimenticios, es posible retrasar, e incluso prevenir, la aparición de DMT2. Es importante mencionar que el proceso de desarrollo de DMT2 ocurre en varios años (Bergman., 2013).

5.3. Impacto de la DMT2 en el mundo y en México



Figura 3. Estimación a nivel global del número de enfermos con diabetes por región y su estimación para el año 2040 (IDF, 2015).

A nivel mundial la diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI; representa un problema importante de salud pública y su debida atención resulta sumamente costosa para las autoridades de salud; así en 2014 el gasto en diabetes alcanzó los 612 000 millones de dólares. De acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en ingles), se estima que a nivel global alrededor de 415 millones de personas padecen la enfermedad, pero cerca de la mitad lo ignora; el 77 % de estos pacientes vive en países de ingresos medianos a bajos, lo que complica un adecuado monitoreo de la evolución de la enfermedad. China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son los países con mayor número de diabéticos. Un dato igual de alarmante es que para el año 2040

se espera que el número de enfermos alcance los 642 millones (**Figura 3**, IDF, 2015). En varios países, incluido México, esta enfermedad constituye la primera causa de muerte; de tal forma que en el año 2014 fallecieron en el mundo cerca de 4.9 millones de personas como consecuencia de diabetes, es decir que cada 7 segundos hubo un deceso.

En los Estados Unidos de Norteamérica se estima que cerca de 25.7 millones de personas padecen diabetes (IDF, 2015). En ese país diariamente se diagnostican 4,100 casos nuevos de DMT2, se amputan 230 extremidades inferiores, ingresan a hemodiálisis permanente 120 casos, y por si fuera poco, se presentan cerca de 55 casos de ceguera.

En la última década en México la DMT2 ha sido la primera causa de muerte. Así en 2014, la enfermedad provocó 68, 659 muertes, este número representa un incremento del 80.8 % en relación a la década anterior 1999-2009. Actualmente, se estima que en nuestro país aproximadamente 9 millones de mexicanos tienen diabetes, con una prevalencia de 11.9 %. Por otro lado, en nuestro territorio la esperanza de vida es de 75 años, sin embargo se estima que en individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (IDF, 2015; Hernández-Ávila et al., 2013).



Figura 4. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo según entidad federativa en México (tomado de Gutiérrez et al., 2012).

En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012), tanto en hombres como en mujeres se observó un incremento importante en la proporción de adultos que refirieron

haber sido diagnosticados con diabetes en el grupo de 50 a 59 años de edad; este incremento fue similar en mujeres (19.4%) y hombres (19.1%). Por sexo, en el caso de los hombres las entidades con mayor proporción de individuos con diagnóstico de diabetes son el Distrito Federal (12.7%), Estado de México (11.5%), y Veracruz (10.7%); en el caso de las mujeres la mayor proporción se encontró en Nuevo León (15.5%), Tamaulipas (12.8%), y el Distrito Federal (11.9%). En la **Figura 4**, se muestra la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo según entidad federativa (Gutiérrez et al., 2012).

Se estima que en nuestro país el 90% de los casos de DMT2 son atribuibles al sobrepeso y obesidad. De acuerdo a la Secretaria de Salud, hoy en día México, ocupa el primer lugar de prevalencia mundial de obesidad, superando a los Estados Unidos de Norteamérica (Gutiérrez et al., 2012).

5.4. Tratamientos farmacológicos para la DMT2

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la DMT2 tienen como objetivo primordial regular los niveles de glucosa en sangre (NGS), para así disminuir las complicaciones micro y macrovasculares de la enfermedad. Estos fármacos se administran de forma oral y presentan diferentes mecanismos de acción, criterio que generalmente se utiliza para clasificarlos (Cheng y Fantus, 2005; Altagracia-Martínez et al., 2007).

El grupo de fármacos más utilizado a nivel mundial son las biguanidas específicamente la metformina, que se ha utilizado con éxito desde la década de los 50s como primera línea de tratamiento farmacológico para la DMT2 (Holman, 2007). La metformina es un derivado de la galegina, un metabolito secundario aislado de la especie vegetal *Galega officinalis* que se utiliza para tratar la diabetes en las prácticas médicas alternativas de varios países (Rios et al., 2015). Las biguanidas, reducen o inhiben la liberación de glucosa en el hígado, al inhibir la gluconeogénesis hepática; también reducen la absorción intestinal de la glucosa, incrementan la sensibilidad a la insulina y favorecen la absorción periférica de la glucosa (**Figura 5**). Este tipo de fármacos no provocan hipoglucemia y por lo tanto son efectivos para el control de los NGS. Cuando la metformina se administra en monoterapia se ha observado que puede bajar 1.5 % las concentraciones de HbA_{1c}, y también reduce el riesgo de padecer algún problema

cardiovascular. La diarrea, las náuseas, el vómito, las flatulencias, astenia, la indigestión, la incomodidad abdominal y dolor de cabeza son eventos secundarios al consumo de estos fármacos. Aunque el mecanismo de acción de la metformina sobre la regulación de la glucosa no es completamente entendido, sus acciones se han asociado con la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés); esta enzima ayuda al balance energético de la célula ya que fosforila enzimas que participan en el consumo y la generación de ATP; igualmente disminuye o incrementa la expresión de ciertos genes involucrados en procesos como la lipogénesis. Investigaciones recientes sugieren que la metformina reduce la glucogenólisis debido a un decremento en la producción del AMP cíclico, segundo mensajero que participa en la activación de diversas enzimas, y un antagonismo con el glucagon (Lalau et al., 2014).

Un segundo grupo de fármacos importantes son las sulfonilureas, mismas que estimulan a las células β del páncreas para producir y liberar más insulina al sistema circulatorio. Este proceso se lleva a cabo por la unión de los fármacos al receptor para sulfonilurea 1 (SUR1) que genera el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}). El cierre de los canales K^+_{ATP} produce una despolarización de la membrana celular que conduce a la entrada de iones de calcio, lo cual favorece la liberación de insulina (**Figura 5**). No obstante, una consecuencia de la enfermedad es la pérdida y desgaste gradual de las células β pancreáticas, lo cual ocasiona una limitada actividad de este tipo de fármacos. Además, después de una terapia de diez años, las sulfonilureas reducen significativamente su eficacia. Entre los medicamentos de primera generación se encuentran la tolbutamida, acetohexamida, tolazamida y clorpropamida; entre los de segunda generación destacan la glibenclamida, glibepirida, glipicida, gliquidona y la gliclacida; y de la tercera generación cabe mencionar a la glimepirida, estos medicamentos pueden provocar hipoglucemia, eventos cardiovasculares, agranulocitosis, trombocitopenia, anemia hemolítica y aplásica, erupción cutánea, prurito, dolor de cabeza, náuseas, diarrea, vómito y porfiria hepática, como principales efectos adversos. A pesar de sus efectos adversos las sulfonilureas son ampliamente prescritas en pacientes en etapas tempranas de la DMT2 (Brietzke, 2015).

Otros estimulantes de la liberación de insulina son las meglitinidas derivadas del ácido benzoico, como la repaglinida y la nateglinida. Al igual que las sulfonilureas, estos

medicamentos son agonistas del receptor SUR1, pero su tiempo de acción es muy corto. El uso de estos fármacos es recomendado a personas que son sensibles a las sulfonilureas pero susceptibles a una hipoglucemia en ayunas, o para aquellas intolerantes a las sulfonilureas (Brietzke, 2015).

Los inhibidores de las α -glucosidasas, inhiben o retrasan la acción de las enzimas (sacarasa, maltasa, etc.) encargadas de la degradación de los polisacáridos a monosacáridos en el tracto gastrointestinal, evitando así la absorción de la glucosa por los transportadores SGLT, y por lo tanto la digestión de los mismos en el tubo digestivo, evitando la formación de un pico posprandial (**Figura 5**). Entre los fármacos más importantes de este grupo se encuentran la acarbosa, el miglitol y la voglibosa, todos de origen natural. La acarbosa se absorbe poco en el intestino (menos del 1 %). Sus efectos secundarios más comunes son flatulencia, dolor abdominal, diarrea y erupción cutánea; debido a su mecanismo de acción no hay posibilidad de generar hipoglucemia. También se ha observado que la administración de estos inhibidores en conjunto con la metformina puede reducir los niveles de HbA_{1c} de 7 a 0.7 % (Brietzke, 2015).

Otro grupo de fármacos son las tiazolidinedionas (TZDs) como la rosiglitazona y la pioglitazona; su principal mecanismo de acción es la activación del receptor proliferador-activador γ del peroxisoma (PPAR γ , **Figura 5**). En el tejido adiposo, la activación de PPAR γ bloquea la liberación de ácidos grasos libres (AGL), reduce la transcripción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y aumenta las concentraciones de adiponectina; esta última favorece la acción de la insulina. También inhibe de la expresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B) implicado en la inducción de resistencia a la insulina. Las TZDs promueven la expansión del tejido adiposo subcutáneo, y la contracción del tejido adiposo visceral. La recaptura de los AGL por el tejido adiposo subcutáneo, reduce la disposición de estos en el músculo e hígado, lo que favorece la acción de la insulina en estos órganos. Se ha observado la monoterapia con TZDs reduce los niveles de HbA_{1c} en un 1.6 % aproximadamente, también previene la aparición de las complicaciones microvasculares y ateroscleróticas de la DM2. Los efectos secundarios registrados para estos productos incluyen infecciones en el tracto respiratorio, dolor de cabeza, sinusitis, mialgia y trastornos dentales, también incrementan el riesgo de padecer osteoporosis (Bösenberg y Vanzyl, 2008; Brietzke, 2015).

Entre los nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la DMT2 se encuentra la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) encargada de la rápida degradación de las principales incretinas en los seres humanos, el péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1 por sus siglas en inglés) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP por sus siglas en inglés, Kieffer et al., 1995; Deacon et al., 1995). Estos péptidos son secretados por las células intestinales L (íleon y colon) y K (duodeno y yeyuno), respectivamente. Actualmente se han desarrollado numerosos inhibidores de la DPP-IV aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) que pertenecen al grupo de las gliptinas; sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina, gemigliptina y linagliptina (Juillerat-Jeanneret, 2014, **Figura 5**). La actividad fisiológica de las incretinas se refleja en la estimulación de la liberación de insulina dependiente de glucosa en las células β . El GLP-1 también suprime la producción de glucagón dependiente de glucosa de las células α pancreáticas (Gautier et al., 2005). Estudios *in vitro* han permitido comprobar que el GLP-1 estimula la transcripción del gen de la insulina, así como su biosíntesis. En animales aumenta la replicación de las células β del páncreas, fomenta la expansión de la masa de células β y por último inhibe la muerte programada de células β (Farilla et al., 2002), el GIP aumenta la replicación y favorece la supervivencia de las células β (Trümper et al., 2001). Por lo descrito anteriormente, se han buscado análogos de incretinas resistentes a la degradación de la DPP-IV, uno de éstos es la exenatida derivado de un producto aislado de la saliva del monstruo de gila. La exenatida actúa como agonista de los receptores de GLP-1, por lo tanto, incrementa la secreción de insulina e inhibe la liberación de glucógeno dependiente de glucosa. Liraglutida, dulaglutida y albiglutida son agonistas del receptor de incretina de reciente aprobación (Bösenberg y Vanzyl, 2008; Prasad-Reddy e Isaacs, 2015). Aunque, no se conoce con certeza el mecanismo de acción de las incretinas, es claro que éstas incrementan la liberación de la insulina en la célula β de páncreas vía una activación de su receptor acoplado a una proteína Gs que provoca una activación de las vías de señalización mediadas por MAPKs (ERK 1 y 2), la PI3K o la PKB (AKT). El GIP tiene también un efecto antiapoptótico de las células β asociado a una reducción de la activación de caspasa 3 y es dependiente de la ruta MAPK p38 (Campbell y Drucker, 2013).

La reabsorción de la glucosa hacia el torrente sanguíneo se lleva a cabo en las nefronas del riñón, mediada principalmente por el co-transportador de glucosa dependiente

de sodio 2 (SGLT-2, por sus siglas en inglés) expresado mayormente en el túbulo proximal. Estos co-transportadores pueden reabsorber hasta 144 g de glucosa, correspondiente al 90 % de glucosa filtrada en el riñón, en 24 horas. Florizina, Canagliflozina y dapagliflozina son los primeros inhibidores de los SGLT-2 disponibles en Estados Unidos (Brietzke, 2015; **Figura 5**). El uso de estos inhibidores reduce el porcentaje de HbA_{1c}. Por otro lado, el incremento en la eliminación de la glucosa favorece la reducción de la presión arterial, pero también incrementan el riesgo de una falla renal, hipotensión, deshidratación incluso hipoglucemia (Scheen, 2015).

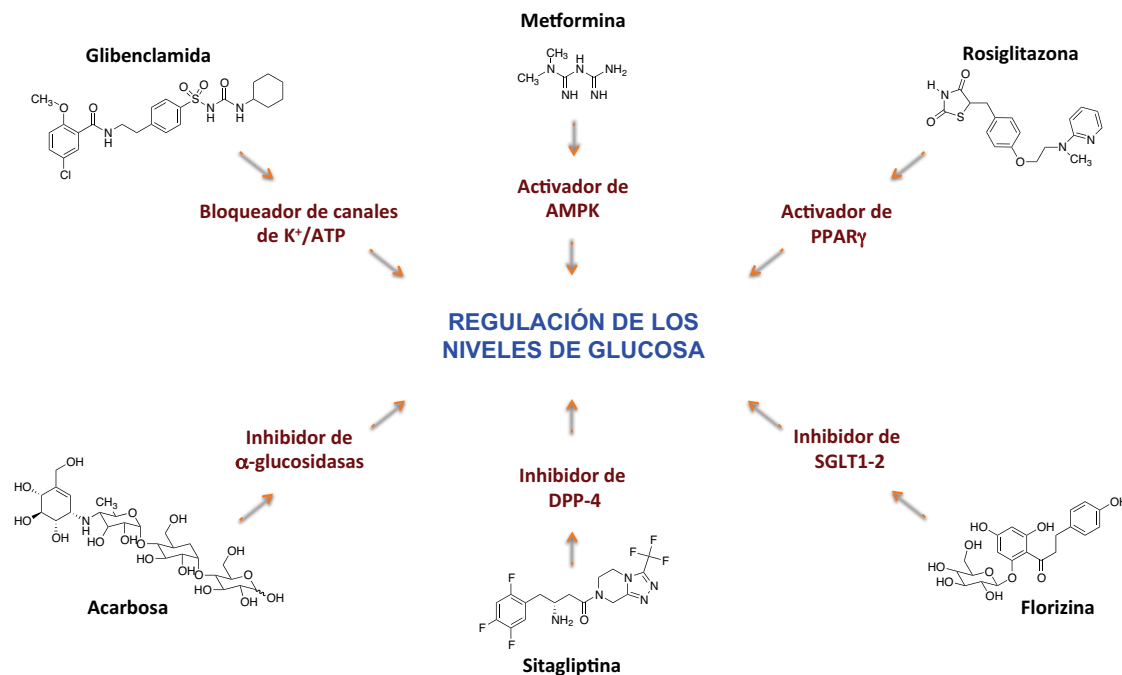


Figura 5. Principales fármacos para el tratamiento de la DMT2.

La amilina es un péptido que es sintetizado y secretado junto con la insulina por las células β (por lo tanto su liberación es dependiente de glucosa) y genera diversos efectos fisiológicos muy similares a los de GLP-1. Aunque no es una incretina, este péptido suprime la secreción de glucagón, retrasa el vaciamiento gástrico y a nivel central induce saciedad. La pramlintida es un análogo sintético de la amilina que se usa también para el tratamiento de la DMT2; se administra por vía subcutánea antes de cada comida. Este fármaco provoca pérdida de peso, reduce HbA_{1c} en un 0.3 a 0.6 % y de manera significativa

reduce el pico posprandial. Las náuseas son su principal efecto adverso (Nicholson y Hall, 2011).

En un principio los secuestradores de los ácidos biliares eran prescritos para reducir los niveles de colesterol y LDL en pacientes con hipercolesterolemia, pero en 2008 la FDA aprobó su uso en pacientes con DMT2. Los secuestradores de ácidos biliares como el colesevelam, se unen los ácidos biliares en el intestino formando un complejo no absorbible; en consecuencia, la pérdida de ácidos biliares en las heces fecales y la síntesis de nuevos ácidos biliares en el hígado a partir del colesterol incrementan. Hoy en día, no se sabe con certeza cual el mecanismo mediante el cual este grupo de fármacos regula los NGS, sin embargo se ha propuesto que éstos ácidos biliares que se sintetizan *de novo* son más afines a los receptores FXR y TGR5 (receptores para ácidos biliares) favoreciendo la utilización del colesterol, el metabolismo de la glucosa hepática, la secreción de las incretinas, y la activación de los receptores para ácidos grasos GRP40 en el intestino. Así mismo, reducen la absorción de la glucosa y retrasan en el vaciamiento gástrico. Su principal efecto adverso es que provocan constipación (Hansen et al., 2014).

En 2009 la FDA aprobó para los pacientes con DM el uso de la bromocriptina, un agonista de los receptores D₂ de dopamina. Los efectos en la regulación de los NGS puede deberse a una acción del sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo. Los efectos secundarios incluyen náuseas, fatiga, mareos, hipotensión ortostática, vómitos y dolor de cabeza (Brietzke, 2015).

La administración exógena de insulina por vía subcutánea es la única terapia para los enfermos con DMT1. Sin embargo, también es necesaria para pacientes con DMT2 que no responden a los fármacos orales, normalmente esto puede ocurrir con el paso de los años y el desarrollo de la enfermedad, o en casos extremos cuando el paciente presenta los NGS muy elevados. El tratamiento con insulina representa un riesgo latente de sufrir hipoglucemia. Actualmente, la insulina puede ser administrada mediante inhalaciones o por vía subcutánea; en el primer caso se absorbe por los pulmones, y en el segundo caso se evita la degradación del péptido por enzimas gastrointestinales. (Garg et al, 2006).

Una forma efectiva de tratar y de prevenir el desarrollo de DMT2 es el ejercicio, cuyos beneficios se ven reflejados en un incremento de la sensibilidad a la insulina, con la

consiguiente disminución en los NGS por el alto consumo y demanda de energía. A largo plazo, el ejercicio genera la reducción de tejido adiposo visceral e incrementa la captación de glucosa dentro del músculo esquelético en un periodo postprandial; esto se debe a un incremento en la translocación de transportadores para glucosa GLUT-4 en la membrana de las células. Estos mecanismos son considerados independientes de insulina y son de importancia farmacológica para la innovación en los tratamientos para DMT2 (Ross et al., 2004; ADA, 2015).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al igual que en muchos países del mundo, en México un importante sector de la población utiliza las plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. La mayoría de los enfermos de diabetes recurren en primera instancia a los centros de salud oficiales donde se les diagnostica la enfermedad y se les recomienda el tratamiento apropiado. Pero, los pacientes luego recurren a los médicos tradicionales en busca de terapias alternativas a base de plantas (Aguilar y Xolalpa, 2002; Andrade-Cetto, 2010) y frecuentemente abandonan sus tratamientos alopáticos. Otros combinan ambos tipos de terapia sin conocer sus consecuencias.

Con base en las consideraciones anteriores, en repetidas ocasiones la Organización Mundial de la Salud ha hecho un llamado a sus países miembros con la finalidad de establecer la eficacia, seguridad y calidad de las plantas utilizadas en las prácticas médicas alternativas (OMS, 2013). En particular de aquellas utilizadas para tratar la diabetes, que como se indicó en la sección de antecedentes constituye un grave problema de salud a nivel global. También ha estimulado el estudio de las posibles interacciones entre la medicación alopática y la tradicional. A pesar de estos llamados son pocos los países que han asumido esta responsabilidad. El desinterés de las autoridades de Salud e Instituciones de Investigación de muchos países miembros, incluido México, por el estudio de las plantas medicinales obedece a muchos factores; quizá el más importante es el rechazo de las autoridades de salud hacia las prácticas fitoterápicas basadas en preparados de naturaleza química compleja, esto ante la creencia falsa de que una mezcla de constituyentes no es efectiva para el tratamiento de las enfermedades. Sin embargo, las múltiples investigaciones realizadas en países Europeos como Francia, España, Alemania e Italia, o China han demostrado la eficacia de estas mezclas cuyos componentes actúan de manera sinérgica o polifarmacológicamente (Wagner y Ulrich, 2009; Kaur et al., 2013; Brodie et al., 2015). Por otro lado son numerosos los preparados herbolarios estandarizados que se comercializan alrededor del mundo para tratar diversos padecimientos, incluyendo la diabetes. Así por ejemplo, el TarralinTM se comercializa en Estados Unidos de América del Norte; y el SuconralTM se emplea en Europa.

Se estima que en nuestro país se utilizan más de 383 especies vegetales para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata et al., 2013). Entre esas especies se encuentra *Artemisia ludoviciana*, (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Romero-Cerecero et al., 2009), de utilidad también para padecimientos dolorosos y otras enfermedades. El uso de plantas medicinales está muy arraigado en Mesoamérica; ya que desde épocas prehispánicas se estima que en esta región se utilizaban alrededor de 4051 especies de plantas con fines medicinales. En la actualidad, nuestro país se encuentra en el segundo lugar a nivel mundial en cuanto a riqueza de plantas medicinales, solo superado por China que cuenta con más de 5000 especies (Alonso-Castro et al., 2015), y la mayoría de la población persiste en el empleo de las plantas para el alivio de sus principales problemas de salud. Sin embargo, la mayoría de estas no ha sido objeto de investigación científica que garantice su uso racional. Entonces esta propuesta de tesis, obedece a la necesidad de valorar científicamente la flora medicinal de México, en este caso concreto *Artemisia ludoviciana*, con el propósito de garantizar su uso racional.

IV. HIPÓTESIS

Consideraciones de tipo quimiotaxonómico, etnomédico sugieren que los preparados y algunos de los metabolitos secundarios de *Artemisia ludoviciana* poseen propiedades hipoglucemiantes, y/o antihiperoglucémicas. Por lo tanto, la administración de preparados y/o metabolitos secundarios de esta planta a animales de experimentación (sanos e hiperoglucémicos) debe disminuir significativamente los niveles de glucosa en sangre y modificar algunos parámetros bioquímicos que se encuentran alterados en el síndrome metabólico.

De la misma forma, es probable que la administración de los preparados o metabolitos aislados de *Artemisia ludoviciana* generen una respuesta antinociceptiva en roedores sanos e hiperálgicos después de un estímulo doloroso.

V. OBJETIVOS

1. Objetivos Generales

Determinar los efectos hipoglucemiantes, antihiper glucémicos, y sobre parámetros del síndrome metabólico, de preparados y metabolitos obtenidos de las partes aéreas de *A. ludoviciana*, con la finalidad de comprobar su utilidad potencial en el tratamiento de la diabetes y el síndrome metabólico.

Determinar el efecto antinociceptivo de diferentes preparados y de metabolitos secundarios obtenidos a partir de las partes aéreas de *A. ludoviciana*, con la finalidad de establecer su eficacia preclínica como agente analgésico potencial.

2. Objetivos Particulares

- Determinar el potencial hipoglucemiante y/o antihiper glucémico del aceite esencial (AE) y la infusión (EA) de *A. ludoviciana* en ratones, con la finalidad de completar los estudios de eficacia de preparados tradicionales de la planta mediante la evaluación de su efecto sobre los niveles de glucosa en ratones normales e hiper glucémicos utilizando experimentos farmacológicos de tipo agudo.
- Establecer el efecto hipoglucemiante y/o antihiper glucémico de los metabolitos secundarios aislados de *A. ludoviciana* a través de la aplicación de la misma estrategia farmacológica indicada en el inciso anterior.
- Establecer el efecto de los principios aislados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas *in vitro*, con la finalidad de descubrir nuevos agentes inhibidores de estas enzimas y contribuir con el desarrollo de productos con propiedades antihiper glucémicas.

- Establecer el efecto de EA sobre algunos de los parámetros [bioquímicos (insulina, glucosa, triglicéridos, glucógeno hepático, colesterol total, ácido úrico) o no (peso corporal, grasa abdominal, índice de Lee)] alterados el SM utilizando un modelo farmacológico en rata (Sprague-Dawley).
- Determinar el potencial antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiperálgico de preparados y metabolitos secundarios de las partes aéreas de la especie, usando diferentes modelos animales.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Material vegetal

La partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae) fueron recolectadas en dos localidades; la primera colecta en el poblado de San Nicolás “Tetelco”, Tláhuac, Ciudad de México, en octubre del año 2009, con las coordenadas geográficas 19° 12' 25.16'' N, 98° 58' 40.41'' O, a una altura de 2265 msnm. Una muestra de referencia (No. voucher 119871) fue depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM. La segunda colecta se realizó en el municipio de Ozumba, Estado de México, en noviembre del año 2009. La identidad y la clasificación de la especie se establecieron por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Un ejemplar de referencia (Bye & linares 36224) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

2. Procedimientos Generales de Análisis

2.1 Análisis cromatográficos

La cromatografía por adsorción en columna abierta (cca) se realizó en columnas de vidrio de diferentes dimensiones utilizando gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063–0.200 mm, malla 70–230 μm ASTM) como fase estacionaria y diferentes sistemas de elución.

Los análisis cromatográficos por cromatografía en capa fina de tipo analítico (ccf) y preparativo (ccfp) se realizaron sobre placas de aluminio o de vidrio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5–7.0 μm ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución (Spangenberg et al., 2011). Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110°C durante un minuto.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford,

MA, EUA) equipado con dos sistemas de detección uno en el ultravioleta (UV) y el segundo un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower 3 (Waters). Las condiciones de análisis utilizadas fueron; Columna: XBridge Shield RP18 (5 μm , 4.6 i.d. \times 250 mm); Fase móvil: CH_3CN (A) y ácido fórmico 0.1% en agua (B); Fase móvil: 30-70 (A:B); Tiempo de corrida: 30 min; Flujo: 1 mL/min; Detección: UV (270 y 285 nm) y de dispersión de luz evaporativa (ELSD). Los metabolitos de interés presentes en las muestras analizadas (visibles en el UV, ELSD o en ambos) fueron purificados mediante HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones de análisis; Columna: XBridge Shield RP18 (5 μm , 19 i.d. \times 250 mm); Gradiente: 30-70 (A:B); Tiempo de corrida: 30 min; Flujo: 17.1 mL/min; Detección: UV (270 y 285 nm); Tiempo de colecta por fracción: 15 seg.

2.2 Caracterización de los productos naturales

De manera general la caracterización de los productos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz (^1H)/100 MHz (^{13}C) se registraron en un espectrómetro Varian Innova 500. Los desplazamientos químicos (d) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS), utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó CHCl_3-d como disolvente. Los espectros de masas por la técnica de ionización por electroespray (ESI-EM) en los modos positivo y negativo se generaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) acoplado a un detector de masas marca Waters (SQD2). Las condiciones óptimas de separación fueron obtenidas en una columna de fase reversa Acquity BEH C18 (2.1 i.d. \times 100 mm, 1.7 μm), utilizando como fase móvil un gradiente de CH_3CN (A) y agua (B; 0.1% ácido fórmico): 0 min 15% A; 4 min 35% A; 9 min 100% A; 12 min 15% A; Flujo: 0.3 mL/min, volumen de inyección: 3 μL . Detector de Masas: SQD2 Waters; Condiciones de análisis: (+)-ESI; Voltaje Capilar (kV): 3.7; Voltaje Cono (V): 45; Temperatura de Desolvatación ($^{\circ}\text{C}$): 400; Gas de Desolvatación N_2 (L/hr): 650; Gas Cono (L/hr): 10. (-)-ESI; Voltaje Capilar (kV):

2.9; Voltaje Cono (V): 25; Temperatura de Desolvatación (°C): 400; Gas de Desolvatación N₂ (L/hr): 650; Gas Cono (L/hr): 10. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO J720.

3. Preparación del Extracto Acuoso y Aceite Esencial

El material vegetal (partes aéreas) utilizado en el presente estudio fue secado a temperatura ambiente, protegiéndolo de la exposición directa a la luz solar, y enseguida se fragmentó en un molino de cuchillas Wiley modelo 4.

La preparación del extracto acuoso (EA) se realizó mediante la técnica de infusión, a partir de 40 g de material vegetal seco y molido y 1 L de agua hirviendo; el infuso se dejó reposar durante 30 min. Al cabo del período de extracción, el extracto acuoso se filtró y concentró a sequedad, obteniéndose 4.5 g de un residuo café oscuro. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener 20 g de muestra.

El aceite esencial (AE) se preparó mediante la técnica de hidrodestilación a partir de 300 g del material seco o fresco. Al término de la extracción, la esencia se separó del hidrodestilado mediante un proceso de reparto utilizando CH₂Cl₂ (3 × 500 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a sequedad obteniéndose 569 mg de un aceite amarillo. Este proceso de nueva cuenta se repitió cuantas veces fue necesario, hasta obtener cantidades suficientes del preparado para su posterior estudio farmacológico.

4. Evaluaciones Farmacológicas

Para todos los ensayos farmacológicos se utilizaron ratones machos de la cepa ICR (25-35 g) y/o ratas macho Sprague Dawley (220-260 g), adquiridos en Envigo RMS, S.A. de C.V. Los animales se mantuvieron a temperatura de 21 ± 2 °C, con alimento *ad libitum*, con un 70-80% de humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad (12/12 hrs). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales (NOM-062-ZOO-1999) con la aprobación del Comité de Ética Institucional de la Facultad de Química, UNAM para el uso de animales en pruebas

farmacológicas (FQ/CICUAL/084/14, FQ/CICUAL/085/14, FQ/CICUAL/086/14 y FQ/CICUAL/103/15).

Previo a la realización de todos los ensayos farmacológicos los animales fueron privados de alimento cuatro horas antes con acceso libre al agua. Todas las muestras (EA, AE, compuestos puros y controles) se suspendieron en solución de NaCl (0.9%, p/v) y de Tween 80 (0.1%), las vías de administración utilizada fueron oral (p.o.) o intraperitoneal (i.p.).

4.1 Evaluación del efecto sobre los niveles de glucosa en sangre de los preparados y/o compuestos puros

Para la determinación del efecto sobre los niveles de glucosa en sangre (NSG) de los preparados y los metabolitos secundarios obtenidos de *A. ludoviciana* se utilizaron ratones normoglucémicos e hiperglucémicos, se diseñaron diferentes experimentos de tipo agudo *in vivo* con base en protocolos farmacológicos experimentales descritos en la literatura (Verspohl, 2002; Guerrero-Analco et al., 2005; Ovalle-Magallanes et al., 2014).

4.1.1 Inducción experimental del estado de hiperglucemia en ratones

El estado de hiperglucemia se indujo en los animales mediante la administración de una dosis única de estreptozotocina (STZ, 130 mg/kg, i.p.) después de un tratamiento previo con nicotinamida (NA, 50 mg/kg, i.p.). Los niveles de glucosa en sangre se determinaron 8 días después de la administración de la STZ y aquellos animales que presentaron NGS mayores a 200 mg/dL fueron considerados hiperglucémicos e incluidos en los estudios.

En todos los experimentos, las muestras de glucosa sanguínea fueron recolectadas de la vena caudal a través de una pequeña incisión en el final de la cola. Los NGS se midieron utilizando el método enzimático de la glucosa oxidasa en un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

4.1.2 Evaluación del efecto agudo hipoglucemiante

La evaluación del efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos o hiperglucémicos, se realizó utilizando diferentes grupos de animales de seis individuos cada uno. El primer grupo fue administrado con el vehículo (VEH, NaCl 0.9%), el segundo con el fármaco de referencia glibenclamida (GLI, 10 mg/kg); finalmente, el resto de los grupos recibieron los tratamientos (preparado o compuestos puros) a tres diferentes dosis. A continuación, los NGS se midieron a las 0, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 horas posteriores a la administración de los tratamientos. Una vez que se obtuvieron los valores de NGS (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia, de acuerdo a la siguiente ecuación (Guerrero-Analco et al., 2007):

$$\% \text{ de variación de glucemia} = [(G_r - G_i) / G_i] \times 100.$$

G_i corresponde al valor de glucemia inicial

G_r corresponde al valor de glucemia a los diferentes tiempos de registro

Después de obtener el porcentaje (%) de variación de glucemia se determinó el área bajo la curva (ABC) del curso temporal, mediante el método matemático de la regla de los trapecios.

4.1.3 Evaluación del efecto antihiperoglucemiante

Con la finalidad de determinar el efecto antihiperoglucemiante de los preparados y compuestos aislados, se realizaron las pruebas de tolerancia a los carbohidratos glucosa (POTG) y sacarosa (POTS) en animales normoglucémicos y diabéticos, de acuerdo con los protocolos experimentales previamente establecidos (Williamson et al., 1996). Como controles positivos se utilizaron glibenclamida (POTG) y acarbosa (POTS).

Para su administración, todos los tratamientos fueron suspendidos en solución salina con Tween 80 (0.1%) y fueron administrados por vía oral utilizando una sonda orogástrica. Para la administración de los tratamientos los animales se dividieron en cinco grupos: al primero se le administró el VEH, al segundo dependiendo de la prueba de tolerancia

realizada se le administró MET (200 mg/kg) y/o ACA (5 mg/kg). Los demás grupos fueron tratados con tres dosis diferentes del preparado y/o compuesto a evaluar. Treinta minutos posterior a la administración de los tratamientos, todos los animales recibieron por vía oral una solución de glucosa (1.5 g/kg) y/o sacarosa (3 g/kg) según la prueba, enseguida se tomaron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), los porcentajes de variación de glucemia se calcularon de acuerdo a la ecuación indicada en el inciso **3.1.2** de esta sección, para establecer si los animales presentaron una disminución del pico posprandial, relacionado con la administración de los tratamientos.

4.1.4 Prueba de tolerancia a la insulina (PTI)

Con la finalidad de establecer un posible modo de acción los productos puros aislados, en ratones normoglucémicos se realizó una prueba de tolerancia a la insulina (PTI), de acuerdo con los protocolos experimentales ampliamente descritos en la literatura (Ayala et al., 2010). Como control positivo se utilizó a la MET (200 mg/kg).

Brevemente, para este ensayo los animales de experimentación previo ayuno de cuatro horas, se dividieron en cuatro grupos (I-IV) de seis ratones cada uno, los grupos I y II recibieron el VEH (p.o.), un tercer grupo recibió MET (200 mg/kg, p.o.) y el último grupo fue tratado con los compuestos puros (17.7 mg/kg, p.o.). Treinta minutos posteriores a los diferentes tratamientos, los grupos del II al IV fueron administrados con una carga de insulina (1 U/kg, i.p.). Enseguida, se determinaron los NGS a los 15, 30, 45 y 120 min posteriores a la administración de la insulina.

4.2 Evaluación del efecto del extracto acuoso sobre el síndrome metabólico (SM)

4.2.1 Inducción del SM

Previo a un periodo de adaptación de siete días, ratas Sprague Dawley fueron divididas aleatoriamente en tres grupos ($n=6$) y alojadas por pares en jaulas de acrílico. Todas las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar para roedores (2018S bolitas:

44.2% de carbohidratos, 18% proteínas, 6.2% de grasa, 3.1 kcal/g; Teklad Global Dietas, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, EE.UU.). El grupo I (VEH) solo bebió agua, los grupos II y III recibieron agua enriquecida con fructosa al 10% (p/v). El tratamiento con alta fructosa se administró durante todo el experimento. Durante el experimento, todos los animales fueron evaluados midiendo los siguientes parámetros: peso corporal y talla de la nariz al ano, e índice de Lee. El período de inducción del síndrome metabólico fue de 12 semanas (Ferreira de Moura et al., 2009). La cantidad de fructuosa ingerida se calculó mediante la diferencia en los volúmenes de las botellas administradas en período de 48 horas.

4.2.2. Prueba de tolerancia a la glucosa del EA en ratas con SM

Al término del experimento indicado en el inciso anterior (4.2.1.) los animales con SM fueron evaluados para establecer el efecto antihiper glucemiante utilizando la prueba de tolerancia a la glucosa (inciso 4.1.34. de esta sección experimental). Para el experimento los animales fueron divididos en tres grupos ($n=6$). El grupo I nuevamente recibió únicamente VEH y los grupos II y III pretratados con la fructosa, recibieron el VEH y EA (316 mg/kg, p.o. 0.2 mL/100g), respectivamente. Los niveles basales de glucosa se registraron antes de la administración intragástrica de los tratamientos; 30 minutos posteriores a los tratamientos todos los animales recibieron una carga de glucosa (2 g/kg, p.o.). Las muestras sanguíneas se recolectaron a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la carga del carbohidrato.

4.2.3. Efecto del tratamiento subcrónico del EA en ratas con SM

Posterior a la evaluación de la prueba de tolerancia a la glucosa, los animales de experimentación fueron sujetos a un período de recuperación de seis días, durante el cual seguían recibiendo su tratamiento con alta fructosa. En la semana 14 (día 98) del tratamiento los animales del grupo III fueron administrados durante siete días con una dosis de 316 mg/kg de EA. Por otra parte, el grupo I fue tratado con VEH, agua y dieta normal, en tanto que el grupo II con VEH y fructosa hasta cumplir 104 días de tratamiento.

4.2.4. Recolección de muestras sanguíneas e hígados

En el día 105 del experimento, todos los animales se mantuvieron en ayuno durante cuatro horas con acceso libre al agua, y fueron anestesiados con una dosis única intramuscular de ketamina/xilazina (80/10 mg/kg) con la finalidad de realizar una punción retro-orbital para obtener la muestra de sangre requerida, enseguida se realizó la separación del suero y el paquete celular por centrifugación (3000 rpm, 5 min). Posteriormente, se realizó una disección en los animales para extraer los hígados; todas las muestras biológicas se almacenaron a -80°C hasta la determinación de los parámetros bioquímicos correspondientes.

4.2.5. Determinación de algunos parámetros bioquímicos

Los niveles de insulina, colesterol, triglicéridos, ácido úrico y glucosa en plasma se determinaron mediante reacciones enzimáticas colorimétricas utilizando diferentes kits comerciales (RANDOX laboratorios, Antrim; Reino Unido; ALPCO Diagnostics, Salem, Nueva Hampshire, EE.UU) siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.2.6 Determinación de la concentración de glucógeno hepático

La determinación de la concentración de glucógeno hepático se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Murat y Serfaty, 1974. Brevemente, 50 mg de las muestras de hígado fueron homogeneizadas con un mililitro de una solución amortiguadora de citratos (0.1 M, pH 4.2). El homogenado resultante se diluyó con una solución amortiguadora de citratos para obtener una concentración final de 5 mg/mL. A continuación 10 mL de esta dilución fueron tratados con 10 mL de una solución de la enzima amiloglucosidasa (1 mg/mL). La mezcla anterior se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 h, la glucosa libre se determinó utilizando el método de Trinder GOD-POD (Spinreact, España).

4.3. Determinación del efecto antinociceptivo

El potencial antinociceptivo se evaluó utilizando las pruebas de la formalina y de la placa caliente, de acuerdo con los protocolos experimentales ya establecidos (Zimmerman, 1983; Hunskaar y Hole, 1987). Como controles positivos se utilizaron gabapentina (formalina) y morfina (placa caliente).

4.3.1 Prueba de la formalina

El ensayo de la formalina se realizó de acuerdo con el diseño experimental descrito por Hunskaar y Hole (1987) utilizando ratones sanos o hiperglucémicos divididos en diferentes grupos ($n = 6$). Los animales diabéticos fueron tratados con 30 μ L de una solución de formalina al 1%, vía intraplantar (i.pl.), en ratones sanos esta solución fue administrada a una concentración del 2%. Después de la administración de la solución de formalina, los animales fueron colocados en un cilindro de acrílico para registrar su actividad durante 30 min; como una respuesta nociceptiva se determinó el tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento y hasta el roedor lamia o mordía la pata inyectada. Previo a la administración de la formalina un primer grupo recibió el VEH (p.o.), el segundo grupo gabapentina (GBP, 31.6 mg/kg), utilizada como fármaco de referencia, y los siguientes grupos recibieron de manera independiente diferentes dosis del EA (31.6, 100 y 316 mg/kg) o de los compuestos puros (17.7 mg/kg). Este modelo se caracteriza por la generación de dos periodos de respuesta al estímulo químico, el primer periodo (fase temprana) se registró entre los 0-5 minutos y el segundo periodo (fase tardía) se registró entre los 10 y 30 min después de la administración de la formalina.

4.3.2. Prueba de la placa caliente

Este experimento se realizó sobre una placa caliente convencional a la temperatura de 55.5 ± 0.2 °C previo entrenamiento de los animales al entorno del experimento en ratones sanos o hiperglucémicos. Para ello, un día previo y momentos antes de iniciar el experimento, el conjunto animal-cilindro se colocó sobre la placa de calentamiento (apagada) durante 20 minutos. Enseguida, se realizó la administración de cada uno de los

tratamientos en un intervalo de dosis entre 31.6 y 316 mg/kg; 30 minutos posteriores a la administración se aplicó el estímulo térmico y se cuantificó como respuesta al estímulo térmico, el periodo de latencia en que el roedor se lamia o levantaba alguna de las patas traseras o saltaba fuera del cilindro. Para este ensayo se utilizó morfina (5 mg/kg) como control positivo (Zimmerman, 1983).

4.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio

4.4.1. Prueba de la carragenina

Esta prueba se realizó como lo describe Winter et al. (1962). En primer lugar, los animales sanos fueron divididos aleatoriamente en grupos de seis animales. Enseguida, se realizó la administración intraplantar (i.pl.) en la pata trasera derecha de 30 μ L de una solución de carragenina al 1% (p/v) 30 min posteriores a la administración de los tratamientos [VEH; diclofenaco (DIC, 31.6 mg/kg); EA (31.6, 100 y 316 mg/kg); compuestos puros (17.7 mg/kg)]. Los volúmenes de la pata tratada se midieron utilizando un pletismómetro (modelo 7150, Ugo Basile, Italia) a diferentes tiempos [0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 hrs] después de la administración de la carragenina.

4.5. Evaluación del efecto de los preparados sobre el sistema nervioso central

4.5.1. Modelo del rotarod

La prueba del rotarod se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Dunham y Myia (1957), para la evaluación de la actividad de los diferentes preparados sobre la coordinación motora. Brevemente, los animales de experimentación fueron entrenados durante 3 días en un rotarod (modelo 7600; Ugo Basile) a una velocidad constante de 16 revoluciones por minuto (rpm), para permanecer en el aparato sin caer durante al menos 3 min en diferentes intentos, el día de la prueba (24 h después del último entrenamiento), 30 min previos al experimento los ratones se dividieron en grupos ($n = 6$) y se pretrataron con VEH o EA o AE (316 mg/kg, p.o.) o diazepam (DZP, 4 mg/kg, i.p.). Posteriormente, los animales fueron colocados en el rotarod a los 30, 45 y 60 min posteriores a la

administración del tratamiento, el tiempo que los ratones permanecían en el rotarod se registró a un máximo de 180 s.

4.5.2. Modelo de campo abierto

La prueba de modelo de campo abierto se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de los preparados sobre la actividad locomotora en los ratones. Brevemente, los animales fueron colocados individualmente en el centro de una caja de acrílico (20 × 40 × 15 cm), dividida en ocho cuadrantes iguales. La actividad locomotora se determinó contando el número de cuadros cruzados con las cuatro patas durante un período de 2 min. Los animales fueron tratados con VEH o EA o AE (316 mg/kg) o DZP (4 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la prueba.

4.6. Evaluación del efecto de los preparados y/o compuestos puros aislados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas

La evaluación de la actividad sobre las enzimas α -glucosidasas se determinó mediante la metodología descrita por Oki et al., (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, 1 U/mL de la enzima α -glucosidasa de levadura (α -GHY, *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) se incubó durante 30 min a 30°C en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 100 mM, pH 7). Los preparados (2.5 mg/mL) y los compuestos aislados (10 mM), así como la ACA (30 mM), se disolvieron en MeOH o en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). A partir de esta solución, se tomaron alícuotas de 0 a 10 μ L por triplicado, posteriormente se incubaron durante 10 minutos con 20 μ L de una solución de la enzima en cajas de Elisa de 96 pozos. Posterior al periodo de incubación, se adicionaron a cada pozo 10 μ L de sustrato [α -D-glucopiranosido de para-nitrofenol (*p*NPG), 5 mM] y la placa se incubó durante 20 min a 37°C. La actividad de la enzima se estableció midiendo la absorbancia 405 nm con la finalidad de estimar el contenido de *p*-nitrofenol, en un equipo iMark (BioRad®, Rivera-Chávez et al., 2013). Para el control del equipo, así como para la adquisición, el manejo y la manipulación de datos se utilizó el programa MicroPlate Manager 6®.

La actividad inhibitoria de la muestra se calculó como el porcentaje de inhibición en comparación con un blanco de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \alpha\text{-GHY de inhibición} = 1 - (A_{405t_n} - A_{405t_0}) \times 100$$

Donde % α -GHY es el porcentaje de inhibición, A_{405t_n} es la absorbancia corregida de la muestra y A_{405t_0} es la absorbancia del blanco.

La concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50% (CI_{50}) se calculó mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = A_{100} / (1 + (I / CI_{50})^s)$$

Donde A_{100} es la inhibición máxima de la enzima, I es la concentración de inhibidor, CI_{50} es la concentración requerida para inhibir la actividad de la enzima en un 50%, y s es el grado de cooperación (Copeland, 2000).

4.6.1. Estudios de cinética enzimática

Para establecer el tipo de inhibición de los productos evaluados sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas se siguió el mismo protocolo descrito en el inciso anterior (4.6.), realizando curvas de saturación por sustrato (0-2 mM) a diferentes concentraciones del inhibidor. El modo de inhibición de la enzima α -glucosidasa se determinó utilizando la metodología del doble recíproco de Lineweaver-Burk así como un modelo de regresión no lineal para determinar las constantes de inhibición. El tipo de inhibición se describe mediante la siguiente ecuación:

$$v = (V_{\max} S) / (km (1 + ([I] / Ki) + S (1 + ([I] / (\alpha ki))))$$

Donde v es la velocidad inicial en ausencia y en presencia del inhibidor; S y I , son la concentración de sustrato e inhibidor, respectivamente; V_{\max} es la velocidad máxima; km es la constante de Michaelis-Menten; ki es la constante de inhibición competitiva, y αki es la

constante de inhibición no competitiva. Los datos cinéticos fueron analizados utilizando el software GrapPad Prism 5.0.

5. Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo validando la diferencia entre los promedios normalizados del porcentaje de variación en los NGS \pm EE, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por una prueba *post hoc* de Dunnett o una *t* de Student (pareada y no pareada, según el caso) considerando como diferencias significativas los valores de $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ y $***p \leq 0.001$.

6. Estudios de Acoplamiento Molecular

La estructura cristalográfica de la enzima α -glucosidasa de levadura (α -GL, *Saccharomyces cerevisiae*) se obtuvo del Protein Data Bank (código PDB: 3A4A). Los estudios se realizaron con la supercomputadora Miztli, que cuenta con 6,432 núcleos de procesamiento (664 procesadores Intel E5-2670v1 y 112 procesadores Intel E52660v3), 16 tarjetas NVIDIA Tesla M2090, 30 000 GB de RAM y 225 TB de almacenamiento en disco duro (<http://www.super.unam.mx/>). Para realizar los cálculos de acoplamiento molecular se utilizó la interface gráfica Autodock (AutoDockTools 1.5.4, ADT), en la cual se agregaron los átomos de hidrógeno y se adicionaron las cargas totales mediante el método de Kolleman, posteriormente se guardaron los archivos en un formato adecuado para su posterior uso en Autogrid 4.0 y AutoDock 4.0.

El compuesto **166** y sus estereoisómeros (**166 a-d**) se construyeron en el programa Spartan'02 (www.wavefunction.com). Posteriormente, la optimización geométrica se realizó mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con un campo de fuerza B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian 09, revisión A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, E.U.A). Después, los ligandos fueron preparados con la asignación de las cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y la adición de hidrógenos polares mediante el programa AutoDock 4.2 con la interface ADT 1.5.4.

Por otro lado, la predicción de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó con el programa AutoDock 4.2 mediante el empleo de un algoritmo Genético

Lamarkiano (LGA, Rudnitskaya et al., 2010; Cifci et al., 2012). Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía, inicialmente se realizó un acoplamiento molecular ciego en una región de búsqueda (*grid*) de 126 x 126 x 126 Å³ centrada en la proteína. Posteriormente, la conformación de menor energía (menor $\Delta G_{\text{unión}}$) resultante se utilizó como la inicial para llevar a cabo una nueva simulación en una región de búsqueda de 40 x 40 x 40 Å³ centrada en el ligando. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA, un tamaño de población de 150 individuos, 2.5×10^6 evaluaciones energéticas y 100-250 corridas. Los resultados fueron analizados utilizando la interface ADT 1.5.4 (análisis por clúster), PyMol (De Lano y Scientific, 2002) o LIG-PLOT + (www.ebi.ac.uk).

7. Estudio Fitoquímico

7.1. Aislamiento de la eupatilina (63), la jaceosidina (64), la arglanina (8), la salvina (166) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico (165)

El EA obtenido por la técnica de infusión a partir de las partes aéreas de la especie, se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de reparto entre *n*-hexano y AcOEt. Este proceso generó dos fracciones primarias una de hexano (2 g) y otra de AcOEt (16.0 g). Enseguida, la fracción de AcOEt (16.0 g) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una cromatografía sobre gel de sílice (320 g) con un gradiente de elución entre *n*-hexano y AcOEt, en orden creciente de polaridad (10:0 → 0:10), este proceso generó un conjunto de 10 fracciones secundarias (EA₁ - EA₁₀). De la fracción secundaria EA₅ [*n*-hexano-acetato de etilo (8:2)], cristalizaron de manera espontánea 35 mg de un sólido blanco identificado como la eupatilina (63; pf 231-232°C). De la fracción EA₆ [*n*-hexano-AcOEt (7:3)], precipitaron 25 mg de un polvo amarillo caracterizado como la jaceosidina (64; pf 223-224 °C). A partir de la fracción EA₇ [*n*-hexano-AcOEt (65: 35)], cristalizaron de manera espontánea 30 mg de un producto blanco identificado como la arglanina (8, pf 207-208 °C). La resolución cromatográfica de las aguas madres de la fracción EA₇ mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice y un gradiente de elución entre *n*-hexano y CH₂Cl₂ (10:0 → 0:10) en orden creciente de polaridad permitió la obtención de un conjunto de 12 fracciones [EA_{7-I}- EA_{7-XII}]. De la fracción EA_{7-X} se obtuvieron 23 mg de un sólido vítreo identificado como la salvina

(166). A partir de la fracción EA₁₀ (1 g), mediante una cromatografía en capa fina a nivel preparativo utilizando un sistema de elución AcOEt-CH₂Cl₂-HCOOH-CH₃COOH-H₂O (100:25:10:10:11), se realizó el aislamiento de 300 mg del ácido 3,5 dicafeoilquínico (165). Todos los productos aislados se analizaron mediante RMN y se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura (Mata et al., 1984; Ruiz-Cancino et al., 1993; Cheng-Bi et al., 2009; Cscapi et al., 2010).

7.2. Aislamiento de la aquilina (31) y la deshidroleucodina (164)

El fraccionamiento secundario de la fracción de *n*-hexano (2 g) (inciso 4.9.1. de esta parte experimental) mediante una cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) usando una columna XBridge Prep Shield RP18 (5 μm, 19 × 250 mm) y un sistema isocrático agua (1% ácido fórmico) y CH₃CN (70:30) con un flujo de 17.1 mL/min; permitió el aislamiento de dos compuestos mayoritarios, identificados como la aquilina (31; *R_t* 13.5 min, 90 mg) y la deshidroleucodina (164; *R_t* 11.6 min, 100 mg). Ambos productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura (Ordóñez et al., 1988; Martínez y Muñoz-Zamora, 2011).

8. Establecimiento del perfil cromatográfico

Los análisis por cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (CLUE-EM) de la fracción de acetato de etilo obtenida a partir de la infusión (Fr-AcOEt) se realizaron empleando un cromatógrafo Waters ACQUITY UPLC®, equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA), una bomba cuaternaria, un inyector automático, y acoplado a un detector de masas SQD2 (Waters). En una columna BEH Shield RP18 de (2.1 mm i.d. × 100 mm; 1.7 μm de tamaño de partícula). Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.2 μm antes de ser inyectadas al cromatógrafo para su análisis. Como sistema de elución se empleó un gradiente lineal de acetonitrilo-agua (0.1% ácido fórmico; FA) (0 min, 15% B; 4 min, 35% B; 6 min, 85% B; 9 min, 100% B). La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 3 μL. Las condiciones del detector de masas fueron las siguientes:

modo de ionización positivo ESI⁺: voltaje del capilar 3.7 kV; voltaje del cono 30 V; temperatura de desolvatación 400°C; gas de desolvatación N₂ 650 L/hr y un flujo de gas de 200 L/hr. Todos los datos obtenidos fueron procesados con el programa MassLynx version 4.1.

8.1. Validación del método analítico

La validación del método analítico desarrollado se realizó con base en los lineamientos establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la validación de métodos analíticos [ICH Q2 (R1), 2005].

8.1 Linealidad del sistema

Este parámetro se determinó mediante la preparación de cinco curvas de calibración de cada uno de los compuestos (**31** y **164**), con cinco niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 5 mg de **31** y/o **64** se disolvieron en 5 mL de una mezcla de dioxano-MeOH (1:1) (1.0 mg/mL). A partir de estas soluciones se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de las mismas contengan entre 5 y 200 µg/mL de cada compuesto. El área bajo la curva (ABC) correspondiente a los picos de los analitos de interés, se graficó con respecto a la concentración de referencia en cada solución. Para el cálculo de los parámetros estadísticos se realizó un análisis de regresión lineal. Los criterios de aceptación son los siguientes: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ e IC (β_1) no incluye al cero.

8.2 Linealidad y exactitud del método

La determinación de la linealidad y exactitud del método se realizó mediante la adición a la matriz de trabajo (200 µg/mL) de diferentes concentraciones de una solución de referencia de **31** y **164** (1.0 mg/mL), comprendidas en el intervalo entre 10 y 160 µg/mL para el compuesto **31**, y entre 5 y 200 µg/mL para **164**. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se

interpolaron en la curva de calibración desarrollada en el inciso **8.1** de esta sección experimental. La exactitud del método se calculó mediante el % de recobro, por otro lado, la linealidad del método se evaluó mediante un análisis de regresión lineal a partir del gráfico entre concentración adicionada vs concentración recuperada analizando los parámetros estadísticos: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$. La exactitud se confirma si se cumplen los siguientes requisitos: el porcentaje de recuperación debe encontrarse en un rango entre el 98.0–102.0% y el coeficiente de variación entre las réplicas no debe de ser mayor al 2.0%.

8.3 Precisión del método

La precisión del sistema o repetibilidad se estableció mediante el análisis de siete réplicas de una solución de referencia de los compuestos **31** (50 $\mu\text{g/mL}$) y **164** (50 $\mu\text{g/mL}$), preparadas por diluciones independientes a partir de una solución stock. Por otra parte, la precisión del método o precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una muestra que contenía a la matriz de trabajo a una concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ enriquecida con 50 $\mu\text{g/mL}$ de **31** y/o **164**. El análisis se efectuó en dos días diferentes. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales permitieron calcular la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

8.4 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de diluciones preparadas a partir de una solución de referencia de los productos **31** y **164** con una concentración de 1.0 mg/mL y cinco muestras blanco. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) del pico de interés se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada solución. Para el cálculo b_0 , b_1 , r y r^2 , se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

8.5. Cuantificación de los compuestos **31** y **164** presentes en la fracción de AcOEt

Para la cuantificación de los productos **31** y **164** en Fr-AcOEt, se prepararon tres muestras en pesadas independientes a una concentración de 1 mg/mL. Los compuestos se cuantificaron registrando el perfil cromatográfico y determinando el ABC del pico correspondiente al analito de interés utilizando las condiciones de análisis indicadas en el inciso **8** de esta sección experimental. La cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración previamente diseñada.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artemisia ludoviciana es una planta que ha estado presente durante mucho tiempo en la cultura mexicana y ha sido utilizada para el tratamiento varios padecimientos que afectan a la población, en particular algunos de tipo doloroso y trastornos estomacales (Argueta et al., 1994). En la prácticas médicas populares del México moderno, la especie también se utiliza para el control de la diabetes (Alarcón-Aguilar et al., 1998; Aguilar y Xolalpa, 2002; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Romero-Cerecero et al., 2009). De tal forma, que el presente trabajo de investigación se desarrolló con el principal objetivo de demostrar la eficacia de diferentes preparaciones y metabolitos secundarios obtenidos a partir de la especie como agentes capaces de regular los niveles de glucosa en sangre y algunos parámetros alterados en el SM, utilizando en ambos casos roedores. También se analizó el efecto potencial de la especie como agente antiinflamatorio, antinociceptivo y antihiperalgésico con el propósito de comprobar su eficacia preclínica en el tratamiento de afecciones dolorosas, relacionadas o no con las complicaciones de la diabetes, empleando modelos animales bien establecidos.

El impacto de la diabetes a nivel global, los continuos llamados de la OMS (2013) para que sus países miembros valoren los recursos empleados en las prácticas médicas alternativas y la necesidad de contar con herramientas de seguridad y calidad que garanticen el uso racional de las plantas medicinales justifica la realización de este tipo de estudios. A continuación se discutirá los resultados obtenidos de la presente investigación, mismos que se resumieron en cuatro trabajos de investigación, dos de los cuales se encuentran ya publicados (ver sección de publicaciones).

1. Determinación de los efectos hipoglucemiante y antihiper glucémico de preparados y metabolitos de *Artemisia ludoviciana*

1.1. Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso (EA) y del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana*

El AE de *A. ludoviciana* (500 mg, rendimiento del 0.16 % en relación al peso de planta seca) se obtuvo mediante una hidrodestilación, y EA se obtuvo mediante un proceso

de infusión (rendimiento del 11% en relación al peso de planta seca), tal como se señaló en la sección experimental. El efecto hipoglucemiante de ambos preparados se determinó en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (NA/STZ, 50, 130 mg/kg, respectivamente). La administración de NA/STZ para generar un estado hiperglucémico ha sido ampliamente utilizada (Nakamura et al., 2006; Islam y Loots, 2009; Szkudelski, 2012; Islam y Wilson, 2012). La STZ induce la muerte de las células β del páncreas mediante un proceso de necrosis, lo cual sucede cuando ingresa a la célula por medio del transportador GLUT2, e inmediatamente genera un daño en el ADN que conduce al aumento de la actividad de sus enzimas reparadoras; en consecuencia las concentraciones de NAD^+ y ATP intracelular se reducen en gran medida, entonces, por falta de energía, las células secretoras de insulina mueren. La administración previa de NA genera una protección parcial, debido a que reduce la actividad de las enzimas reparadoras del ADN, evitando el agotamiento de NAD^+ y ATP. Por otra parte, la NA sirve como un precursor de NAD^+ , y por lo tanto de ATP (Szkudelski, 2012). Este modelo, ha sido ampliamente utilizado para determinar el efecto hipoglucemiante de fármacos, y productos naturales, incluyendo compuestos puros y preparados. Además el procedimiento fue debidamente validado como parte del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio, ya que la validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del proceso y de la calidad de los resultados.

La **Figura 6**, muestra que la administración oral de diferentes dosis de AE (31.6, 100 y 316 mg/kg) a ratones normales e hiperglucémicos no reduce significativamente las concentraciones de glucosa, por lo tanto el aceite no presenta un efecto hipoglucemiante a las dosis evaluadas. En el caso de la infusión se observa que únicamente la dosis de 316 mg/kg provocó la reducción de los niveles de glucosa en sangre en ratones hiperglucémicos, sugiriendo que dentro de la infusión existe al menos un metabolito capaz de generar dicho efecto hipoglucemiante.

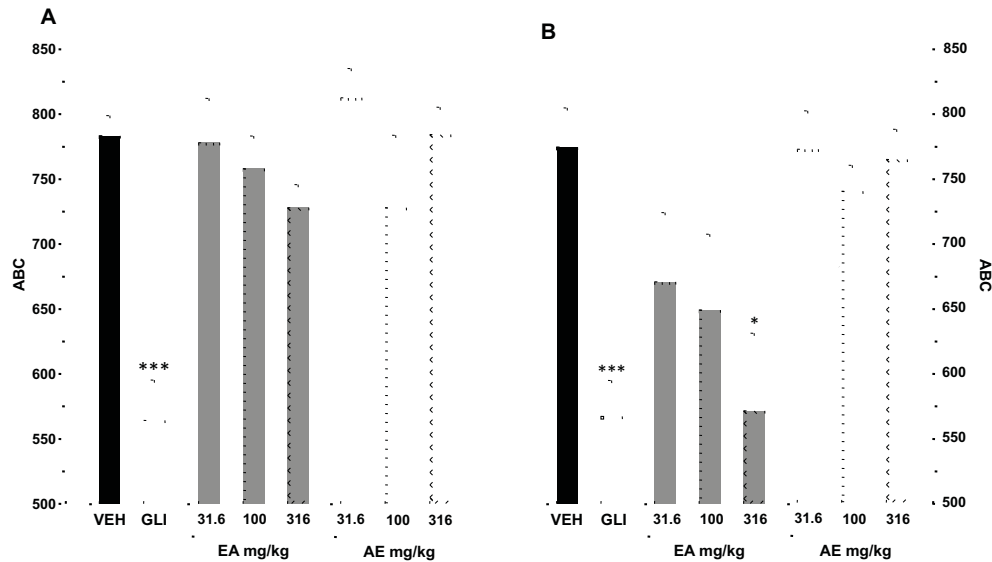


Figura 6. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial (AE) y del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana*. **A)** Ratones normoglucémicos, **B)** ratones hiperglucémicos. GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada valor es la media del área bajo la curva (ABC) \pm el error estándar, $n = 6$, ** $p = 0.01$. *** $p = 0.001$ en comparación con el vehículo (VEH).

1.2. Efecto antihiper glucémico del extracto acuoso (EA) y del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana*

Para determinar el efecto antihiper glucémico de los preparados (EA y AE) de *A. ludoviciana* se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (POTG) en animales sanos y en animales hiperglucémicos. La administración de la carga de glucosa a los animales de experimentación simula una condición hiperglucémica posprandial. Es importante mencionar que esta prueba es utilizada para diagnosticar un mal funcionamiento en la absorción y metabolismo de la glucosa por parte del organismo en un periodo de tiempo corto en este caso de dos horas. El aumento en los valores de glucemia (pico posprandial) se reduce mediante la administración de agentes hipoglucemiantes y antihiper glucemiantes orales, como la glibenclamida (GLI), la **Figura 7**, muestra los resultados para ambos preparados. En ratones normoglucémicos, el AE únicamente a la dosis de 100 mg/kg redujo significativamente la formación del pico posprandial 30 minutos después de haber administrado la carga de glucosa. Este mismo efecto se observó con las tres dosis evaluadas en ratones hiperglucémicos. Para el EA, las dosis de 100 y 316 mg/kg provocaron el mismo efecto en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos. Estos últimos resultados contrastan

con los obtenidos por Alarcón-Aguilar y colaboradores (1998), quienes no detectaron un efecto antihiper glucémico de la decocción de la planta en conejos sanos tras una carga de glucosa.

Entonces, el AE no es un agente hipoglucemiante pero inhibe la formación del pico posprandial después de una carga de glucosa. Este estudio representa el primer reporte del potencial sobre los niveles de glucosa en sangre de un aceite del género *Artemisia*. La infusión, sin embargo, es hipoglucemiante y antihiper glucemiante. Estas mismas propiedades se han descrito para preparados similares de otras especies del género como *A. rupestris* (Qunfang et al., 2011), *A. annua* (Shuying et al., 2011), *A. herba-alba* (Al-Waili, 1986), *A. dracunculus*, *A. princeps* (Ribnicky et al., 2006), *A. capillaris* (Islam et al., 2013) y *A. judaica* (Whittle y Skett, 2002) entre otras. De varias de estas especies se han desarrollado preparados comerciales que han resultado efectivas para el tratamiento y prevención de la diabetes. Así por ejemplo, en Estados Unidos de Norteamérica se elaboró un preparado llamado Tarralin™, que incorpora un extracto de etanol de *A. dracunculus* (Ribnicky et al., 2006); y en Japón a partir del extracto acuoso de *A. capillaris* se elaboran tabletas y galletas de arroz (Islam et al., 2013).

Es posible que los compuestos de AE y EA pueden interferir con los transportadores de glucosa GLUT5 y SGLT1 a nivel intestinal; o incrementar la captura y/o utilización de la glucosa a nivel muscular, hepático y de tejido adiposo. Una revisión bibliográfica de los principales metabolitos del aceite esencial (**Tabla 2**) indicó que a la fecha, no se han descrito propiedades hipoglucemiantes o antihiper glucémicas de alguno de ellos.

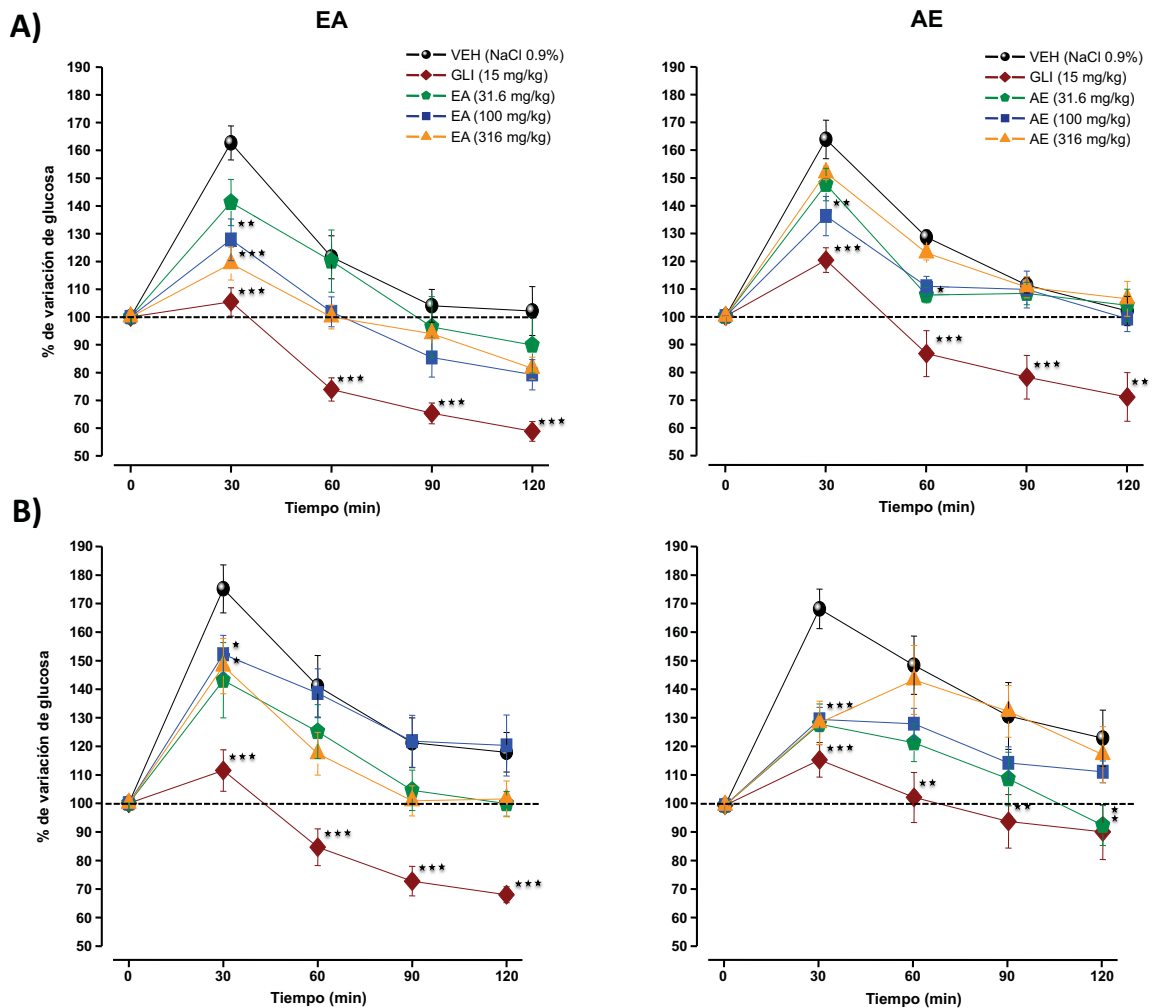


Figura 7. Efecto antihiperglucémico del aceite esencial (AE) y del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en la prueba de tolerancia a la glucosa. A) Ratones normoglucémicos, B) ratones hiperglucémicos. GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el vehículo (VEH).

1.3. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de *A. ludoviciana*

Diferentes estudios químicos han permitido el aislamiento e identificación de numerosos compuestos puros de *A. ludoviciana*, entre los que destacan lactonas sesquiterpénicas y flavonoides. Estos últimos, son bien conocidos por regular las concentraciones de glucosa en sangre (Babu et al., 2013). Por lo tanto, con el objetivo de identificar los principios activos de la planta se inició con el análisis químico de la infusión, mediante el uso de técnicas convencionales como la cromatografía en columna abierta, en

capa fina, de líquidos de alta eficiencia, y la resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, HMBC y HSQC). La aplicación de estas técnicas permitió el aislamiento e identificación de dos flavonoides eupatilina (**63**) y jaseocidina (**64**); tres lactonas sesquiterpénicas, la arglanina (**8**), la aquilina (**31**) y la dehidroleucodina (**164**); el ácido 3,5-dicafeoilquinico (**165**) y un sesquiterpenoide llamado salvinina (**166**, **Figura 8**). Los compuestos **164**, **165** y **166** resultaron novedosos para la especie. La salvinina se reporta por segunda ocasión en la naturaleza ya que previamente se identificó en la especie *Salvia divaricata* (Ulubelen, 1992).

Los espectros de RMN los compuestos **8**, **31**, **164** y **166** se muestran en las **Figuras A1-A4** del anexo.

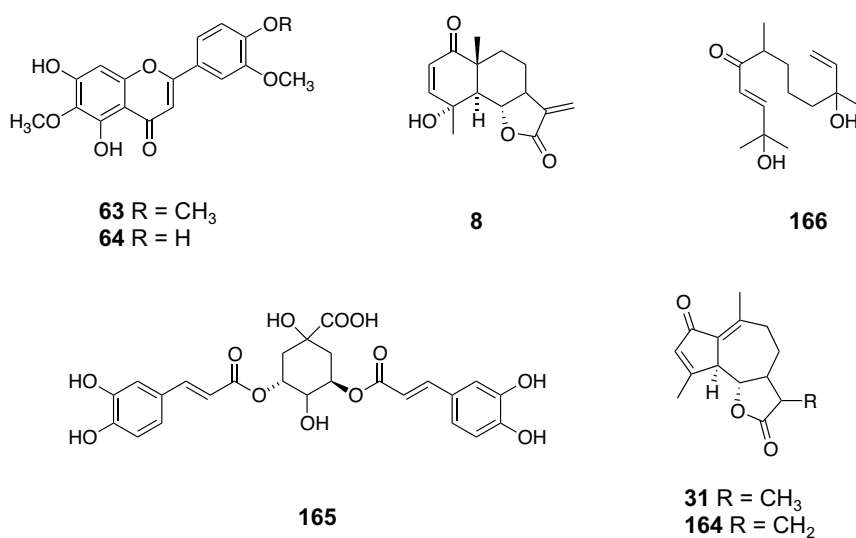


Figura 8. Metabolitos secundarios aislados e identificados de *Artemisia ludoviciana*: eupatilina (**63**), jaseocidina (**64**), arglanina (**8**), salvinina (**166**), ácido 3,5-dicafeoilquinico (**165**), aquilina (**31**) y dehidroleucodina (**164**).

1.4. Efecto hipoglucemiante de la eupatilina (**63**), la arglanina (**8**) y la aquilina (**31**)

De los compuestos aislados la jaseocidina (**64**), eupatilina (**63**) y el ácido 3,5-dicafeoilquinico (**165**) cuentan con estudios previos relacionados con su potencial en reducir los niveles de glucosa sanguínea. Así en el caso de la jaseocidina (**64**), Eunkyoo et al. (2014) demostraron que su administración a ratones con DMT1 durante ocho semanas, regulaba los niveles de glucosa en sangre. Estas acciones se atribuyeron a un incremento en la actividad enzimática antioxidante. Kang et al., 2008 observó que la jaseocidina (**64**)

indujo una reducción en los niveles de glucosa y HbA_{1c} sanguínea en ratones db/db, e incrementó las concentraciones de glucógeno hepático e insulina. A nivel inmunohistoquímico el metabolito **64** aumentó la actividad enzimática de la glucocinasa hepática, mientras que redujo la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Por otro lado, Kang y colaboradores (2013) determinaron que la eupatilina (**63**) provocó un importante efecto hipoglucemiante en ratones db/db con DMT2, incrementó la concentración de glucógeno hepático, insulina y adiponectina, y redujo las concentraciones de hemoglobina glucosilada y los niveles sanguíneos de glucagón. A nivel enzimático la eupatilina (**63**) redujo la actividad hepática de las enzimas; glucosa-6-fosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasas que son fundamentales para la gluconeogénesis hepática. Por otro lado, el flavonoide incrementó la actividad de la glucocinasa requerida para la fosforilación de glucosa dentro de las células.

Una vez obtenido los compuestos **63**, **8** y **31** en suficiente cantidad se procedió a determinar su efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos. El compuesto **63** y la GLI se emplearon como controles. En la **Figura 9** se muestra que la administración de la GLI o del metabolito **63** (17.7 y 31.6 mg/kg) en ratones sanos e hiperglucémicos provoca una reducción significativa en los niveles de glucosa en sangre en comparación con el grupo del vehículo. Este mismo efecto se observó con la administración del compuesto **31** en ambos grupos de roedores. Para el caso del compuesto **8**, se apreció un efecto hipoglucemiante dosis dependiente únicamente en ratones hiperglucémicos (**Figura 9**).

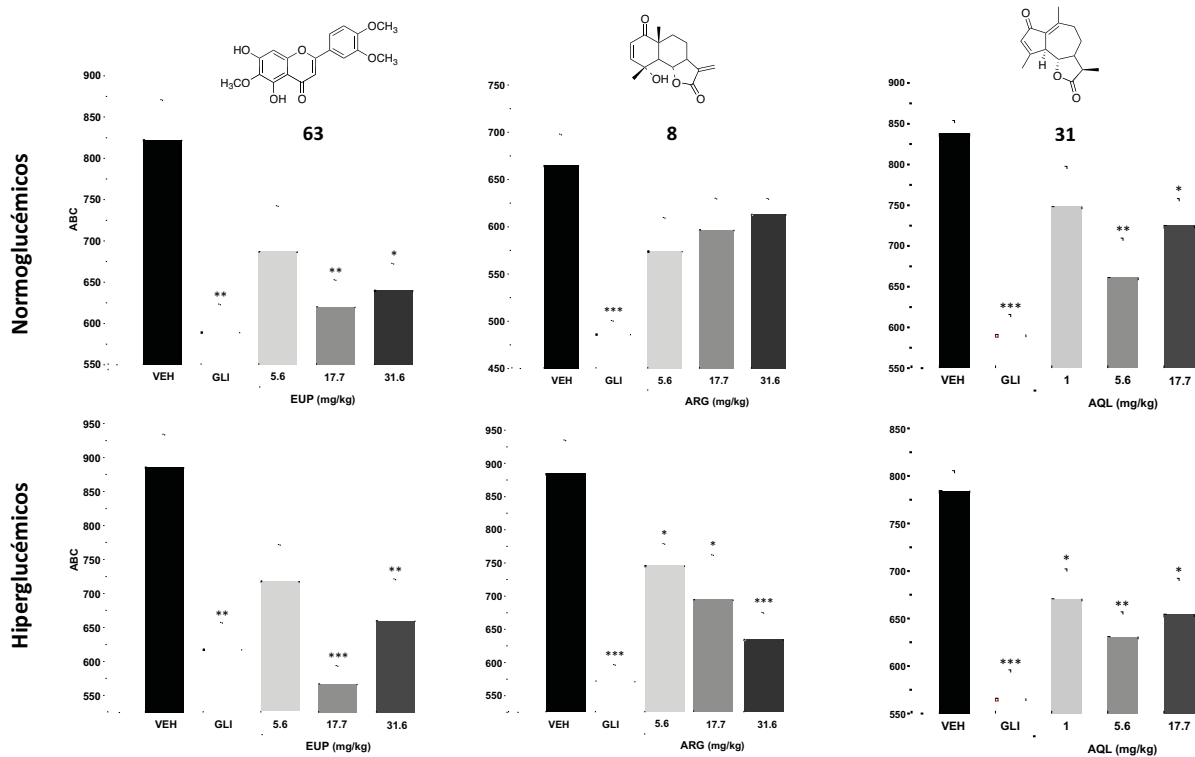


Figura 9. Efecto agudo hipoglucemiante de la eupatilina (**63**), la arglanina (**8**) y la aquilina (**31**) en ratones normoglicémicos e hiperglicémicos. GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo vehículo (VEH).

Estos resultados son consistentes con el efecto hipoglucemiante de la infusión de *A. ludoviciana*, y sugiere que compuestos **63**, **8** y **31** son algunos de los productos responsables del efecto hipoglucemiante de la especie. Probablemente, estos metabolitos secundarios estén ejerciendo su efecto a nivel del páncreas, favoreciendo un incremento en la liberación de la insulina, tal como lo realiza la GLI; también podrían facilitar la captura de la glucosa en el tejido muscular, hígado y tejido adiposo, como la metformina.

1.5. Estudios sobre el mecanismo de acción de la eupatilina (**63**), la arglanina (**8**) y la aquilina (**31**)

Para determinar si los compuestos **63**, **8** y **31** están involucrados en la liberación de insulina, se planteó una serie de experimentos en donde los roedores hiperglicémicos fueron pretratados media hora antes de la administración de los compuestos de prueba con

nifedipina, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} o nicorandil, un modulador positivo de los canales de K^+ . En la **Figura 11**, se muestran los resultados de esta serie de experimentos.

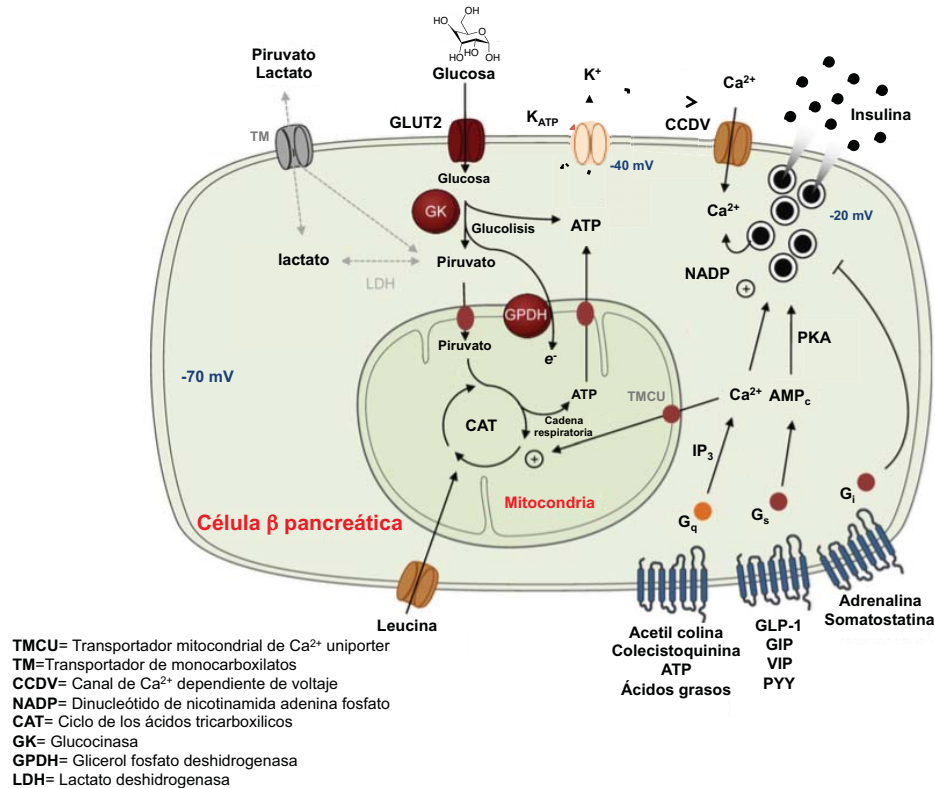


Figura 10. Proceso de liberación de la insulina en condiciones de homeostasis (Modificado de Rutter et al., 2015).

Antes de describir los resultados, es importante recordar que una vez que la glucosa ingresa a la célula β del páncreas por medio del transportador GLUT2 se fosforila por acción de la enzima glucocinasa; esta fosforilación es la señal para que la glucosa entre a la ruta de la glucólisis, ciclo de Krebs y por último la fosforilación oxidativa, resultando la síntesis de moléculas de ATP. Una vez que se incrementa la concentración de ATP los canales de K^+ dependientes de los niveles de ATP son cerrados, este efecto induce una ligera despolarización de la célula que permite la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y en consecuencia de la entrada de iones de calcio, fenómeno que genera la translocación de las vesículas que contienen insulina hacia la membrana y su liberación al torrente sanguíneo (**Figura 10**, Rutter et al., 2015; Baumgard et al., 2016).

De acuerdo a la información señalada en el párrafo anterior, sí al pretratar a los roedores hiperglucémicos con nifedipina o nicorandil, y después administrarlos con los

metabolitos **31**, **8** o **63**, se abate su efecto hipoglucemiante es probable que su modo de acción participe la liberación de la insulina en la célula β . De acuerdo a la **Figura 11**, el pretratamiento de los ratones hiperglucémicos con nicorandil (6.8 mg/kg) o nifedipina (13.6 mg/kg) abatió el efecto hipoglucemiante de la GLI (15 mg/kg, fármaco control). Este efecto era de esperarse debido a que el mecanismo de acción de la GLI involucra el bloqueo de los canales de K^+ dependientes de ATP. Este mismo efecto de “abatimiento del efecto hipoglucemiante” se observó con el compuesto **8** (17.7 mg/kg), sugiriendo que su mecanismo de acción hipoglucemiante es similar al de la GLI. El efecto hipoglucemiante de los compuestos **63** y **31** (17.7 mg/kg) únicamente fue atenuado cuando los ratones se pretrataron con nifedipina, indicando que tal vez el mecanismo de acción de estos compuestos esté relacionado con una modulación intracelular de las concentraciones de calcio.

1.6. Efecto de la aquilina (31) en la prueba de tolerancia a la insulina en ratones sanos

Para enriquecer los estudios de mecanismo de acción del compuesto **31** se determinó su efecto en una prueba de tolerancia a la insulina. Esta prueba es ampliamente utilizada para determinar la sensibilidad de los tejidos en respuesta a una carga de insulina. En la **Figura 12**, se observa que después de la administración de la carga de insulina el grupo de animales tratados con el metabolito **31** reduce aún más los niveles glucosa en sangre en comparación con el grupo que recibió al vehículo y la carga de insulina. Estos resultados respaldan el efecto hipoglucemiante de **31** y permiten formular la hipótesis de que este producto natural promueve la liberación y/o acción de la insulina.

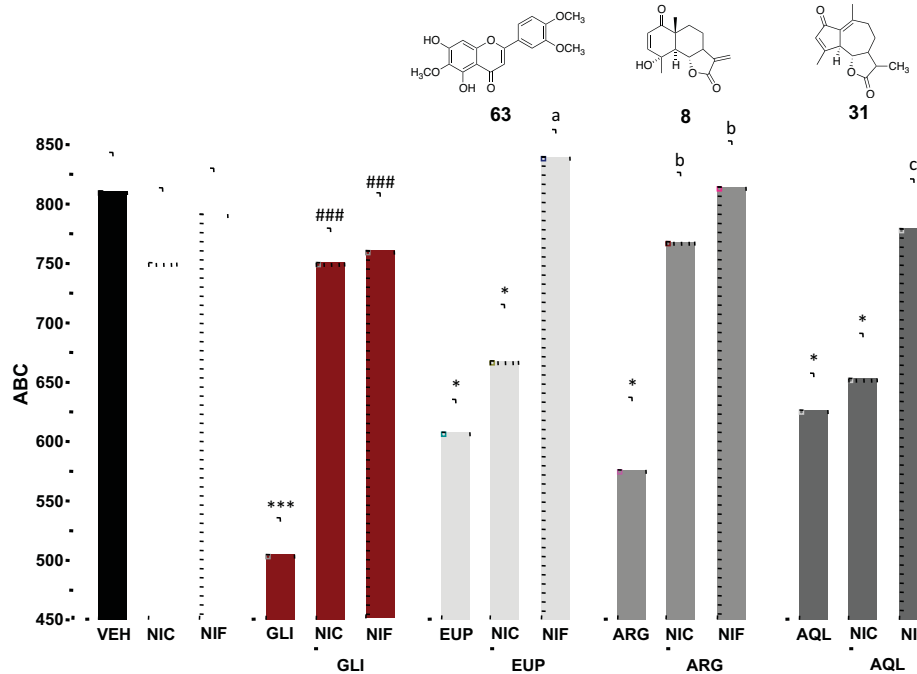


Figura 11. Efecto agudo hipoglucemiante de la eupatilina (EUP, 17.7 mg/kg), la arglanina (ARG, 17.7 mg/kg) y la aquilina (AQL, 17.7 mg/kg) en ratones hiperglucémicos pretratados con nicorandil (NIC, 6.8 mg/kg) o nifedipina (NIF, 13.6 mg/kg). GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo vehículo (VEH), ### $p = 0.001$ en comparación con la GLI, ^a $p = 0.05$ en comparación con la EUP, ^b $p = 0.05$ en comparación con la ARG, ^c $p = 0.05$ en comparación con la ACH.

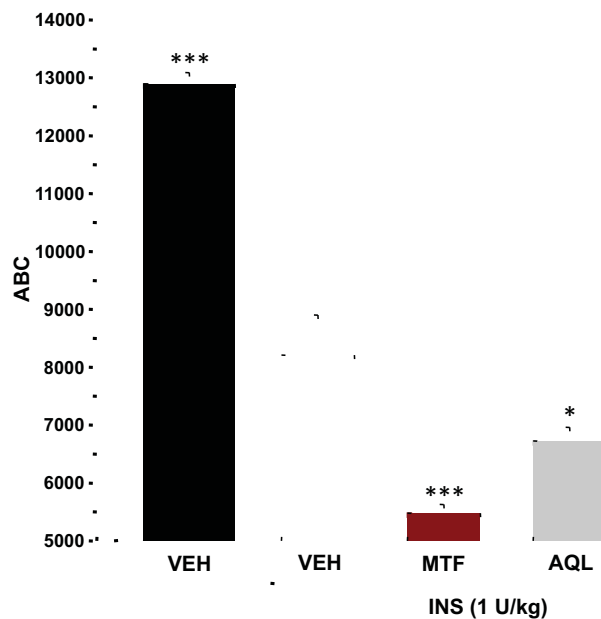


Figura 12. Efecto agudo hipoglucemiante de la aquilina (31, 17.7 mg/kg) en ratones normoglucémicos en la tolerancia a la insulina. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MET, metformina (200 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH más insulina (INS).

Brevemente, recordemos que una vez liberada la insulina, esta viaja a través del torrente sanguíneo y después interactúa con sus receptores donde induce la fosforilación en tirosinas que permiten la interacción y fosforilación de algunas proteínas, entre ellas el sustrato del receptor de insulina (IRS-1 o 2, por sus siglas en inglés). Este último participa en diferentes vías de señalización, particularmente en la regulación de la homeostasis de la glucosa. De esta manera IRS-1 es un mediador de la captación de glucosa estimulada por la insulina, y de la activación de las vías anabólicas en el músculo y el tejido adiposo, mientras que los efectos anabólicos de la insulina en el hígado son regulados principalmente por el IRS-2. La fosforilación de IRS-1 o IRS-2 conduce a su asociación con p85, subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés). Esta interacción recluta a la subunidad catalítica p110 de PI3K a la membrana plasmática, lo que resulta en la conversión de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns (3,4,5) P3). PtdIns (3,4,5) P3 facilita eventos de señalización mediante la activación de las proteínas cinasa dependiente de fosfoinositol (PDK1), PDK2 y AKT [también conocida como proteína cinasa B (PKB)]. La activación de AKT permite la fosforilación y activación de enzimas, como la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) y la Rab AS160 GTPasa, esta última al interactuar con la GTPasa RAB10 facilita la translocación de vesículas que contienen al transportador GLUT4 a la superficie celular. Estas acciones de la insulina promueven la captación y almacenamiento de la glucosa en condiciones anabólicas (**Figura 13**, Muoio y Newgard, 2008).

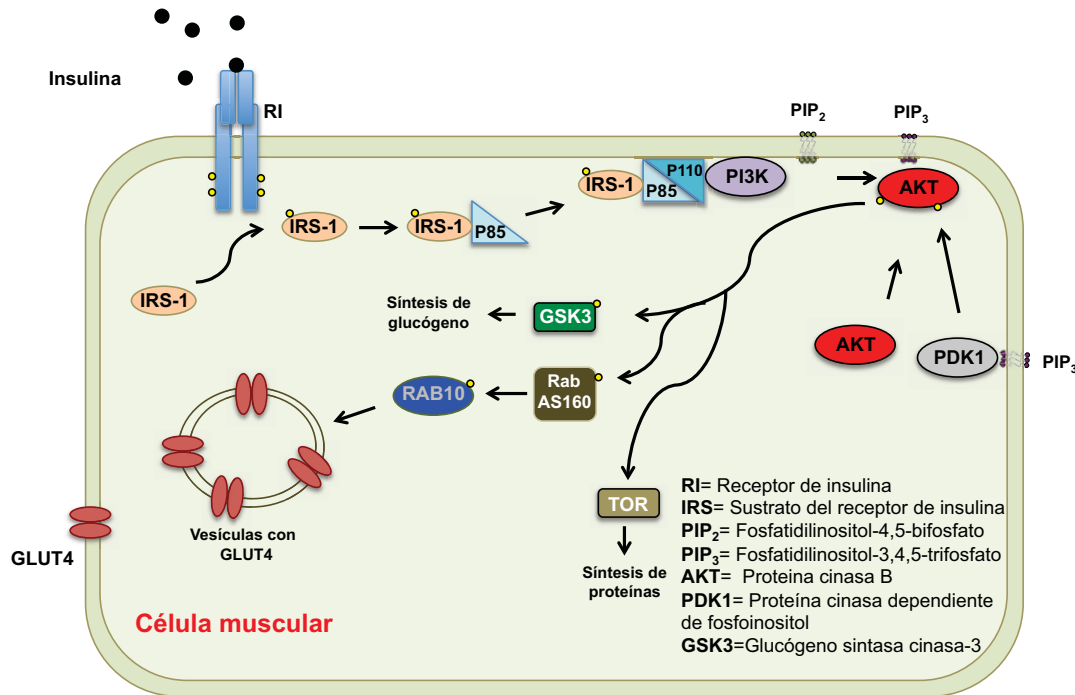


Figura 13. Transducción de señales de la insulina en una célula muscular (Muoio y Newgard, 2008).

1.7. Efecto del EA y los metabolitos secundarios sobre la actividad enzimática de la α -GL

Con base en los resultados del efecto antihyperglucémico del EA durante la prueba de tolerancia a la sacarosa, se planteó evaluar su efecto sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas (α -G); estas enzimas son fundamentales para la hidrólisis de los enlaces α -O-glucosídicos de carbohidratos sencillos para generar monosacáridos, y así facilitar su absorción a nivel intestinal. Para esta serie de experimentos se utilizó un ensayo espectrofotocolorimétrico en el que la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura (α -GL) correlaciona con la cantidad de sustrato [*p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*NPG)] que se hidroliza en presencia de los compuestos de prueba (**Figura 14**, Oki et al., 1999). De esta manera, la cantidad de *p*-nitrofenol (*p*NP) que se libera es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima.

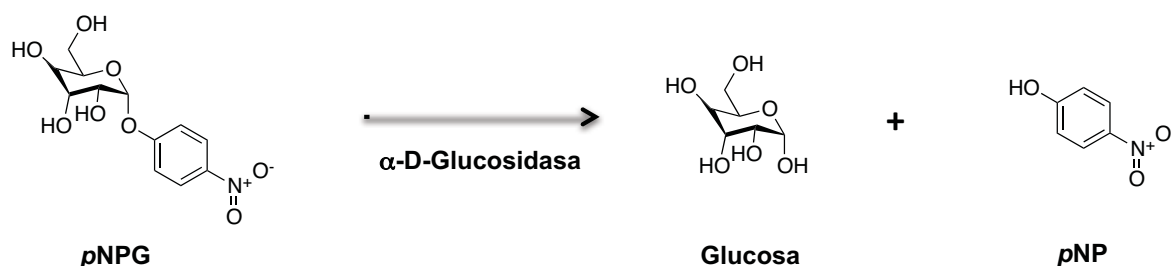


Figura 14. Reacción de hidrólisis de *p*NPG en presencia de una enzima α -Glucosidasa.

Así, se evaluaron las fracciones de hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt) obtenidas por reparto de la infusión. Los resultados indicaron que ambas fracciones inhibieron la actividad de la α -GL. La fracción HEX resultó más activa que la de AcOEt (**Figura 15A**); las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) fueron de 476 ppm y 2486 ppm, respectivamente. Estos resultados apoyan el efecto antihiper glucémico de EA previamente ensayados en la prueba de tolerancia a la sacarosa (Anaya-Eugenio, 2012).

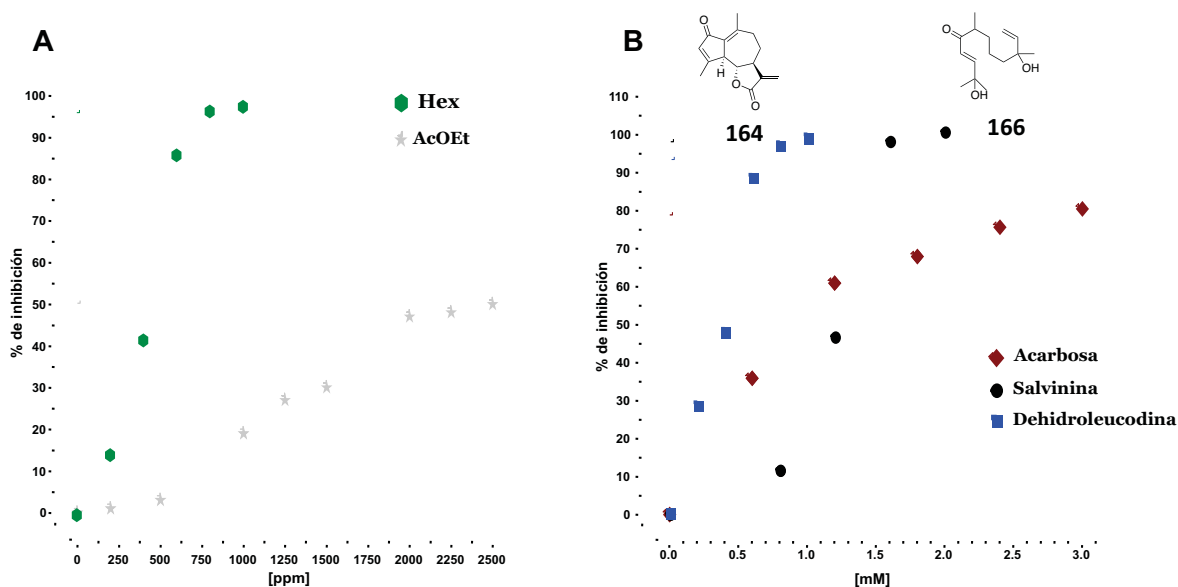


Figura 15. A) Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitor de las fracciones con Hex, AcOEt de la infusión, B) salvinina (166) y dehidroleucodina (164) sobre la enzima α -GL.

También se analizó el efecto de los metabolitos aislados sobre la actividad de la enzima. Los resultados indicaron que la dehidroleucodina (164) y la salvinina (166) inhiben la α -GL de manera dependiente de la concentración (**Figura 15B**), incluso los compuestos

resultaron más eficaces que el fármaco control la acarbosa ($CI_{50}=560 \mu\text{M}$). Para el caso del compuesto **164** la CI_{50} fue de $375 \mu\text{M}$, y para **166** de 1.2 mM . Estudios previos comprobaron que el ácido 3,5-dicafeoilquinico (**165**) (Wang y colaboradores 2014) y la eupatilina (Hui-Yuan et al., 2010) son inhibidores de la $\alpha\text{-GL}$.

Para establecer el tipo de interacción que ocurre entre la salvinina (**166**) y la enzima $\alpha\text{-GL}$ se realizó un estudio de cinética enzimática y se construyó una gráfica de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. Los resultados indicaron que el tipo de inhibición de la salvinina (**166**) es de tipo mixto (**Figura 16**), ya que la intersección de las rectas resultantes de graficar los dobles recíprocos utilizando varias concentraciones del inhibidor fue en el primer cuadrante entre los ejes x y y . La K_i (constante de afinidad) calculada fue de $1.34 \mu\text{M}$. Estos resultados sugieren que **166** probablemente se une a la enzima $\alpha\text{-G}$, o al complejo enzima-sustrato [$\alpha\text{-G-pNPG}$] (Copeland, 2000; Xu, 2010). Para la acarbosa la K_i fue de $156.1 \mu\text{M}$.

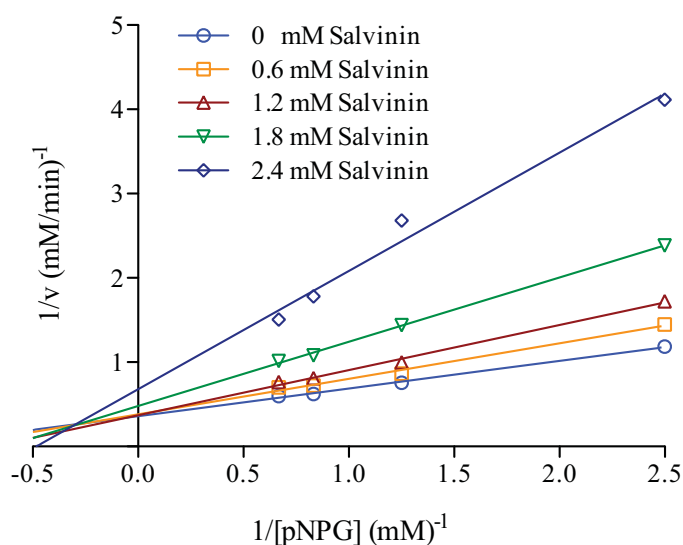


Figura 16. Gráfica de los dobles recíprocos de Lineweaver–Burk de la inhibición de la salvinina (**166**) con diferentes concentraciones de sustrato (pNPG) sobre la enzima $\alpha\text{-GL}$.

1.8. Estudios de acoplamiento molecular de la salvinina (166)

Con el objetivo de predecir el modo de interacción de la salvinina (**166**) con la enzima α -GL, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM) de los 4 posibles diastereoisómeros (**166a-166d**, **Figura 17**) de la molécula (Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010). Estos cálculos permiten estimar de manera teórica la naturaleza de la interacción, el sitio en el que se realiza la unión y la afinidad que hay entre el ligando y la proteína receptora.

Los estudios de AM se realizaron con la estructura cristalográfica del complejo de la enzima isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* con glucosa (código PDB: 3A4A), obtenida del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>). Con el fin de obtener el mejor modelo de interacción, se realizó un estudio preliminar (acoplamiento ciego). En todos los casos, se seleccionó la conformación de menor energía de cada estereoisómero. Los resultados del AM indican que los cuatro estereoisómeros interaccionan con la enzima α -G en diferentes sitios (**Figura 18**). En todos los casos, los tipos de interacción más importantes fueron hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno.

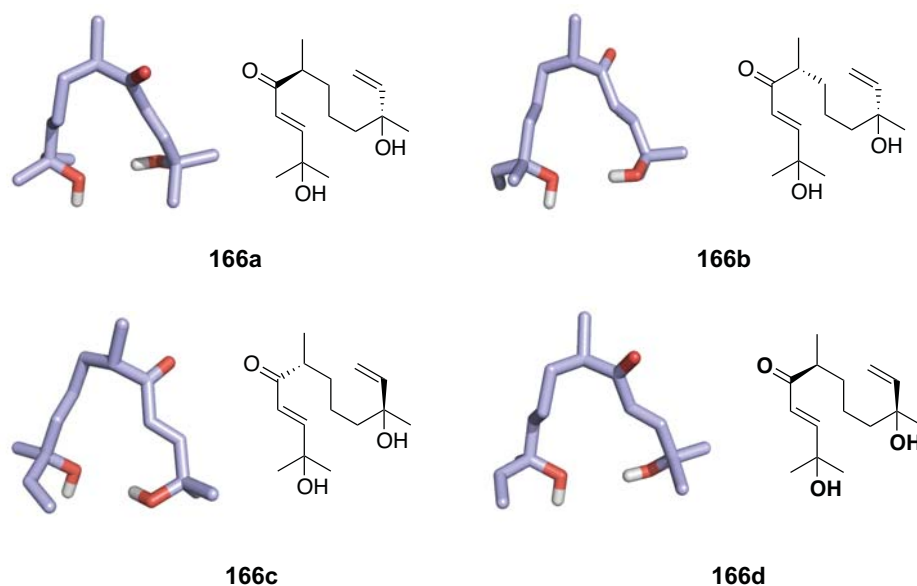


Figura 17. Estereoisómeros de la salvinina (**166**).

En el caso del diastereoisómero **166c** la interacción se da cerca del sitio catalítico de la proteína; los sitios teóricos de unión incluyen los aminoácidos Lys-156, Ser-157, Tyr-158, Gly-160, Gly-161, Ser-240, Ser-241, Phe-314, Asn-415, Ala-418, Ile-419, y Glu-422. La estabilización de la interacción ligando-enzima se debe a los puentes de hidrogeno entre el hidroxilo en C-10 y Ser-240, y entre el hidroxilo en C-2 y la Gly-161. Así mismo, el grupo carbonilo en C-5 muestra un enlace de hidrogeno con Lys-156. La estimación de la k_i fue de 5.04 μM . Por otro lado, las moléculas **166a**, **166b** y **166d**, se unieron a los residuos Ala-292, His-295, Glu-296, Asn-289, Ile-262, Thr-274, Arg-270, Ile-272, y Val-276.

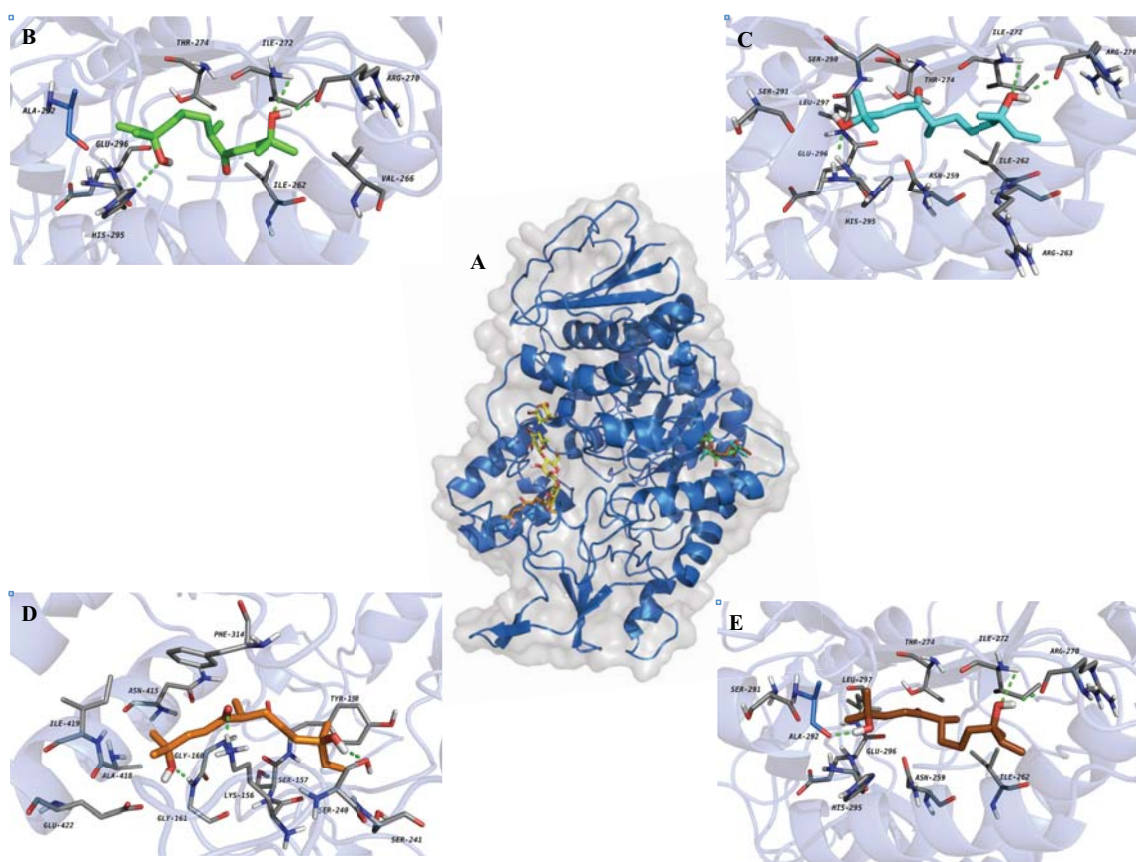


Figura 18. (A) Modelo estructural de la interacción de los diastereoisómeros **166a-166d** (verde, turquesa, naranja y café, respectivamente) y la acarbosa (amarillo) con la enzima α -GL. Representación en 3D de la interacción entre la enzima y los diastereoisómeros **166a** (B), **166b** (C), **166c** (D) y **166d** (E) en el sitio de unión predicho.

Los valores teóricos de la k_i para estos estereoisómeros fueron 5, 14 y 8.66 μM , respectivamente. Estas moléculas también mostraron interacciones de puentes de hidrogeno con Arg-270 y Ile-272. Particularmente, **166a** también mostró este tipo de interacción con His-295 y Asn-289; **166b** con Glu-296, y **166d** con Ala-292. Así, los resultados *in silico*

para **166** apoyan los experimentos de cinética enzimática respecto a la naturaleza mixta de la inhibición. Sin embargo, para confirmar esta conclusión parcial es necesario establecer la configuración absoluta de los centros quirales de la salvinina.

1.9. Efecto antihiper glucémico de la dehidroleucodina (**164**) en la prueba oral de tolerancia a la sacarosa

Con base en los resultados de inhibición enzimática, el compuesto **164** se evaluó en una prueba oral de tolerancia a la sacarosa (POTS). Esta prueba es similar a la POTG, sin embargo, en lugar de administrar una carga de glucosa, se administra sacarosa, disacárido compuesto por glucosa y fructosa. Esta prueba es usada con el objetivo de determinar *in vivo* la inhibición de las enzimas α -G del tracto intestinal. La **Figura 19**, muestra que la dosis más alta evaluada del compuesto **164** (17.7 mg/kg), es capaz de inhibir la formación del pico posprandial a los 30 min de registro después de administrar la carga de sacarosa, tanto en ratones normoglucémicos como hiper glucémicos. Es decir, **164** inhibe la actividad de las enzimas α -G disminuyendo así la absorción de glucosa. Estos experimentos sustentan los resultados de la actividad inhibitoria de **164** sobre las α -GL *in vitro*.

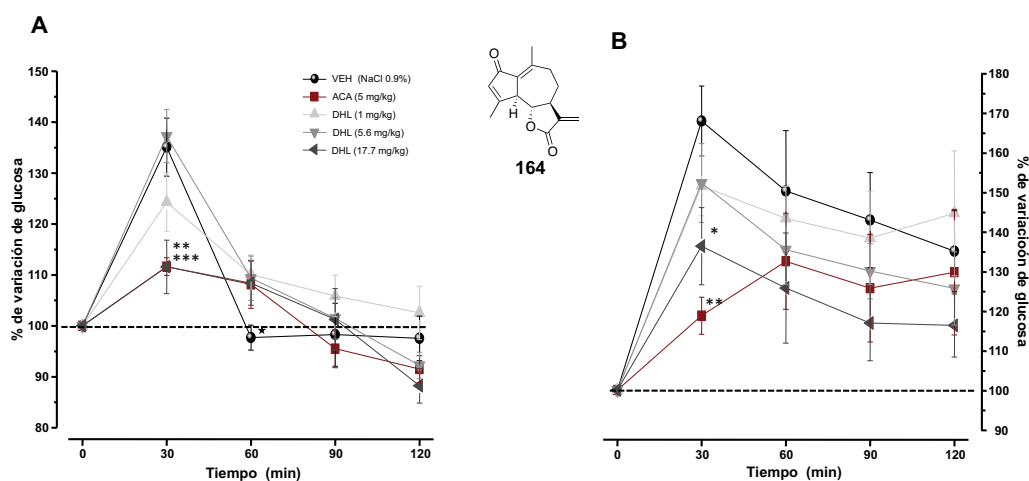


Figura 19. **A**) Efecto antihiper glucémico de la deshidroleucodina (DHL, **164**) en la prueba de tolerancia a la sacarosa en ratones sanos, **B**) e hiper glucémicos. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); ACA, acarbosa (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

En resumen, los resultados de los experimentos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* realizados con los preparados y/o algunos metabolitos secundarios de la especie *A. ludoviciana* comprueban a nivel preclínico y en roedores, sus propiedades antihiper glucémicas a través de la inhibición de las enzimas α -G.

Cabe destacar que de acuerdo a diversos estudios, otros metabolitos secundarios reportados en la planta, y que no fueron aislados en el presente estudio, pueden regular de los niveles de glucosa en sangre. En este sentido, Priscilla y colaboradores (2105) demostraron que la administración del metabolito **62** (45 días) a ratas diabéticas, induce una marcada reducción en la hiperglucemia e hiperinsulinemia, además de una regulación de los transportadores GLUT-4. En un estudio computacional se reveló el potencial de la tricina (**74**) como un inhibidor de la enzima α -amilasa (Madeswaran et al., 2014). Los flavonoides hispidulina (**75**), la apigenina (**78**), luteolina (**79**) inhiben la actividad de la enzima α -GL (Liu et al., 2014; Qi-Qin et al., 2014). Bower y colaboradores (2014) demostraron que la naringenina (**62**) y la hispidulina (**75**) inhiben la actividad de la enzima DPP-IV. En adipocitos 3T3-L1, **79** mejora la sensibilidad a la insulina mediante el incremento en la expresión del sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (ISR 1 y 2) y del transportador GLUT-4.

2. Determinación de los efectos del EA de *A. ludoviciana* sobre el síndrome metabólico (SM)

El síndrome metabólico (SM) incluye diferentes anomalías metabólicas; obesidad central, dislipidemia, hipertensión y resistencia a la insulina. En conjunto estos desordenes llegan a causar un daño irreversible en las células β del páncreas que induce el desarrollo de la DTM2 (Samson y Garber, 2014). De acuerdo a los resultados que se describen arriba, los preparados y algunos metabolitos de *A. ludoviciana* poseen propiedades antidiabéticas. Por esta razón se planteó determinar el efecto de la infusión de la planta sobre algunos parámetros del SM.

En primer lugar se estableció un modelo adecuado de SM en ratas Sprague-Dawley. En roedores existen dos formas de generar este estado, la primera consiste en modificar genéticamente los animales (Kennedy et al., 2010). La segunda se consigue con una dieta

de composición definida (Panchal y Brown, 2011). En este caso, se optó por la segunda y para ello los animales se trataron durante tres meses con una solución de fructosa al 10%. Las ratas desarrollaron obesidad (incremento en el peso, mayor consumo calórico, mayor índice de Lee), hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (reducción en las concentración de HDL, incremento de los triglicéridos), en comparación al grupo que recibió únicamente agua (VEH). En congruencia con el modelo generado están los reportes que comprueban que el tratamiento crónico de ratas con fructosa genera diferentes modificaciones en el metabolismo como son obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia (Ferreira de Moura et al., 2009; Panchal y Brown, 2011; Shahraki et al., 2011).

Con estos antecedentes, se procedió a determinar el efecto del EA en ratas con SM inducido con fructosa. En primer lugar se realizó una POTG, encontrándose que el tratamiento con EA (316 mg/kg) inhibió la formación del pico posprandial (**Figura 20**), en comparación del grupo de ratas con SM tratadas con el VEH. Estos datos confirman el efecto antihiperoglucémico observado del EA en ratones sanos e hiperoglucémicos.

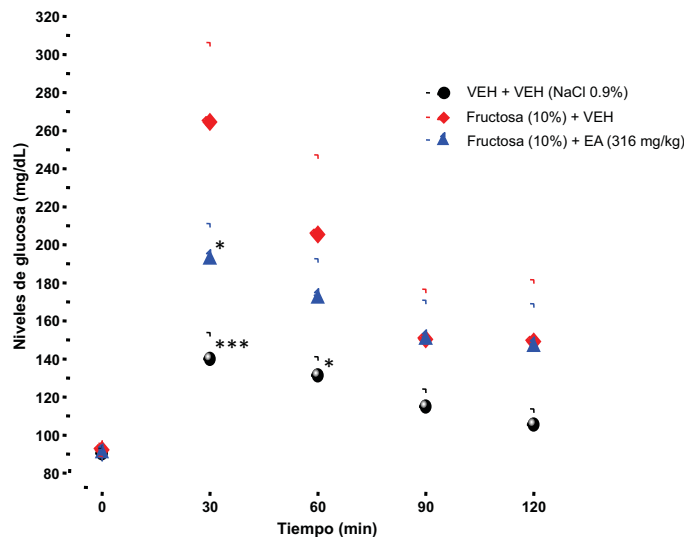


Figura 20. Efecto antihiperoglucémico del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en la prueba de tolerancia a la glucosa en ratas con SM inducido con fructosa. Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo de ratas con SM más vehículo (VEH).

La administración diaria de 316 mg/kg de EA durante siete días a las ratas con SM incrementó significativamente las concentraciones de insulina y redujo los niveles de glucosa, colesterol total, ácido úrico y triglicéridos, pero no modificó las concentraciones de glucógeno hepático (**Figura 21**).

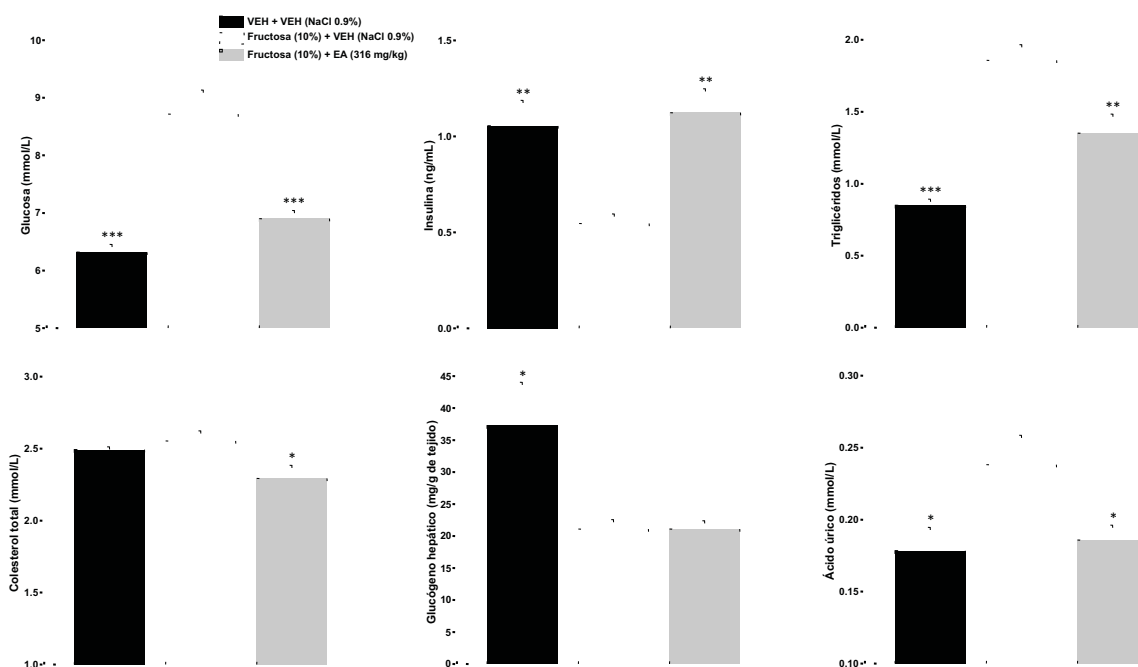


Figura 21. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); ACA, acarbosa (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

El EA también redujo significativamente el peso corporal, el peso del hígado y el índice de Lee, sin embargo, aunque hay una tendencia a reducir la grasa abdominal, no se observaron cambios significativos en comparación con el grupo tratado con fructosa más vehículo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Efecto del extracto acuoso (EA) de *A.ludoviciana* en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa (parámetros físicos).

| | Sanas + | Fructosa (10%) + | Fructosa (10%) + |
|---------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| | Vehículo | Vehículo | AE |
| Peso (g) | 381.6 ± 5.2 ^c | 431 ± 4.4 | 400.6 ± 9.2 ^a |
| Hígado (g) | 8.48 ± 1 ^c | 12.52 ± 0.1 | 10.4 ± 0.4 ^a |
| Grasa abdominal (g) | 8.37 ± 0.6 ^c | 15.1 ± 0.4 | 13.5 ± 0.4 |
| Índice de Lee | 295.5 ± 2.1 ^c | 314.2 ± 2.8 | 297.6 ± 3 ^b |

Cada valor es la media ± el error estándar, $n = 6$.

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$ en respecto al grupo Fructosa (10%) más vehículo.

Además de los efectos antihiper glucemiantes ya demostrados, estos resultados sugieren que el EA también puede provocar un incremento en la síntesis y liberación de insulina, reducción de los procesos lipogénicos, y una mayor utilización de la glucosa. El hecho de que los niveles de glucógeno hepático y el peso de la grasa abdominal no se modifiquen por el tratamiento con EA apoya esta sugerencia.

Para el tratamiento del SM no existe un fármaco único; los médicos suelen prescribir un grupo de fármacos que mejore cada uno de los trastornos que lo componen. Así, la sibutramina y orlistat (un inhibidor de las lipasas intestinales) se recomiendan para reducir el peso corporal; las estatinas junto con los fibratos (fenofibrato y niacina) controlan las dislipidemias; las biguanidas (metformina), tiazolidinedionas (pioglitazona), los inhibidores de las enzimas α -G, entre otros, regulan las concentraciones de glucosa en un estado de hiperglucemia (Kaur, 2014) y los inhibidores de la enzima que cataliza la formación de angiotensina II (ECA) a partir de la angiotensina I para así mejorar la hipertensión.

Cabe mencionar que previamente Estrada-Soto y colaboradores (2012), comprobaron el efecto relajante de la musculatura lisa, incluyendo la de tráquea, aorta y íleon de rata, de varios preparados de *A. ludoviciana*. De tal forma, que además de los efectos demostrados en el presente trabajo, la administración de EA potencialmente podría mejorar un estado de hipertensión en roedores.

3. Determinación del efecto antinociceptivo, antiinflamatorio del EA, AE y metabolitos secundarios de *A. ludoviciana*

3.1. Efecto antinociceptivo del EA en el modelo de la formalina

El ensayo de la formalina constituye uno de los modelos farmacológicos más utilizados para el descubrimiento de sustancias analgésicas potenciales. Ésta prueba consiste en la evaluación del comportamiento de roedores en respuesta a un estímulo químico. Así, la administración de formalina en la pata trasera del roedor produce un patrón típico de respuestas espontáneas, tales como lamer, sacudir, brincar y morder, mismas que se aprecian en dos fases (Tjolsen et al., 1992). La fase temprana o neurogénica resulta de la activación de las fibras aferentes nociceptivas, principalmente las fibras C, y de los receptores TRPA1 y TRPV1 (Martínez-Rojas et al., 2014). La segunda fase, la inflamatoria, es una consecuencia de la liberación de mediadores inflamatorios locales como bradiquinina, prostaglandinas, y de la sensibilización a los receptores de glutamato y sustancia P (Sawynok y Liu, 2004). Por lo tanto, este modelo puede ser utilizado para detectar agentes analgésicos con un mecanismo de acción tanto de tipo central como periférico.

Como se muestra en la **Figura 22A**, la administración de formalina (2%, 30 μ L, i.pl.) a ratones pretratados con vehículo (VEH), generó un incremento en el ABC del tiempo de lamida de la pata tratada. Sin embargo, en los animales pretratados con el EA y sus fracciones AcOEt y Hex (316 mg/kg) se observó una reducción significativa de la respuesta al estímulo químico. Este efecto se registró únicamente durante la fase inflamatoria (**Figura 22B**); en consecuencia, EA posee propiedades antiinflamatorias, y debe contener sustancias que modulen la producción o liberación de los mediadores inflamatorios implicados en la segunda fase de la prueba de la formalina.

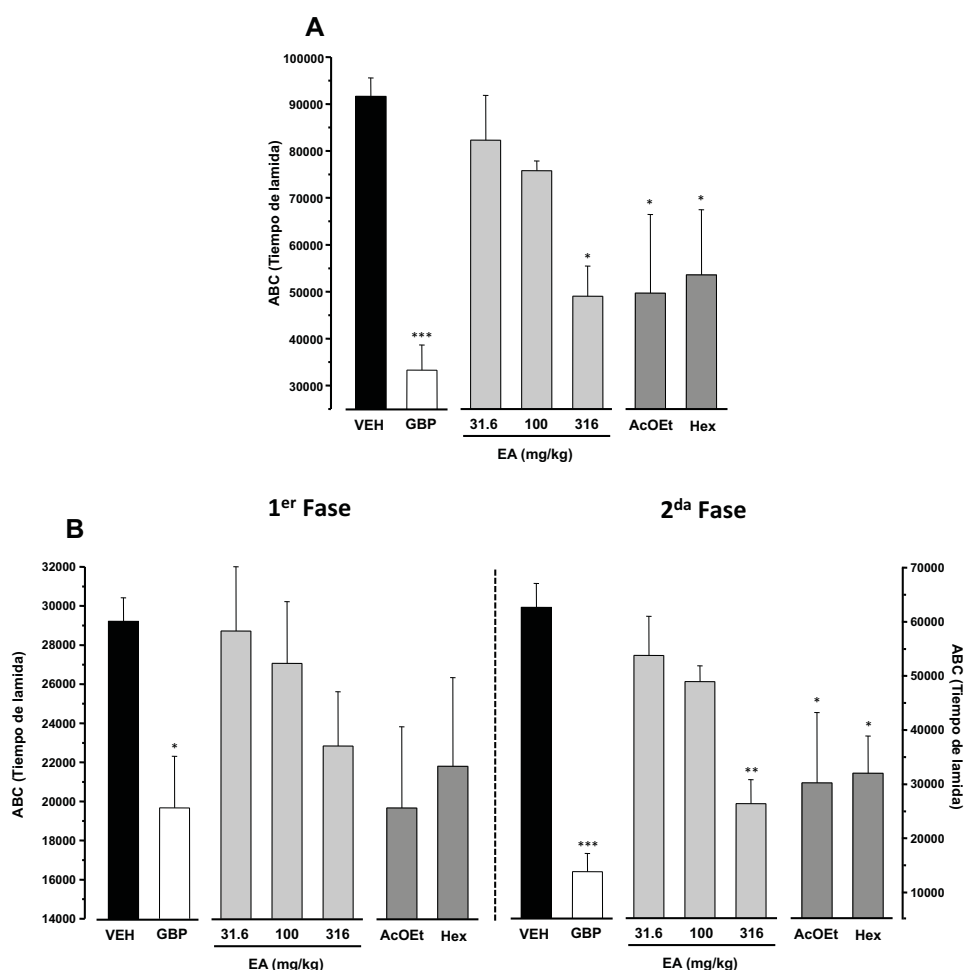


Figura 22. **A)** Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana*, y sus fracciones de hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt) en la prueba de la formalina en ratones. **B)** Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GBP, gabapentina (30 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.2. Efecto antiinflamatorio de EA en el modelo de la carragenina

Para comprobar el efecto antiinflamatorio de EA, detectado durante la segunda fase del experimento con formalina, se ensayó su acción sobre el edema de la pata inducido por carragenina; en esta prueba ampliamente utilizada para la determinación de eventos de inflamación, se distinguen también dos etapas de liberación de agentes inflamatorios. La primera fase se presenta entre las 0 y 2.5 h después de la administración de carragenina, y su regulación se atribuye a la acción de mediadores químicos como la histamina, la

serotonina, y la bradiquinina. La segunda fase ocurre entre las 2.5 y 6 h después de la inyección de carragenina, y se caracteriza por la producción de radicales libres, óxido nítrico (ON), prostaglandinas, filtración de neutrófilos y la expresión de la enzima inducible ciclooxigenasa-2 (COX-2; Morris et al., 2003). Los resultados de la prueba se muestran en la **Figura 23**, en la que se observa que la administración de carragenina (1%, 30 μ L) en la pata del grupo de animales pretratados con el VEH provoca un edema, el cual alcanza un volumen máximo a las tres horas de la administración. Sin embargo, cuando los animales se pretrataron con EA (31.6, 100 y 316 mg/kg) el tamaño del edema se redujo significativamente; el efecto antiinflamatorio fue comparable al generado con la administración de diclofenaco (DIC; 31.6 mg/kg). Estos resultados sugieren que el efecto antinociceptivo producido por EA de *A. ludoviciana* durante la segunda fase de la prueba de la formalina podría estar relacionado con una acción antiinflamatoria mediada por una inhibición de la síntesis o liberación de prostaglandinas y ON, o la expresión de la COX-2, entre otros factores.

Es importante señalar que otros extractos de especies del género *Artemisia* también han demostrado actividades antinociceptivas y antiinflamatorias. Por ejemplo, Miño et al., (2003) demostraron que un extracto acuoso de las partes aéreas de *Artemisia copa* tenía acción antiinflamatoria en varios modelos animales. Además, el extracto hidroalcohólico de *A. vulgaris* ejerció una acción antinociceptiva en el ensayo del estiramiento abdominal (Pires et al., 2008).

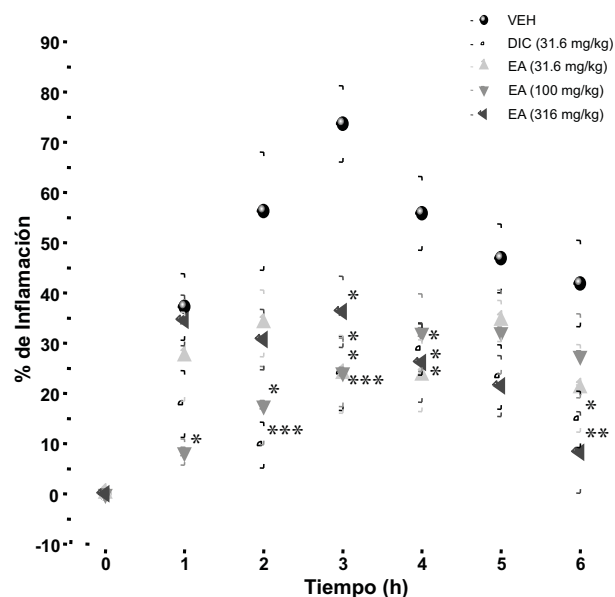


Figura 23. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* detectado en el ensayo de edema inducido por la administración de carragenina. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); DIC, diclofenaco. Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.3. Efecto antinociceptivo del AE en la prueba de la formalina

El aceite esencial (AE; 1-316 mg/kg) obtenido de las partes aéreas de la planta también presentó una acción antinociceptiva cuando se ensayó en la prueba de la formalina en ratones. (**Figura 24A**). La dosis más alta evaluada (316 mg/kg) fue la única que provocó un efecto significativo en la fase neurogénica, en comparación con el grupo VEH. Sin embargo, las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg provocaron un efecto antiinflamatorio en la segunda fase (**Figura 24B**). Por lo tanto el AE parece tener compuestos antinociceptivos que actúan tanto en la fase neuronal como en la inflamatoria.

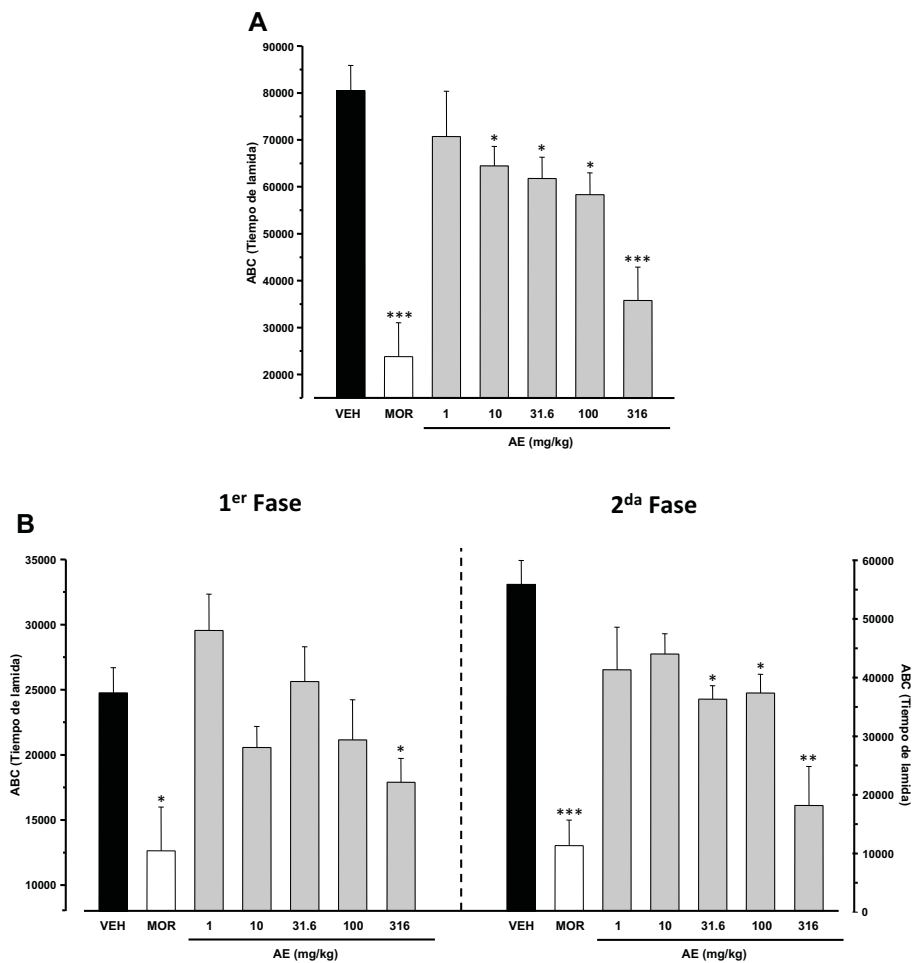


Figura 24. **A**) Efecto antinociceptivo del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana* en ratones en la prueba de la formalina. **B**) Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MOR, morfina (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.4. Efecto antinociceptivo del AE en la prueba de la placa caliente

Para confirmar el efecto del AE en la modulación a nivel neuronal, se determinó su efecto en el modelo de la placa caliente. La prueba de la placa caliente en ratones mide el tiempo de respuesta conductual (lamida o sacudida de las patas traseras, salto o micción) a un estímulo térmico. El tiempo que el ratón tarda en responder se conoce como período de latencia. Las respuestas a un estímulo térmico son integradas a nivel supraespinal (Le Bars et al., 2001). La **Figura 25**, muestra que en los ratones tratados con el VEH, el período de latencia fue muy corto. Pero en los ratones pretratados con diferentes dosis del AE (17.7,

31.6 y 100 mg/kg) o MOR (5 mg/kg) éste período incrementó de manera significativa en comparación con los del grupo VEH.

Estos resultados confirman que al igual que el EA el AE también posee propiedades antinociceptivas, reguladas tanto a nivel central como periférico.

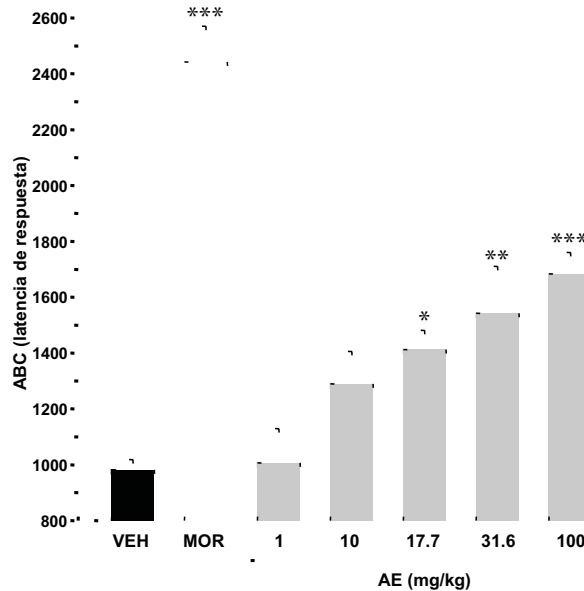


Figura 25. Efecto antinociceptivo del aceite esencial (AE) de *A. ludoviciana* detectado mediante el modelo de la placa caliente en ratones. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MOR, morfina (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.5. Estudios sobre el mecanismo de acción antinociceptivo del AE

Para determinar el mecanismo de acción antinociceptivo de AE se realizaron una serie de experimentos que consistieron en administrar a los animales antes del estímulo nociceptivo con una serie de antagonistas incluyendo la naloxona (NLX, 1 mg/kg), un antagonista no selectivo de los receptores opioides; atropina (ATR, 1 mg/kg), un antagonista del sistema colinérgico; L-nitro-metil éster arginina (L-NAME, 3 mg/kg), un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa; y GLI (10 mg/kg), un bloqueador de los canales de K^+ sensibles a ATP. En todos los casos, 30 min después del este pretratamiento, los animales fueron administrados con una dosis del AE o VEH o MOR (5 mg/kg). Para la evaluación se utilizaron los modelos de la placa caliente (AE, 17.7 mg/kg) y formalina (AE, 31.6 mg/kg). En el modelo de la placa caliente el efecto antinociceptivo del AE

(equivalente a la DE₄₀) únicamente fue abatido en el grupo pretratado con NLX (**Figura 26**); este mismo efecto se observó en los ratones tratados con MOR y pretratados con NLX. De esta manera es posible proponer que el AE podría modular la actividad de los receptores opioides como lo hace la MOR.

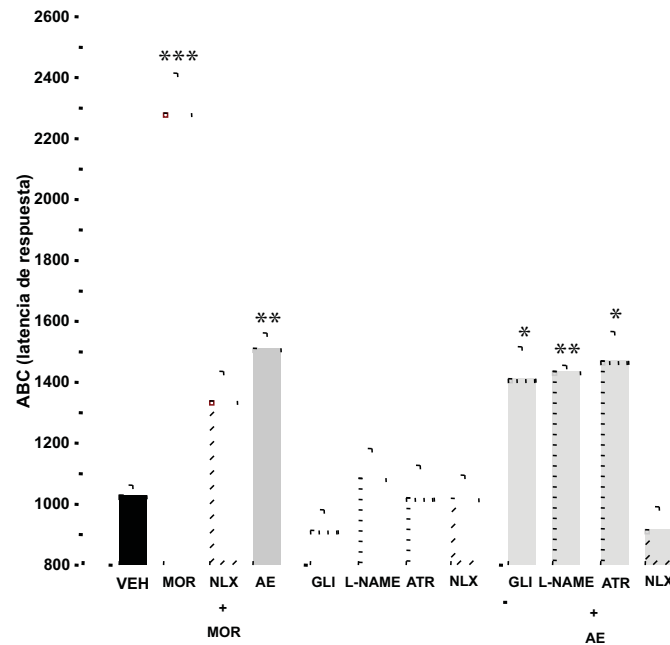


Figura 26. Efecto antinociceptivo de AE (17.7 mg/kg, i.p.) en ratones pretratados con naloxona (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropina (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamida (GLI, 10 mg/kg, i.p.) o N^G-L-nitro arginina metil ester (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) en el modelo de la placa caliente. Cada valor es la media ± el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

Es importante tener en cuenta que en la actualidad los analgésicos opioides como la MOR, son la principal opción para el tratamiento del dolor moderado a severo (Turnaturi et al., 2016). La MOR es un agonista de los receptores opioides (μ , δ y κ), que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, fundamentalmente Gi/Go según la ubicación neuronal del receptor. Gi es una proteína que inhibe la actividad enzimática de la adenilato ciclasa (AC), por consiguiente, se reducen las concentraciones de adenosil monofosfato cíclico (AMPC). Este efecto tiene como consecuencia el cierre de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje en las terminales presinápticas de las neuronas aferentes que conducen señales nociceptivas, reduciendo así la liberación de los neurotransmisores. Otro efecto de la acción de la MOR ocurre en la neurona postsináptica, mediante la activación de los canales de K⁺, que favorece una hiperpolarización, y en consecuencia, la disminución

de la liberación de los neurotransmisores participantes en la respuesta nociceptiva en el sistema nervioso (Headrick et al., 2015).

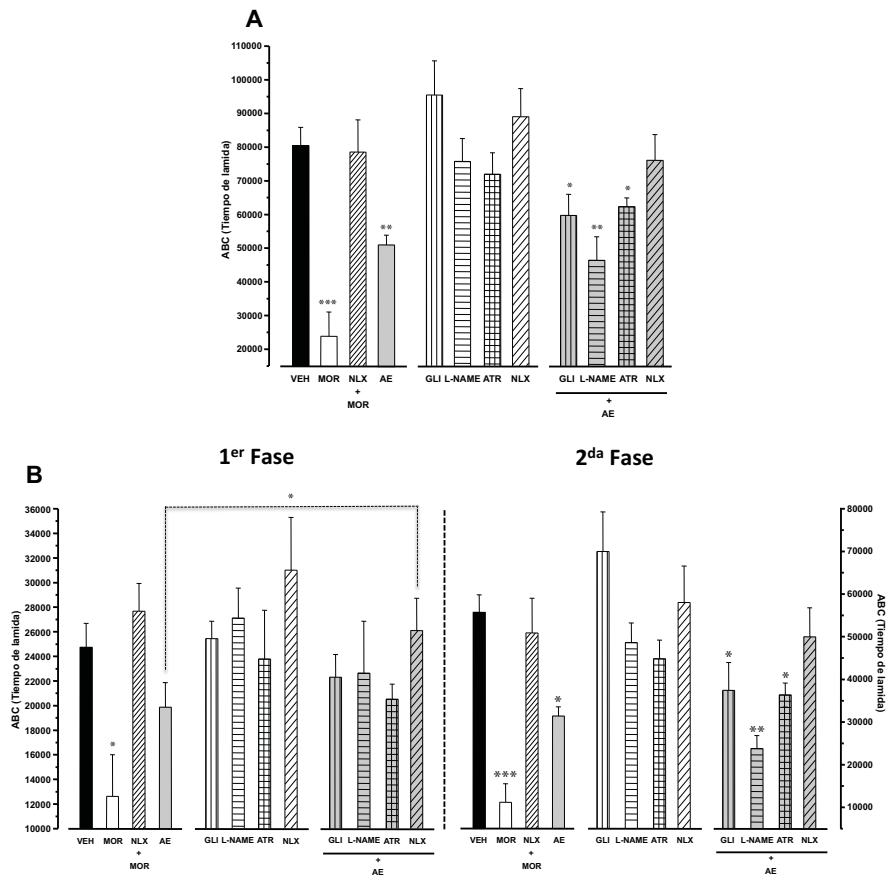


Figura 27. A) Efecto antinociceptivo de AE (31.6 mg/kg, i.p.) en ratones pretratados con naloxona (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropina (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamida (GLI, 10 mg/kg, i.p.) o N^G-L-nitro arginina metil ester (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) en la prueba de la formalina. B) Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MOR, morfina (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

Para confirmar estos resultados también se realizó el mismo tipo de experimento en el modelo de la formalina. Para este modelo la dosis de AE que se administró fue de 31.6 mg/kg, correspondiente a la DE₂₅. La **Figura 27** muestra que el efecto antinociceptivo de AE se revirtió en el grupo de roedores pretratados con NLX. En conjunto esta serie de experimentos sugieren que el AE ejerce un efecto antinociceptivo mediante la modulación de los receptores opioides como lo hace la MOR.

3.6. Efecto sedante del EA y del AE

Con la finalidad de demostrar que la actividad antinociceptiva de EA y AE no es debido a la interferencia directa sobre la función de la coordinación o de la actividad motora, se decidió evaluar sus efectos en las pruebas del rotarod y campo abierto. Como se muestra en la **Figura 28**, los ratones tratados con EA o con AE (316 mg/kg) no mostraron ninguna alteración motora en los animales durante el desarrollo de las pruebas. El diazepam (DZP, 4 mg/kg, ip) redujo significativamente el tiempo de los ratones en el rotarod (**Figura 28A**), así como el número de cuadros recorridos en la prueba de campo abierto (**Figura 28B**). Estos resultados indican que los efectos farmacológicos ejercidos por los preparados en los modelos de la placa caliente y formalina son realmente antinociceptivos.

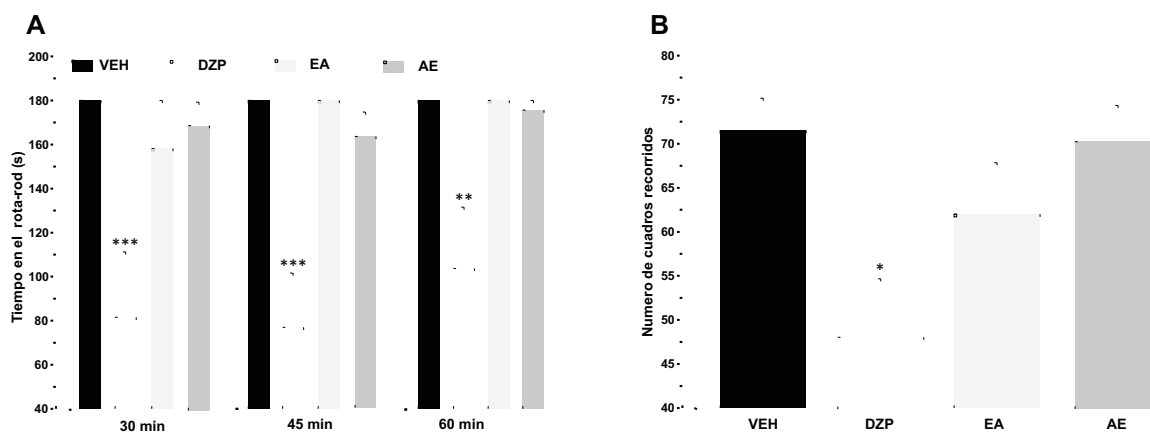


Figura 28. A) Efecto del extracto acuoso (EA, 31.6 mg/kg) y del aceite esencial (AE, 31.6 mg/kg) de *A. ludoviciana* en el rotarod y **B)** Campo abierto. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); DZP, diazepam (4 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.7. Efecto antinociceptivo de la aquilina (31) y la dehidroleucodina (164) en la prueba de la formalina

El efecto antinociceptivo de los compuestos **31** y **164** (10, 17.7 y 31.6 mg/kg) se determinó mediante la prueba de la formalina. En estos experimentos se utilizó a la gabapentina (GBP) como fármaco de referencia. Los resultados muestran que la administración de ambos compuestos genera una respuesta antinociceptiva en los roedores (**Figura 29A**). En el caso de la aquilina no se observó efecto en la primera fase, sin embargo, en la segunda etapa la dosis de 17.7 mg/kg redujo la respuesta al estímulo

químico. Respecto al metabolito **164**, la dosis de 31.6 mg/kg redujo el tiempo de lamida en los roedores durante la primera fase; este efecto también se apreció en la segunda fase a las tres dosis evaluadas (**Figura 29B**). En conjunto, estos resultados sugieren que los compuestos **31** y **164** aislados de *A. ludoviciana* podrían inducir su efecto antinociceptivo través de la modulación de mediadores centrales e inflamatorios.

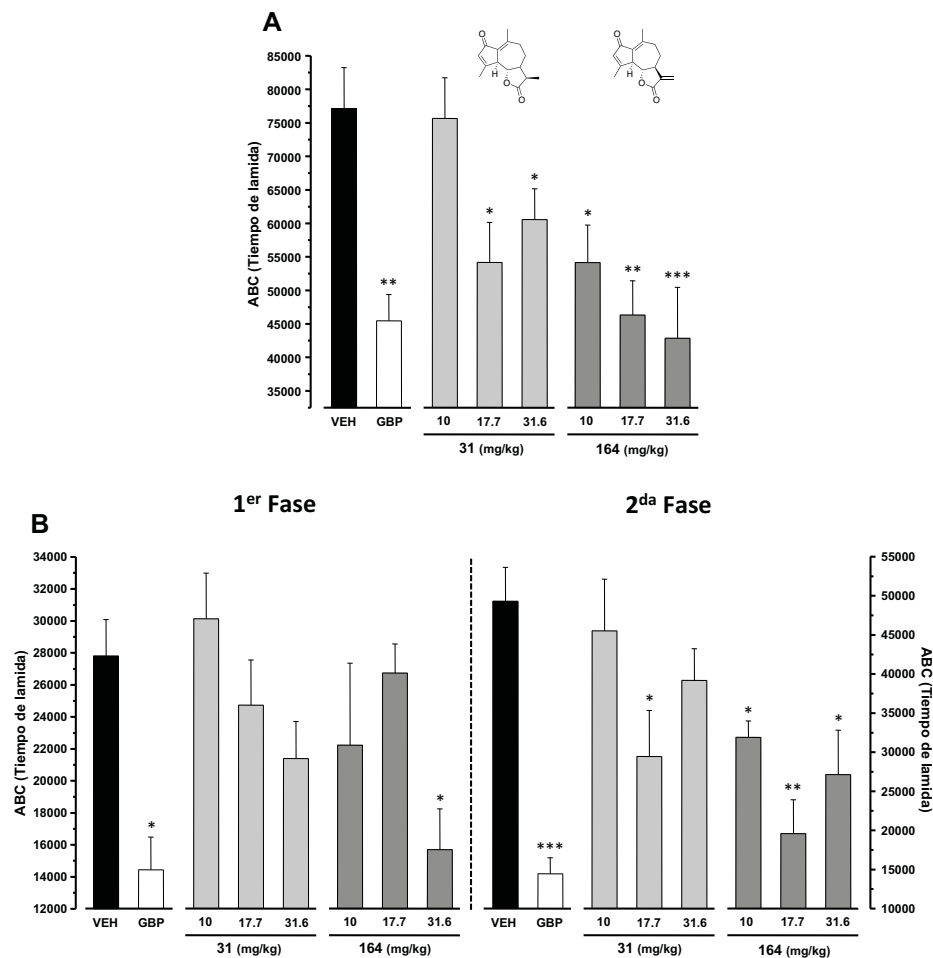


Figura 29. A) Efecto antinociceptivo de la aquilina (**31**) y de la deshidroleucodina (**164**) en la prueba de la formalina. B) Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GBP, gabapentina (31.6 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

3.8. Efecto antiinflamatorio de la aquilina (31) y la dehidroleucodina (164) en la prueba de la carragenina

En el presente estudio también se evaluó el efecto de los compuestos **31** y **164** (17,7 mg/kg) en el modelo de edema inducido por administración de carragenina en la pata de ratones. Como se observa en la **Figura 30**, los dos compuestos inhiben la formación del edema en la pata tratada del ratón durante el transcurso del experimento, es decir provocan un efecto antiinflamatorio significativo en comparación al VEH. El efecto fue muy similar al del DIC.

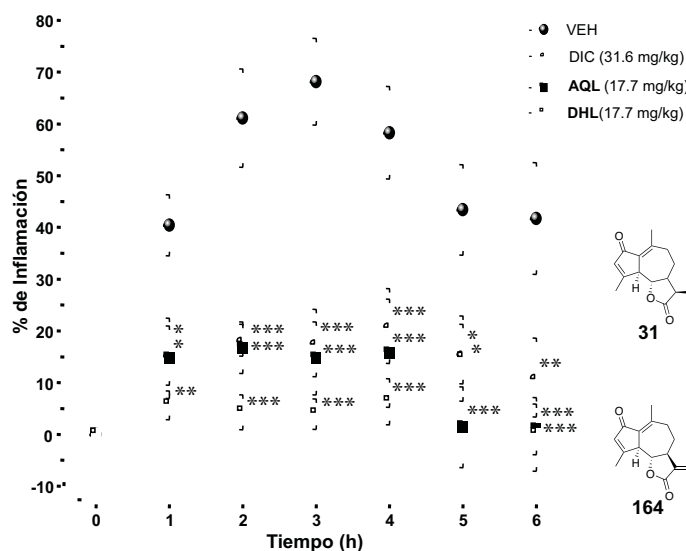


Figura 30. Efecto de la aquilina (**31**) y deshidroleucodina (**164**) sobre la formación de edema inducido por la administración de carragenina en ratones. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); DIC, diclofenaco. Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

Estos resultados son consistentes con el estudio *in vitro* de Castro et al. (2000), quienes demostraron que la dehidroleucodina (**164**, 50 μ M) inhibía la transcripción del factor NF- κ B, que está implicado en la síntesis de mediadores inflamatorios como las citocinas y quimiocinas. Aunque, los efectos de ambos metabolitos secundarios podrían estar mediados por la regulación de otros mediadores inflamatorios como la bradiquinina, la histamina, radicales libres, óxido nítrico y prostaglandinas, entre otros. Diversos estudios indican que numerosas lactonas sesquiterpénicas poseen propiedades antiinflamatorias (Chadwick et al., 2013).

Es importante mencionar que entre los compuestos previamente identificados en la planta algunos poseen propiedades antiinflamatorias. Por ejemplo, Al-harbi y colaboradores (1994) demostraron que la santonina (**21**) tiene efectos antiinflamatorios en diferentes modelos animales. Posteriormente, Clavin y colaboradores (2007) demostraron que la jaceosidina (**64**) reduce la formación de edema en la oreja de rata. *In vitro*, la jaceosidina (**64**), la santamarina (**12**) y la luteolina (**79**) inhiben la actividad de la enzima COX-2 (Moscatelli et al., 2006; Choi et al., 2012; Nepali et al., 2015). Los compuestos **12** y **79** inhiben la transcripción del factor NF-kB (Castro et al., 2000; Nepali et al., 2015). La yomogina (**22**), la eupafolina (**61**) y la tricina (**74**), reducen la producción de ON (Ryu et al., 2000; Maas et al., 2011; Shalini et al., 2012). Los compuestos **12**, **61**, **74**, **79**, naringenina (**62**), campferol (**77**), y la apigenina (**78**) también reducen la concentración de los factores pro-inflamatorios TNF- α , Interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-1 α (Muller et al., 2010; Choi et al., 2012; Maas et al., 2011; Shalini et al., 2012; Al-Rejaie et al., 2015). La axilarina (**71**) y **74** reducen las concentraciones de la prostaglandina E₂ (Moscatelli et al., 2006; Shalini et al., 2012). De estar presente estos compuestos en las recolectas analizadas en este estudio, también contribuirían al efecto antiinflamatorio demostrado.

4. Efecto antihiperalgésico del EA

La neuropatía diabética periférica (NDP) es una de las principales complicaciones de un estado de hiperglucemia crónica. La NDP se caracteriza por un daño en las fibras nerviosas periféricas (Stavniychuk, 2012), lo cual provoca anormalidades sensoriales que incluyen hiperalgnesia y alodinia, (Peltier et al., 2014) y que resultan muy molestas para los pacientes. Con la finalidad de determinar si el EA es también eficaz para mejorar un estado de hiperalgnesia se realizaron una serie de experimentos en ratones hiperglucémicos, mismos que se detallan en los párrafos siguientes.

4.1. Inducción del estado de hiperalgnesia en ratones

Los roedores hiperglucémicos (NA-STZ) pueden desarrollar un estado de hiperalgnesia debido a la hiperactividad de las fibras aferentes A δ y C (Suzuki et al., 2002).

Estas fibras transmiten los estímulos dolorosos al sistema nervioso central, con diferente velocidad de conducción; las primeras están rodeadas con mielina que favorece la transmisión del estímulo. Entonces, en este trabajo los ratones pretratados con NA-STZ desarrollaron primero un estado hiperglucémico, a continuación se trataron con dos concentraciones de formalina (1 o 2%, 30 μ L), y se procedió a cuantificar la respuesta al estímulo nociceptivo en las dos condiciones.

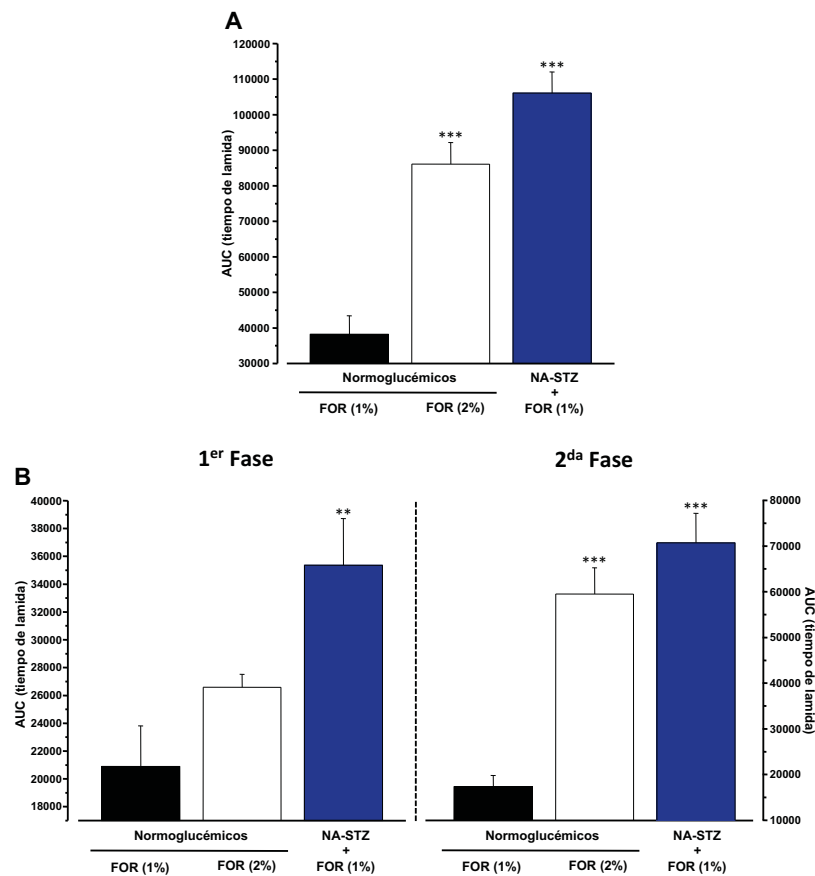


Figura 31. A) Efecto hiperalgésico en ratones detectado mediante la prueba de la formalina tras la administración de NA-STZ. B) Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo de formalina (FOR) al 1%.

Los resultados indicaron que el estado de hiperglucemia genera un estado de hiperalgesia, ya que la administración de la formalina al 1 % (30 μ L) fue suficiente para generar una respuesta nociceptiva, tanto en la primera como en la segunda fase de la prueba. La magnitud de la respuesta nociceptiva fue similar a la que se genera por la administración de formalina al 2% (30 μ L) en ratones sanos (**Figura 31**). Entonces el

tratamiento con NA-STZ reduce el umbral de dolor a la estimulación química con formalina. Este mismo tipo de respuesta se ha observado en trabajos previos con roedores hiperglucémicos (Lee-Kubli, et al., 2014; Ovalle-Magallanes, et al., 2015)

4.2. Efecto antihiperalgésico del EA en ratones NA-STZ en el modelo de la formalina

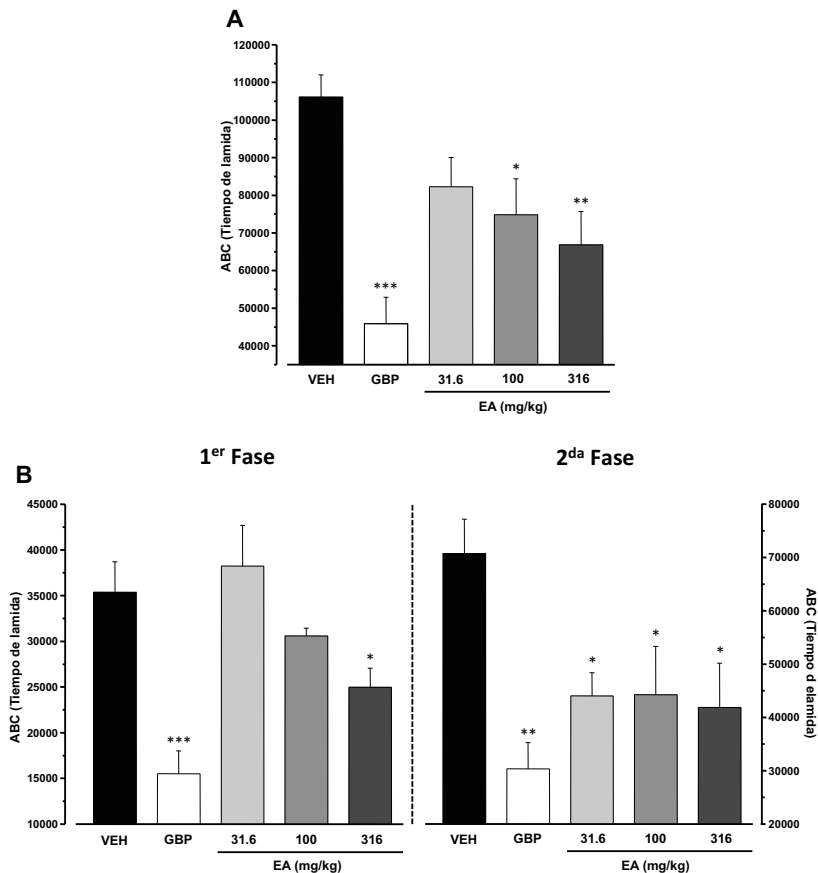


Figura 32. A) Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A.ludoviciana* en ratones hiperglucémicos (NA-STZ) en la prueba de la formalina. B) Tiempo de lamida durante la primera y segunda fase. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MOR, morfina (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, *** $p = 0.001$ en comparación con el grupo VEH.

Una vez establecido el modelo se determinó el efecto antihiperalgésico del EA en ratones hiperglucémicos con hiperalgnesia utilizando la prueba de la formalina. Como se muestra en la **Figura 32**, la administración oral de EA (31,6, 100 y 316 mg/kg) atenuó significativamente el tiempo de lamida en ambas fases. A la dosis de 31,6 y 316 mg/kg el efecto antinociceptivo únicamente se observó en la segunda fase. A la dosis más alta (316

mg/kg) el tiempo de lamida se redujo significativamente en ambas fases, en comparación con el grupo VEH. La misma secuencia de respuesta se observó con la administración del fármaco de referencia GBP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ratones sanos, lo que indica que EA de *A. ludoviciana* tiene efecto antihiperalgésico y actúa tanto a nivel central como periférico en ratones hiperalgésicos.

4.3. Efecto antihiperalgésico del EA en ratones NA-STZ en el modelo de la placa caliente

A continuación, para determinar el efecto a nivel central de EA, los ratones hiperalgésicos fueron sometidos a la prueba de la placa caliente utilizando el mismo esquema de dosis anterior. El EA, a las dosis de 100 y 316 mg/kg, aumentó significativamente el tiempo de respuesta al estímulo térmico en comparación con el grupo VEH (**Figura 33**). Estos resultados sugieren que el EA posee un efecto antihiperalgésico posiblemente regulado por las aferencias y eferencias del sistema nervioso, a través de una reducción en la integración de la respuesta en la hasta dorsal de la médula espinal o en los niveles supraespinales. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis. Para este estudio, la morfina (MOR, 5 mg/kg) se utilizó como control positivo.

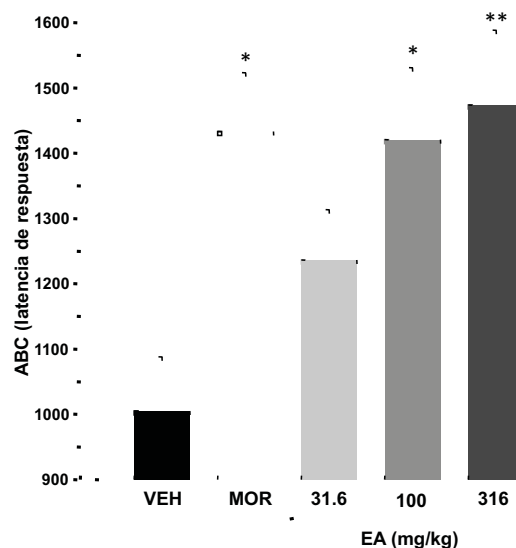


Figura 33. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (EA) de *A. ludoviciana* en ratones hiperglucémicos en el modelo de la placa caliente. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MOR, morfina (5 mg/kg). Cada valor es la media \pm el error estándar, $n = 6$, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, en comparación con el grupo VEH.

5. Establecimiento del perfil cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLUE-EM)

Una de las características de los extractos de plantas medicinales es la complejidad química que presentan, representando esto un importante reto para su análisis; con la finalidad de solucionar este problema se aplican diversas técnicas con las que es posible obtener una buena separación, entre las más utilizadas se encuentra la CLUE que tiene la ventaja de minimizar los tiempos de análisis. Mediante este proceso se pueden determinar huellas digitales de extractos de complejidad variada. Las huellas digitales obtenidas por CLUE constituyen uno de los métodos más efectivos para prevenir sustituciones y adulteraciones (Xie et al, 2007).

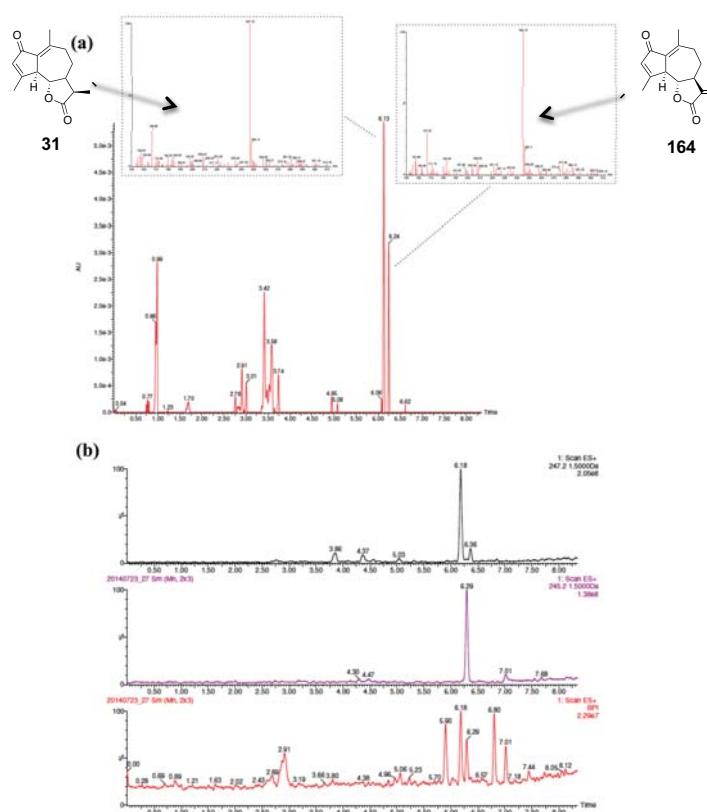


Figura 34. A) Perfil cromatográfico mediante CLUE de la fracción de AcOEt de la infusión de *A. ludoviciana*. B) Cromatograma de la fracción de AcOEt generado por EM mediante la técnica de ionización por electrospray en modo positivo.

Para el desarrollo de huellas digitales es necesaria la elección de los compuestos marcadores, en este caso se seleccionaron a las lactonas sesquiterpénicas aquilina (**31**) y dehidroleucodina (**164**) ya que se obtuvieron en buenas cantidades. También es necesario desarrollar las mejores condiciones de análisis. Así, tras ensayar diferentes tipos de fases estacionarias y móviles las mejores condiciones se obtuvieron mediante una columna de fase reversa C18, un gradiente de elución lineal utilizando una mezcla de ACN-H₂O (0.1% ácido fórmico; FA) y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min.

Una vez que se generó el perfil más adecuado (**Figura 34**) se determinó la presencia de las lactonas **31** y **164** por la técnica de co-elución. En ambos casos la co-elución produjo un incremento en las áreas bajo la curva de los picos correspondientes a cada compuesto.

6. Validación de un método analítico por CLUE-EM para cuantificar a las lactonas 31 y 164 en la droga cruda de *A. ludoviciana*.

En este caso la validación de un método analítico por CLUE-EM se orientó a la cuantificación simultánea las lactonas **31** y **164** en la fracción orgánica de la infusión (AcOEt) preparada a partir de la droga cruda de *A. ludoviciana*.

La validación del método de análisis se realizó evaluando una serie de características que incluyen la linealidad del sistema, exactitud, precisión y límites de cuantificación de acuerdo a los parámetros establecidos en la Guías de Validación publicadas por la FDA [ICH Q2 (R1), 2005].

6.1. Linealidad del sistema

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra; esto dentro de un rango dado, es decir en un intervalo de concentraciones de analito en la muestra para las que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. Para comprobar la linealidad de la curva de calibración del método se obtienen los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2). La adecuación de la curva de calibración debe ser confirmada por pruebas estadísticas como ANOVA y prueba de F (ICH Q2 (R1), 2005).

La linealidad del sistema se evaluó, construyendo una curva de calibración para cada estándar con diferentes niveles de concentración de aquilina (**31**) y dehidroleucodina (**164**). Los compuestos utilizados como referencia tienen una pureza mayor al 95%. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple, permitiendo establecer la linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones analizadas; los parámetros estadísticos calculados se resumen en la **Tabla 6**.

6.2. Linealidad y exactitud del método

Con la finalidad de evaluar si el método analítico propuesto es lineal para el rango de concentraciones establecido, se cuantificó el porcentaje de recobro de los analitos **31** y **164**. Para ello se construyeron curvas de calibración a partir de disoluciones de la matriz enriquecidas con una muestra de referencia utilizando tres niveles de concentración. Las cantidades adicionadas a la matriz en el caso del compuesto **31** estuvieron en el rango entre 5 y 160 $\mu\text{g/mL}$ y para el compuesto **164**, entre 10 y 200 $\mu\text{g/mL}$. En la **Tabla 6** se resumen los resultados obtenidos.

El método analítico propuesto cumple con los criterios de aceptación establecidos en las guías normativas seleccionadas para este estudio, por lo que se puede concluir que el método analítico es lineal (ICH Q2 (R1), 2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se estableció mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las **Tabla 6**. Los resultados obtenidos para ambos compuestos se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%), el intervalo calculado para el compuesto **31** fue de 98.6-99.2 % y para el **164** de 100.2-100.9%, por lo que el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas.

6.3. Precisión del método

La precisión de un procedimiento analítico se refiere a la concordancia entre una serie de medidas individuales obtenidas de una muestra homogénea bajo las mismas

condiciones de análisis. La precisión se debe calcular considerando la dispersión de los datos individuales con respecto a la media y se expresa como desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

La precisión se determinó en términos de repetitividad y precisión intermedia. La repetitividad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (ICH Q2 (R1), 2005).

La repetitividad (repetibilidad) y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de siete réplicas a una concentración definida. El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos (**Tabla 6**) se expresan en términos del coeficiente de variación (%RSD).

Tabla 6. Parámetros de validación de la fracción de AcOEt de la infusión de las partes aéreas de *A. ludoviciana*.

| Parámetro | Modo de detección (ESI positivo) | |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | Aquilina (31) | Dehidroleucodina (164) |
| Rango de linealidad (µg/mL) | 5 – 200 | 5 – 200 |
| Ecuación de regresión | $y = 2277080.23x + 179262005$ | $y = 746777.24x + 45382224.6$ |
| R^2 | 0.998 | 0.995 |
| LD (µg/mL) | 1.18 | 2.19 |
| LC (µg/mL) | 3.59 | 6.65 |
| Recobro (%) | 98.6 – 99.2 | 100.2 – 100.9 |
| Exactitud | $y = 0.9912x + 0.1381$ | $y = 1.009x + 0.1527$ |
| R^2 | 0.9999 | 0.9999 |
| Precisión (%RSD) | 0.62 | 2.6 |

6.4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

El límite de detección (LD) de un método está definido como la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se refiere a la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables. Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de las rectas de calibración. En la **Tabla 6** se muestran los resultados del análisis.

6.5. Cuantificación de los compuestos **31** y **164** presentes en la fracción de AcOEt

Una vez validado el método analítico se cuantificaron ambos compuestos en distintas muestras preparadas de forma independiente de la fracción de AcOEt de la infusión de *A. ludoviciana* con una concentración de 1 mg/mL. Se emplearon las ecuaciones de la recta descritas para la linealidad del sistema, **31** ($y = 2277080.23x + 179262005$) y **164** ($y = 746777.24 x + 43382224.6$). Los resultados obtenidos permitieron establecer que las muestras analizadas contienen 108.6 mg/g y 68.0 mg/g de aquilina (**31**) y dehidroleucodina (**164**), respectivamente.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Los preparados (EA y AE) de *A. ludoviciana* ejercen un efecto hipoglucemiante, antihiper glucémico, antinociceptivo, antiinflamatorio y antihiperalgésico en ratones. Estas propiedades farmacológicas correlacionan con los usos populares de la especie para el “tratamiento de la diabetes y el dolor”. Evidentemente es necesario la realización de estudios clínicos para comprobar inequívocamente estos efectos. Así los estudios aquí presentados bien constituyen las bases preclínicas para futuras investigaciones.
- ❖ El estudio químico de la infusión permitió el aislamiento e identificación de siete metabolitos secundarios, incluyendo las flavonas eupatilina (**63**) y jaceosidina (**64**), tres lactonas sesquiterpénicas [arglanina (**8**), aquilina (**31**) y dehidroleucodina (**164**)], la salvinina (**166**) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico (**165**). Los compuestos se caracterizaron por los métodos convencionales.
- ❖ La eupatilina (**63**), arglanina (**8**) y aquilina (**31**) presentaron un importante efecto hipoglucemiante en ratones sanos e hiper glucémicos. El mecanismo de acción del efecto hipoglucemiante de **63** y **8** parece estar relacionado con la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. En el caso de la arglanina (**8**), su efecto podría estar mediado por el cierre de los canales de K^+ /ATP, con el consiguiente incremento en la liberación de insulina.
- ❖ La salvinina (**166**) y la dehidroleucodina (**164**) son inhibidores de la enzima α -GL. Los estudios de cinética enzimática con **166** indicaron que es un inhibidor de tipo mixto. El efecto inhibitorio de las enzimas α -Gs de la dehidroleucodina (**164**) se comprobó *in vivo* mediante una POTS.

- ❖ La administración de EA en ratas mejoró algunos parámetros del síndrome metabólico, debido a la disminución de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, ácido úrico, peso corporal y grasa abdominal, y a un incremento en los niveles de insulina.

- ❖ La presencia en el EA de compuestos con diferentes blancos de acción (Polivalencia) pueden conferir al preparado una mayor eficacia terapéutica ya que puede mejorar tanto una hiperglucemia posprandial como una en ayunas.

- ❖ El AE provoca un efecto antinociceptivo mediante la modulación agonista del sistema opioide. El EA posee efectos antinociceptivo, antihiperalgésico y antiinflamatorio. La aquilina (**31**) y la dehidroleucodina (**164**) presentaron un efecto antiinflamatorio importante en la segunda fase de la prueba de la formalina.

- ❖ Se desarrollo y valido un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas que permite cuantificar simultáneamente los compuestos **31** y **164**. Este método es necesario para el control de calidad de la especie en estudio y para el desarrollo de preparados estandarizados para realizar los estudios clínicos pertinentes. El método fue lineal, preciso y exacto.

- ❖ De manera global, estos resultados contribuyen a propiciar el uso racional del estafiate en las prácticas médicas populares de México.

IX. PERSPECTIVAS

- ❖ Obtener los metabolitos minoritarios de la infusión.

- ❖ Establecer mediante el análisis de los perfiles cromatográficos las variaciones intra-específicas de los principales metabolitos secundarios de la especie en estudio.

- ❖ Identificar las mejores condiciones de producción de los compuestos activos e importantes desde el punto de vista farmacológico en función del ciclo fenológico de la especie *A. ludoviciana*.

- ❖ Continuar con los estudios del mecanismo de acción antihiper glucémico, hipoglucemiante, antinociceptivo y antihiperalgésico de los metabolitos activos.

- ❖ Proponer al personal médico especializado la realización de estudios clínicos necesario para validar a nivel clínico los usos populares que se le atribuyen a la especie como agente sobre los niveles de glucosa en sangre y como analgésico.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ADA (American Diabetes Association), 2015. Standards of Medical Care in Diabetes – 2015. *Diabetes Care*. 38, S1–S94.
- Aguilar, C.A., Xolalpa, M.S., 2002. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia*. 53, 24–35.
- Al-Harbi, M.M., Qureshi, S., Ahmed, M.M., Raza, M., Miana, G.A., Shah, A.H., 1994. Studies on the Antiinflammatory, Antipyretic and Analgesic Activities of Santonin. *Jpn. J. Pharmacol.* 64, 135–139.
- Al-Rejaie, S.S., Aleisa, A.M., Abuhashish, H.M., Parmar, M.Y., Al-Hosaini, A.A., Ahmed, M.M., 2015. Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy. *Neurol. Res.* 10, 924–933.
- Al-Waili, N.S., 1986. Treatment of diabetes mellitus by *Artemisia herba-alba* extract: preliminary study. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13, 569–573.
- Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J., Ceballos, G.M., 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 100, 153–157.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutiérrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.* 61, 101–110.
- Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., Zapata-Morales, J.R., Carranza-Álvarez, C., 2005. Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *J. Ethnopharmacol.* 175, 335–345.
- Altagracia-Martínez, M., Kravzov-Jinich, J., Moreno-Santamaría, M., Del R., Rubio-Poo, C., Skromne-Kadlubik, D., Rivas-Cornejo, M. S., Vázquez-Moreno, E., 2007. Diabetes mellitus tipo 2: venta de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 38, 23–33.
- Altamirano, F., 1904. *Materia medica mexicana: a manual of mexican medicinal herbs*. St. Louis, Missouri : Mexican National Commission. 78 p.
- Amo, R. S., del., 1979. *Plantas medicinales del estado de Veracruz. Xalapa (Veracruz)*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
- Anaya-Eugenio, G.D., 2012. *Potencial Antidiabético de preparados de Artemisia ludoviciana Nutt. (Asteraceae) México, Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas)-UNAM, Facultad de Ciencias*.
- Andrade-Cetto, A., 2010. “Mexican plants traditionally used from the treatment of type 2 diabetes,” en *Advances in Obesity-Diabetes research at UNAM*, eds M. Hiriart y J. Mas Oliva (México: Editorial; El Manual Moderno), 191–200.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348.
- Ang, S.H., Thevarajah, M., Alias, Y., Khor, S.M., 2015. Current aspects in hemoglobin A1c detection: A review. *Clin. Chim. Acta.* 439, 202–211.
- Anon., 1979. Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. Antimalarial studies on qinghaosu. *Chin. Med. J.* 92, 811–816.
- Anon., 1982. China Cooperative Group on Qinghaosu and its derivatives as Antimalarials. Chemical studies on qinghaosu (Artemisinin). *J. Tradit. Chin. Med.* 2, 3–8.
- Argueta, V.A., Cano, A.L.M., Rodarte, M.E., 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. tomo II. México D. F. Instituto Nacional Indigenista. pp 628–630*.
- Armendáris, E., 1897. Informe de los trabajos realizados en el mes de enero de 1897. *Anales del Instituto Médico*

- Nacional. Tomo III. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.
- Ayala, E.J., Samuel, V.T., Morton, G.J., Obici, S., Collen, M., Croniger, G.I., Wasserman, D.H., McGuinness, O., 2010. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis. Model. Mech.* 3, 525–534.
- Babu, P.V.A., Liu, D., Gilbert, E.R., 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1777–1789.
- Balderas, J.L., 2006. Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y evaluaciones biológicas preliminares. México, Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Químicas)-UNAM, Facultad de Química.
- Baumgard, L.H., Hausman, G.J., Sanz-Fernandez, M.V. 2016. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest. Anim. Endocrin.* 54, 76–84.
- Belenovskaja, L., 1996. *Artemisia*: the flavonoids and their systematic value. In D. J. N. Hind y H. J. Beentje (eds.), *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Chemotaxonomy.* 1, 253–259.
- Bergman, M., 2013. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 43, 504–513.
- Besser, W.S., 1829. Synopsis Absinthiorum. *Bull. Soc. Imp. Natl. Mosc.* 1, 219–265.
- Blust, H.M., Hopkins, T.L., 1987. Gustatory responses of a specialist and a generalist grasshopper to terpenoids of *Artemisia ludoviciana*. *Entomol. Exp. Appl.* 45, 37–46.
- Bora, S.K., Sharma, A., 2010. The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharm. Biol.* 1–9.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M., 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor κ B (NF- κ B). *FEBS Letters.* 402, 85–90.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Weimann, C., Kist, M., Heinrich, M., 1996. Nahua Indian medicinal plants (México): inhibitory activity of NF- κ B as an antiinflammatory model and antibacterial effects. *Phytomedicine.* 3, 263–69.
- Bösenberg, L.H., Van Zyl, D.G., 2008. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *JEMDSA.* 13, 80–88.
- Bower, A.M., Real, H.L.M., Berhows, M.A., Gonzalez, de M.E., 2014. Bioactive Compounds from Culinary Herbs Inhibit a Molecular Target for Type 2 Diabetes Management, Dipeptidyl Peptidase IV. *J. Agr. Food Chem.* 62, 6147–6158.
- Brietze, S.A., 2015. Oral Antihyperglycemic Treatment Options for Type 2 Diabetes Mellitus. *Med. Clin. N. Am.* 99, 87–106.
- Bye, R., 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tharahumara and Mexican market plants. *Econ. Bot.* 40: 103-124.
- Cabrera, L.G., 1958. Plantas curativas de México : Propiedades medicinales de las más conocidas plantas de México, su aplicación correcta y eficaz. Ed. cicerón, México. D. F.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Aguilar, A., 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 108, 367–370.
- Campbell, J.E., Drucker, D.J., 2013. Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism.* 17, 1–19.
- Castanedo, J.A., 1906. Informe de los trabajos realizados en el mes de junio de 1906. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VIII. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.

- Castanedo, J.A., 1908. Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1908. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo X. Tipografía la Universal de Taladrid, Blanco y comp. México.
- Castelo, E., Ricalde, O., Panero, J., 2003-2005. Catálogo de Autoridades de Asteráceas Mexicanas y Actualización de tribus Heliantheae y Eupatorieae. University of Texas. Base de datos SNIB-CONABIO proyectos V004, AE012 y CS011. México, D.F. p. 3 (250 p.)
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122, 402–405.
- Castro, V., Murillo, R., Klaas, C.A., Meunier, C., Mora, G., Pahl, H.L., Merfort, I., 2000. Inhibition of the transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones from *Podachaenium eminens*. *Planta Med.* 66, 591–591.
- Cervantes, V., 1889. Ensayo a la materia médico-vegetal de México. Estudio. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.
- Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., Wagsff, C., 2013. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12780–12805.
- Cheng-Bi, C., Jeong, S.K., Lee, Y.S., Lee, S.O., Kang, I.J., Lim, S.S., 2009. Inhibitory activity of caffeoylquinic acids from the aerial parts of *Artemisia princeps* on rat lens aldose reductase and on the formation of advanced glycation end products. *J. Korean Soc. Appl. Bi.* 52(6), 655–662.
- Cheng, A.Y., Fantus, G., 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ.* 172, 213–226.
- Choi, H-G., Lee, D-S., Li, B., Choi, Y.H., Lee, S-H., Kim, Y-C., 2012. Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells. *Int. Immunopharmacol.* 13, 271–279.
- Cifci, G., Aviyente, V., Akten, E.D., 2012. Molecular docking study base don pharmacophore modeling for novel phosphodiesterase IV inhibitors. *Mol. Inf.* 31, 459–471.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V., 2007. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J. Ethnopharmacol.* 112, 585–589.
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, second ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Damian, B.L.M., Martínez, M.R.E., Salgado, G.R., Martínez, P.M.M., 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. *BLACPMA.* 9, 136–142.
- De la Cal, A., Bracho, A., 1832. Ensayo para la Materia Médica Mexicana. Oficina del Hospital de San Pedro, Academia Médico-Quirúrgica. Puebla, 101 p.
- De la Cruz, M., 1991. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*: Manuscrito Azteca de 1552 según traducción latina de Juan Badiano. Editorial Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México. 258 pp.
- Deacon, C.F., Nauck, M.A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., Holst, J.J., 1995. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* 44, 1126–1131.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, J.J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I., Simonson, D.C., Testa, M.A., Weiss, R., 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Rev.* 1, 1-21.
- Domínguez, X.A., Cárdenas, E., 1975. Achillin y deacetylmatricarin from two *Artemisa* species. *Phytochemistry.* 14, 2511–2512.
- Dubal, Z.B., Avasthe, R.K., Haque, N., Toppo, S., Murugkar, H.V., Barbuddhe, S.B., 2009. Efficacy of medicinal plant extracts and antimicrobials on different serotypes of *Escherichia coli*. *Indian J. Anim. Sci.* 79, 15–18.

- Dunham, N.W., Myia, T.S., 1957. A note an simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. J. Am. Pharm. Assoc. 46, 208–209.
- El-Bassossy, M.H., Dsokey, N., Fahmy, A., 2014. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic síndrome. Toxicol Mech Methods. 2014, 1–8.
- Epstein, W.W., Jenkins, E.E.U., 1979. Anthemidin, a new sesquiterpene lactone from *Artemisia ludoviciana*. J. Nat. Prod. 42, 279–81.
- Esteyneffer, J. de., 1978. Florilegio medicinal/Juan de Esteyneffer ; ed., estudio preliminar, notas, glosario e índice analítico, Ma. del Carmen Anzures y Bolaños. México: Academia Nacional de Medicina. 520 pp.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Rencillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo- España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Vargas, M., 2012. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. J. Ethnopharmacol. 139, 513–518.
- Eun-Kyung, K., Kwon, K.B., Han, M.J., Song, M.Y., Lee, J.H., Lv, N., Choi, K.B., Ryu, D.G., Kim, K.S., Park, J.W., Park, B.H., 2007. Inhibitory effect of *Artemisia capillaris* extract on cytokine-induced nitric oxide formation and cytotoxicity of RINm5F cells. Int. J. Mol. Med. 19: 535-540.
- Eunkyo, P., Byoung-Mog, K., In-Kyung, J., Jung-Hyun, K., 2014. Hypoglycemic and antioxidant effects of jaceosidin in streptozotocin-induced diabetic mice. J. Nutr. Health. 47, 313–320.
- Farhad, K., Shahla, Z., Hossein, K.J., Sara, A., Mohammad, F., Saeid, M., 2013. Stereological and histopathological study of ovarian tissue after hydro-alcoholic extract of *Artemisia* plants compared with metformin in diabetic rats. Adv. Environ. Biol. 7 (4), 749–754.
- Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U., Perfetti, R., 2002. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. Endocrinology. 143, 4397–4408.
- Fernández, S.S., Ramos, G.C., Mata, C.D.B., Villarreal, V.J., Treviño, V.L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. Fitoterapia. 76, 466–468.
- Ferreira de Moura, R., Ribeiro, C., Aparecida de Oliveira, J., Stevanato, E., Rostom de Mello, M.A., 2009. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. Br. J. Nutr. 101, 1178–1184.
- Flores, T.F. de A., 1982. Historia de la medicina en México desde la época de los indios hasta la presente. México: IMSS.
- García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C., Heredia, N., 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. World J. Microb. Biot. 22, 669–674.
- Garg, S., Rosenstock, J., Silverman, B.L., Sun, B., 2006. Efficacy and safety of preprandial human insulin inhalation powder versus injectable insulin in patients with type 1 diabetes. Diabetologia. 49, 891–899.
- Gautier, J.F., Fetita, S., Sobngwi, E., Salaün-Martin C., 2005. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab. 31, 233–242.
- Geissman, T.A., Saitoh, T., 1971. Ludalbin, a new lactone from *Artemisia ludoviciana*. Phytochemistry. 11, 1157–1160.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2005. Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Med.* 71, 1099–1105.
- Guerrero-Analco, J.A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. Phytochemistry. 68, 2087–2095.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M., Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
- Hamza, N., Berke, B., Cheze C., Agli, AN., Robinson, P., Gin, H., Moore, N., 2010. Treatment of high fat diet induced

- type 2 diabetes in C57BL/6J mice by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *J. Ethnopharmacol.* 133(2), 931–3.
- Hansen, M., Sonne, D.P., Knop, F.K., 2014. Bile Acid Sequestrants: Glucose-Lowering Mechanisms and Efficacy in Type 2 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 482, 1–9.
- Hayat, Q.M., Ashraf, M., Khan, A.M., Mahmood, T., Ahmad, M., Jabeen, S., 2009. Phylogeny of *Artemisia* L.: Recent developments. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 2423–2428.
- Headrick, J.P., See-Hoe, L.E., Du-Toit, E.F., Peart, J. 2015. Opioid receptors and cardioprotection—‘opioidergic conditioning’ of the heart. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2026–2050.
- Heinrich, M., 2002. Etnobotany, phytochemistry and biological/pharmacological activities of *Artemisia ludoviciana* ssp. En: Colin, W.W. (Ed.) *Mexicana. Artemisia* (Estafiate). Taylor and Francis Inc., New York, NY, pp. 107–111.
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J.P., Reynoso-Noverón, N., 2013. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México.* 55, suppl. 2. S129-S136.
- Hernández, F., 1959. *Historia Natural de Nueva España/traducción de José Rojo Navarro.* México: Universidad Nacional Autónoma de México. Libro 2. 291 pp.
- Herrera, A.L., 1921. *Farmacopea latino-americana.* Herrero Hermanos Suc. México. 805 pp.
- Holman, R. 2007. Metformin as first choice in oral diabetes treatment: the UKPDS experience. *Journ. Annu. Diabetol. Hotel Dieu.* 2007, 13–20.
- Hui-Yuan, G., Di, W., Chuan, L., Xiao-Min, X., Jian, H., Bo-Hang, S., Li-Jun, W., 2010. Constituents from the testas of *Castanea mollissima* Blume with α -glucosidase inhibitory activity. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12, 144–149.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Hyun, J.Ah, Park, J.J., Islam, M.N., Jin, S.E., Min, B.S., Lee, J.H., Sohn, H.S., Choi, J.S., 2012. Inhibitory activity of coumarins from *Artemisia capillaris* against advanced glycation end product formation. *Arch. Pharmacol. Res.* 35(6), 1021–1035.
- ICH. Text on Validation of Analytical Procedures. Harmonized Tripartite Guideline [Q2(R1)]. International Conference on Harmonization: Geneva; 1–13.
http://www.ich.org/fileadmin/public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (accesado en Julio 2015).
- IDF (International Diabetes federation), 2015. *Atlas de la Diabetes de la IDF.* Sexta edición.
- Islam Md. S., Loots, D.T., 2009. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 31 (3).
- Islam Md. S., Wilson, R.D., 2012. Experimentally induced rodent models of Type 2 diabetes. En: Hans-Georg Joost et al. (eds.), *Animal Models in Diabetes Research, Methods in Molecular Biology*, vol. 933, capítulo 10.
- Islam, N.Md., Jung, H.A., Sohn, H.S., Kim, H.M., Choi, J.S., 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Arch.f Pharmacol Res.* 36, 542–552.
- Jakupovic, J., Tan, R.X., Bohmann, F., Boldt, P.E., Jla, Z.J., 1991. Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*. *Phytochemistry.* 30, 1573–1577.
- Ji-Young, C., Shin, S.K., Jeon, S.M., Baek, N.I., Chung, H.G., Jeong, T.S., Lee, K.T., Lee, M.K., Choi, M.S., 2011. Dose-response study of sajabalssuk ethanol extract from *Artemisia princeps* Pampanini on blood glucose in subjects with impaired fasting glucose or mild type 2 diabetes. *J. Med. Food.* 14(1-2), 101–107.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J., 2003. Activity against multidrug-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother. Res.* 17, 903–908.
- Jiménez, M.F.A., 2011. *Herbolaria mexicana*. Editorial Colegio de Posgraduados. México. 186.
- Johnson, S.T., Lynch, B., Vallance, J., Davenport, M.H., Gardiner, P.A., Butalia, S., 2106. Sedentary behavior, gestational diabetes mellitus, and type 2 diabetes risk: where do we stand?. *Endocrine.* 52, 5–10.
- Juárez-Flores, B.I., Jasso-Pineda, Y., Aguirre-Rivera, J.R., Jasso-Pineda, I., 2010. Efecto de polvos de asteráceas sobre el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Mostch). *Polibotánica.* 30, 123–135.
- Juarez, D.T., Demaris, K.M., Goo, R., Mnatzaganian, C.L., Smith, H.W., 2014. Significance of HbA1c and its measurement in the diagnosis of diabetes mellitus: US experience. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 7, 487–494.
- Juillerat-Jeanerret, L., 2014. Dipeptidyl Peptidase IV and Its Inhibitors: Therapeutics for Type 2 Diabetes and What Else?. *J. Med. Chem.* 57, 2197–2212.
- Jung, J.U., Baek, N.I., Chung, H.G., Bang, M.H., Yoo, J.S., Jeong, T.S., Lee, K.T., Kang, Y.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Yeo, J.Y., Choi, M.S., 2007. The anti-diabetic effects of ethanol extract from two variants of *Artemisia princeps* Pampanini in C57BL/KsJ-db/db mice. *Food. Chem. Toxicol.* 45(10), 2022–2029.
- Jung, U.J., Baek, N.I., Chung, H.G., Jeong, T.S., Lee, K.T., Lee, M.K., Choi, M.S., 2009. Antilipogenic and hypolipidemic effects of ethanol extracts from two variants of *Artemisia princeps* Pampanini in obese diabetic mice. *J. Med. Food.* 12 (6), 1238–1244.
- Kang, Y.J., Jung, U.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Jeon, S.M., Park, Y.B., Chung, H.G., Baek, N.I., Lee, K.T., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2008. Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 82, 25–32.
- Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014, 1–21.
- Kaur, R., Afzal, M., Kazmi, I., Ahamd, I., Ahmed, Z., Ali, B., Ahmad, S., Anwar, F., 2013. Polypharmacy (herbal and synthetic drug combination): a novel approach in the treatment of type-2 diabetes and its complications in rats. *J. Nat. Med.* 67, 662–671.
- Kennedy, A.J., Ellacott, K.L.J., King, V.L., Hasty, A.H. 2010. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 3, 156–166.
- Kieffer, T.J., McIntosh, C.H., Pederson, R.A., 1995. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 136, 3585–3596.
- Kleingenger, J.W., Pollin, T.I., 2015. Undiagnosed MODY: Time for Action. *Curr. Diab. Rep.* 15: 110.
- Lalau, J-D., Arnouts, P., Sharif, A., De Broe, M.E., 2014. Metformin and other antidiabetic agents in renal failure patients. *Kidney Int.* 87, 308–322.
- Lanier, D., 1995. *Absinthe, the cocaine of the nineteenth century*. McFarland and company. 187 pp.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Lee-Kubli, C.A., Mixcoatl-Zecuatl, T., Jolival, C.G., Calcutt, N.A., 2014. Animals models of diabetes-induced neuropathic pain. *Curr. Topics. Behav. Neurosci.* 20: 147–170. En *Behavioral neurobiology of chronic pain*. Ed. Springer. Vol. 20.
- Lee, K.H., Geissman, T.A., 1970. Sesquiterpene lactone of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana* ssp. mexicana. *Phymchemistry.* 9, 403–408.
- Leslie, R.D., Palmer, J., Schloot, N.C., Lernmark, A., 2016. Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia.* 59, 13–20.
- Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J., De Kimpe, N., 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system

- for therapy of diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 92, 1–21.
- Liu, Qing., Yang, Q.-M., Hu, H.J., Yang, L., Yang, Y.-B., Chou, G.-X., Wang, Z.-T., 2014. Bioactive Diterpenoids and Flavonoids from the Aerial Parts of *Scoparia dulcis*. *J. Nat. Prod.* 77, 1594–1600.
- Liu, Y.-L., Mabry, T.J., 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry.* 21, 209–214.
- Lopes-Lutz, D., McKay, T., Kolodziejczyk, P.P., 2008. Distribution of volatiles in *Artemisia cana*. *Pharm. Biol.* 46, 373–376.
- Maas, M., Deters, A.M., Hensel, A., 2011. Anti-inflammatory activity of *Eupatorium perfoliatum* L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines. *J. Ethnopharmacol.* 137, 371–381.
- Madeswaran, A., Asokkumar, K., Umamaheswari, M., Sivashanmugam, Subhadradevi, V., Jagannath, P., 2014. Computational drug design of potential α -amylase inhibitors using some commercially available flavonoids. *Bangladesh J. Pharmacol.* 9, 72–76.
- Malagon, F., Vázquez, J., Delgado, G., Ruiz, A., 1997. Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in a rodent malaria model. *Parassitologia.* 39, 3–7.
- Manjarrez, A., Medina, F., 1964. The analysis of the volatile oils of the leaves of *Artemisia mexicana* and *Artemisia klotzchiana*. *Can. J. Chem.* 42, 2085–2088.
- Martínez-Rojas, V.A., Barragán-Iglesias, P., Rocha-González, H.I., Murbartán, J., Granados-Soto, V., 2014. Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacol. Rep.* 66, 964–971.
- Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres científicos y vulgares de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México, D.F. 1242 p.
- Martínez, M., 1992. Las Plantas Medicinales de México. 6ta edición, Botas, México. pp 133–135.
- Martínez, V. M., Muñoz-Zamora, A., 1988. Conformational analysis of achillin and leukodin. *J. Nat. Prod.* 51, 221–228.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases. *J. Nat. Prod.* 76, 468–483.
- Mata, R., Delgado, G., Romo del Vivar, A., 1984. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry.* 23, 1665–1668.
- McVaugh, R., 1984. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western México. Vol. 12. Compositae. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. 467 pp.
- Mendoza, C.G., García, P.J., Estrada, L.E., 1997. Catalogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el Mercado de Sonora. Materiales para la docencia, No 2. Chapingo, México. 135 p.
- Miño, J., Moscatelli, V., Hnatyszyn, O., Gorzalczany, S., Acevedo, C., Ferraro, G., 2003. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. *Pharmacol. Res.* 50, 59–63.
- Molina-Salinas, G.M., Ramos-Guerra, M.C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B.D., Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S., 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.* 37, 45–49.
- Morris, C.J., Ferreira, S.H., Vane, J.R. 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 225, 115–121.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662.
- Morton, J. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas of Yucatan. C. Thomas Springfield (IL).

- Moscатели, V., Hnatyszyn, O., Acevedo, C., Megías, J., Alcaraz, M.J., Ferraro, G., 2006. Flavonoids from *Artemisia copa* with Inflammatory Activity. *Planta Med.* 72, 72–74.
- Mossa, J.S., 1985. A study on the crude antidiabetic drugs used in Arabian folk medicine. *Int. J. Crud. Drug. Res.* 23: 137–145.
- Muhammad, Q.H., Muhammad, A., Mir, A.K., Ghazalah, Y., Nihat, S., Shazia, J., 2010. Palynological study of the Genus *Artemisia* (Asteraceae) and its Systematic Implications. *Pakistan J. Bot.* 2, 751–763.
- Mukherjee, P.K., Maiti, K., Mukherjee, K., Houghton, P.J., 2006. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J. Ethnopharmacol.* 106,1–28.
- Muller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A., 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem.* 122, 987–996.
- Muoio, D.M., Newgard, C.B., 2008. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Mol. Cell Biol.* 9, 193–205.
- Nakamura, T., Terajima, T., Ogata, T., Ueno, K., Hashimoto, N., Ono, K., Yano, S., 2006. Establishment and pathophysiological characterization of Type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1167–1174.
- Navarro, V., Villareal, M., Rojas, G., Lozoya, X., 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious disease. *J. Ethnopharmacol.* 53, 143–147.
- Nepali, S., Son, J.S., Poudel, B., Lee, J.H., Lee, Y.M., Kim, D.K. Luteolin is a bioflavonoid that attenuates adipocyte-derived inflammatory responses via suppression of nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinases. *Pharmacogn. Mag.* 43, 627–635.
- Nicholson, G., Hall, G.M., 2011. Diabetes mellitus: new drugs for a new epidemic. *Brit. J. Anaesth.* 107, 65–73.
- Ohno, N., Gershenzon, J., Roane, C., Mabry, T.J., 1980. 11, 13- Dehydrodesacetylmatricarin and other sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana* and the identity of artemicanin and chrysartemin B. *Phytochemistry.* 19, 103–106.
- Okada, Y., Miyauchi, N., Suzuki, K., Kobayashi, T., Tsutsui, C., Mayuzumi, K., Nishibe, S., Okuyama, T., 1995. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes II. Inhibitory of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull.* 43 (8), 1385–1387.
- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 75 pp.
- Ordóñez, P. E., Quave, C. L., Reynolds, W. F., Varughese, K.I., Berry, B., Breen, P. J., Malagón, O., Smeltzer, M. S., Compadre, C. M., 2011. Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *J. Ethnopharmacol.* 137, 1055–1059.
- Ortiz de Montellano, B.R., 1994. *Medicina, Salud y Nutrición Azteca*. 2da edición. Siglo XXI editores. S. A de C. V. 346 pp.
- Ovalle-Magallanes, B., Déciga-Campos, M., Mata, R., 2015. Antinociceptive and hypoglycaemic evaluation of *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron Asteraceae. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 1733–1743.
- Ovalle-Magallanes, B., Medina-Campos, V.O., Pedraza-Chaverri, J., Mata, R. 2014. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry.* 110, 111–119.
- Pan, J., Liu, G., Liu, H., Qiu Z., Chen, L., 1998. Effects of *Artemisia capillaris* on blood glucose and lipid in mice. *J. Chin. Med. Sci.* 21(8), 408–11.

- Panchal, S.K. Brown, L., 2011. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J. Biomed. Biotechnol.* 11–14.
- Peltier, A., Goutman, S.A., Callaghan, B.C., 2014. Painful diabetic neuropathy. *BMJ.* 2014; 348: g1799.
- Pires, J.M., Mendes, F.R., Negri, G., Duarte-Almeida, M.D., Carlini, E.A., 2008. Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. *Phytother. Res.* 23, 212–219.
- Prasad-Reddy, L., Isaacs, D., 2015. A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond. *Drugs in Context.* 4, 1–19.
- Priscilla, H.D., Jayakumar, M., Thirumurugan, K., 2015. Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *J. Funct. Foods.* 14, 363–373.
- Qi-Qin, W., Ning, C., Wen-Bing, Y., Sheng-Ming, P., Xiao-Qing, Z., 2014. Synthesis, nitric oxide release, and α -glucosidase inhibition of nitric oxide donating apigenin and chrysin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 1515–1521.
- Qunfang, C., Meizhu, F., Xiaoning, L., Yonghong, F., Yongxing, W., Xin, X., 2011. Application of *Artemisia rupestris* Preparation in Medicine for Treating Diabetes. *Faming Zhuanli Shenqing CN 102166243A 20110831.*
- Ribnicky, D.M., Poulev, A., Watford, M., Cefalu, W.T., Raskin, I., 2006. Antihyperglycemic activity of Tarralin, an ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *Phytomedicine* 8, 550–557.
- Ribnicky, D.M., Raskin, I., 2007. Compounds from an extract of *Artemisia* and methods for treating type II diabetes. *PCT Int. Appl. WO 2007109217 A2 20070927.*
- Rio de la Loza, F., 1897. Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. *Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.*
- Rios, J.L., Francini, F., Schinella, G.R., 2015. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med.* 81, 975–994.
- Rivera-Chávez, J., González-Andrade, M., Gonzáles, M.C., Glenn, A., Mata, R., 2013. Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry.* 94, 198–205.
- Rodríguez, E., Towers, G., Mitchell, J., 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.* 15, 1573–1580.
- Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Huerta-Reyes, M., Tortoriello-García, J., 2009. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, México. *BLCPPMA.* 8, 380–388.
- Romo, J. Romo de Vivar, A., Treviño R., Joseph-Nathan, P., Díaz, E., 1970. Constituents of *Artemisia* and *chrysanthemum* species-the structures of chrysartemins A and B. *Phytochemistry.* 9, 1615–1621.
- Romo, J. Tello, H., 1972. Estudio de la *Artemisia mexicana*: Armexina un nuevo santanolido cuya lactona posee fusión cis. *Rev. Latinoam. Quim.* 3, 112–126.
- Ross, S.A., Gulve, E.A., Wang, M., 2004. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chem. Rev.* 104, 1255–1282.
- Rudniskaya, A., Török, B., Török, M., 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 38, 261–265.
- Ruiz-Cancino, A.E.A., Delgado, G., 1993. Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. Mexicana. *Phytochemistry.* 33, 51113–115.
- Ruiz-Salazar, C., 1989. Contribución al estudio de las plantas medicinales de la delegación Xochimilco. México D. F. MEXU. Herbario Nacional (UNAM). Tesis.
- Rutter, G.A., Pullen, T.J., Hodson, D.J., Martinez-Sanchez, A., 2015. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the

control of insulin secretion. *Biochem. J.* 466, 203218.

Ryu, S.Y., Oak, M.H., Kim, K.M., Yomogin inhibits the degranulation of mast cells and the production of the nitric oxide in activated RAW 264.7 cells. *Planta Med.* 66, 171–173.

Rzedowski, J., Calderon de G., 1997. *Compositae. Tribu Anthemideae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 60.* Instituto de Ecología- Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Rzedowski., 2001. *Asteraceae en: Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a ed.* Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 pp.

Samson, S.L., Garber, A.J., 2014. Metabolic Syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 43, 1–23.

Sánchez-Viesca, F., Romo, J., 1963. Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). *Tetrahedron.* 19, 1285–1291.

Sánchez, E., García, S., Heredia, N., 2010. Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6888–6894.

Sánchez, O., 1980. *La Flora del Valle de México. 6ta edición.* Herrero, México. 432 pp.

Sawynok, J., Liu, J.X., 2004. The formalin test: Characteristics and usefulness of the model. *Rev. Analg.* 7, 145–163.

Scheen, A.J., 2015. Pharmacodynamics, Efficacy and Safety of Sodium–Glucose Co-Transporter Type 2 (SGLT2) Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs.* 75, 33–59.

Scherp, P., Putluri, N., LeBlanc, G.J., Wang, Z.Q., Zhang, X.H., Yu, Y., Ribnicky, D., Cefalu, W.T., Kheterpal, I., 2012. Proteomic analysis reveals cellular pathways regulating carbohydrate metabolism that are modulated in primary human skeletal muscle culture due to treatment with bioactives from *Artemisia dracunculus* L. *J. Proteomic.* 75: 3199–3210.

Shalini, V., Bhaskar, S., Kumar, K.S., Mohanlal, S., Jayalekshmy, A., Helen, A., 2012. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of the flavonoid, tricetin from Njavara rice (*Oryza sativa* L.) in human peripheral blood mononuclear cells: Possible role in the inflammatory signaling. *Int. Immunopharmacol.* 14, 32–38.

Shuying, H., Zhilu, W., Jianxing, W., Jinxiu, C., Hong, J., Liping, W., 2011. Process for Manufacturing Extract of *Artemisia annua* for Controlling Postprandial Blood Sugar. Faming Zhuanli Shenqing CN 101933965A 20110105.

Simon, J.E., Chadwick, A.F., Craker, L.E., 1984. *Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 7–9, 59–61, 91–92, 99–100 pp.

Stavniichuk, R., Shevalye, H., Hirooka, H., Nadler, J.L., Obrosova, I.G., 2012 Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Biochem. Pharmacol.* 83, 932–490.

Suzuki, Y., Sato, J., Kawanishi, M., Mizumura, K., 2002. Lowered response threshold and increased responsiveness to mechanical stimulation of cutaneous nociceptive fibers in streptozotocin-diabetic rat skin *in vitro* correlates of mechanical allodynia and hyperalgesia observed in the early stage of diabetes. *Neurosci. Res.* 43, 171–178.

Szkudelski, T., 2012. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* 237, 481–490.

Taştekin, D., Atasever, M., Adiguzel, G., Keles, M., Taştekin, A., 2006. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 50, 235–238.

Terres, J., 1897. Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. *Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III.* Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain.* 51, 5–17.

- Trümper, A., Trümper, K., Trusheim, H., Arnold, R., Göke, B., Hörsch, D., 2001. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol. Endocrinol.* 15, 1559–1570.
- Turi, E.C., Shipley, R.P., Murch, J.S., 2014. North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (Sagebrush): A phytochemical, botanical and pharmacological review. *Phytochemistry*. 98, 9–26.
- Turnaturi, R., Arico, G., Ronsisvalle, G., Parenti, C., Pasquinucci, L., 2016. Multitarget opioid ligands in pain relief: New players in an old game. *Eur. J. Med. Chem.* 108, 211–228.
- Twaij, H.A. y Al-Badr, A.A. (1988) Hypoglycemic activity of *Artemisia herba alba*. *J. Ethnopharmacol.* 24 (2-3), 123–126.
- Ulbelen, A., 1992. New diterpenoids from *Salvia divaricata*. *J. Nat. Prod.* 55, 1518–1521.
- Verspohl, E.J., 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med.* 68, 581–90.
- Viehoever, A., Capen, R.G., 1923. New source of santonin. *J. Ame. Chem. Soc.* 45, 1941–1944.
- Villaseñor, F. 1907. Informe de los trabajos realizados en el mes de agosto de 1907. *Anales del Instituto Médico Nacional*. Tomo IX. Tipografía la Universal de Taladrid, Blanco y comp. México.
- Villaseñor, R.J.L., Espinosa, G.F.J., 1998. Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 449 pp.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16, 97–110.
- Wang, Q.C.T., Luo, C., Chen, S., Li, Qianyan., Li, P., 2014. Yeast α -Glucosidase Inhibitory Phenolic Compounds Isolated from *Gynura medica* Leaf. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2551–2558.
- Wang, Z.Q., Ribnicky, D., Zhang, X.H., Raskin, I., Yu, Y., Cefalu, W.T., 2008. Bioactives of *Artemisia dracunculul* L enhance cellular insulin signaling in primary human skeletal muscle culture. *Metab. Clin. Exp.* 57 (1), S58–S64
- Whittle, B.A., Skett, P.G., 2002. *Artemisia judaica* Fractionation Method. Phytotech Limited. US 6350478 B1.
- Williamson, E.M., Opako, D.T., Evans, F.J., 1996. *Pharmacological Methods in Phytotherapy*. Research, John Wiley & Sons. New York, p 228.
- Winter, C., Riskey, E., Nuss, G., 1962. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drug. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 11, 544–547.
- Xie, G., Ni, Y., Su, M., Zhang, Y., Zhao, A., Gao, X., Liu, Z., Long, X., Jia, W., 2008. Application of ultra-performance LC-QTOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal *Panax* herbs. *Metabolomics*. 4, 248–260.
- Ximénez, F., 1888. Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de las Plantas y Animales de uso Medicinal en la Nueva España. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México. Libro segundo, 291 p.
- Xu, H., (2010). Inhibition kinetics of flavonoids on yeast-glucosidase merged with docking simulations. *Protein Peptide Lett.* 17, 1270–1279.
- Yamaguchi, T., 1989. Aldose reductase inhibitors for treatment of diabetic diseases. *Jpn. Kokai Tokyo Koho*. 01228914 A 19890912.
- Yamamoto, N., Kanemoto Y., Ueda, M., Kawasaki, K., Fukuda, I., Ashida, H., 2011. Anti-obesity and anti-diabetic effects of ethanol extract of *Artemisia princeps* in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Food Funct.* 2 (1), 45–52.
- Young-Jin, K., Jung, U.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Jeon, S.M., Park, Y.B., Chung, H.G., Baek, N.I., Lee, K.T., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2008. Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 82(1), 25–32.

Yun-Young, C., Nam-In, B., Hae-Gon, C., Tae-Sook, J., Kyung, T.L., Seon-Min, J., Hye-Jin, K., Robin, A.McG, Myung-Sook, C., 2012. Randomized controlled trial of Sajabalssuk (*Artemisia princeps* Pampanini) to treat pre-diabetes. *Eu. J. I. M.* 4 e299–e308.

Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez- Saldivar, D., Arias-García, L., 2002. Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharm. Biol.* 40, 263–268.

Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

ANEXO

Figura A1. A) Espectro de ^1H -RMN, **B)** ^{13}C -RMN de la salvinina (**166**) en CDCl_3 .

Figura A2. A) Espectro de ^1H -RMN, **B)** ^{13}C -RMN de la arglanina (**8**) en CDCl_3 .

Figura A3. A) Espectro de ^1H -RMN, **B)** ^{13}C -RMN de la aquilina (**31**) en CDCl_3 .

Figura A4. A) Espectro de ^1H -RMN, **B)** ^{13}C -RMN de la deshidroleucodina (**164**) en CDCl_3 .

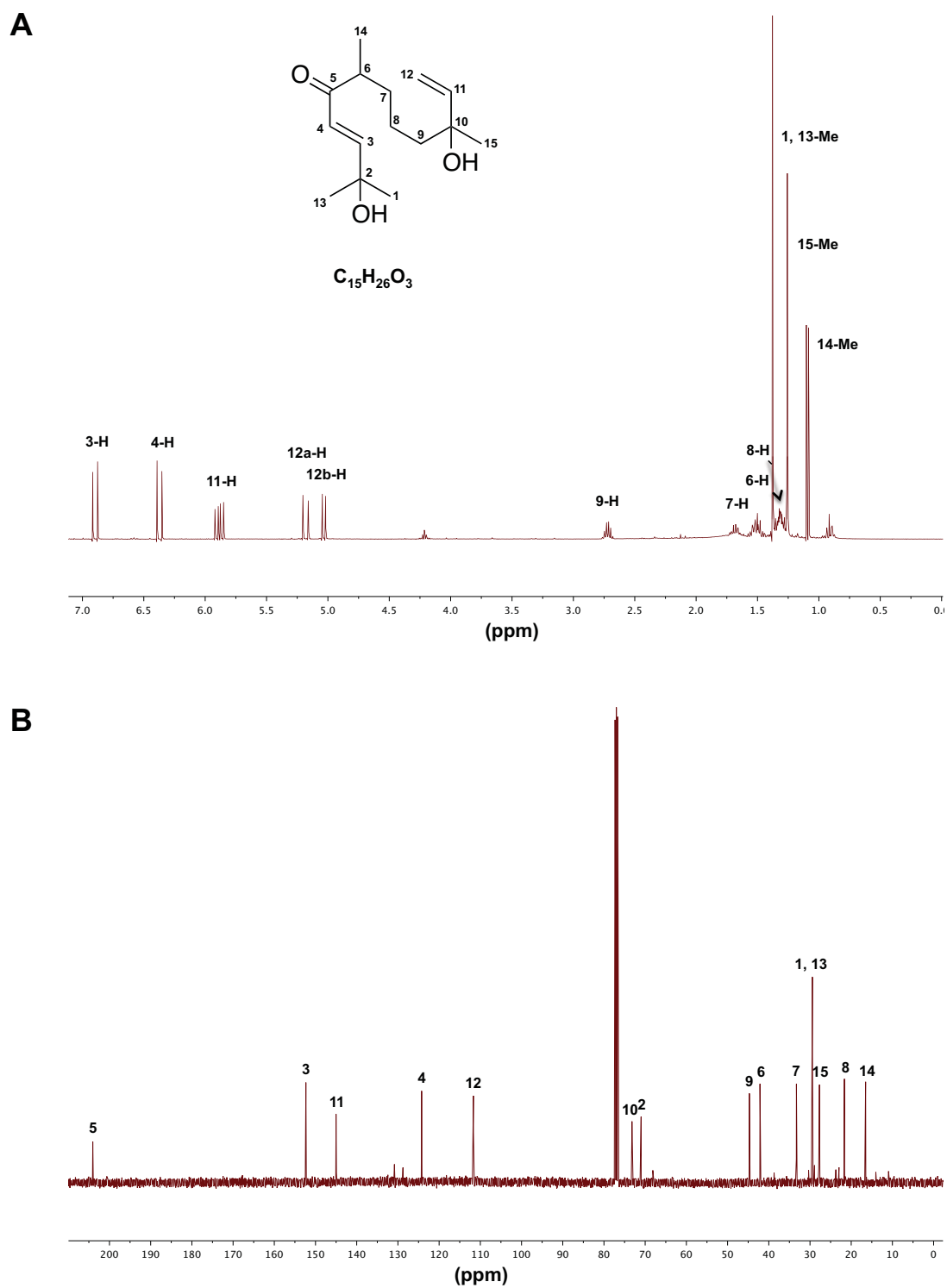


Figura A1. A) Espectro de 1H -RMN, B) ^{13}C -RMN de la salvinina (166) en $CDCl_3$.

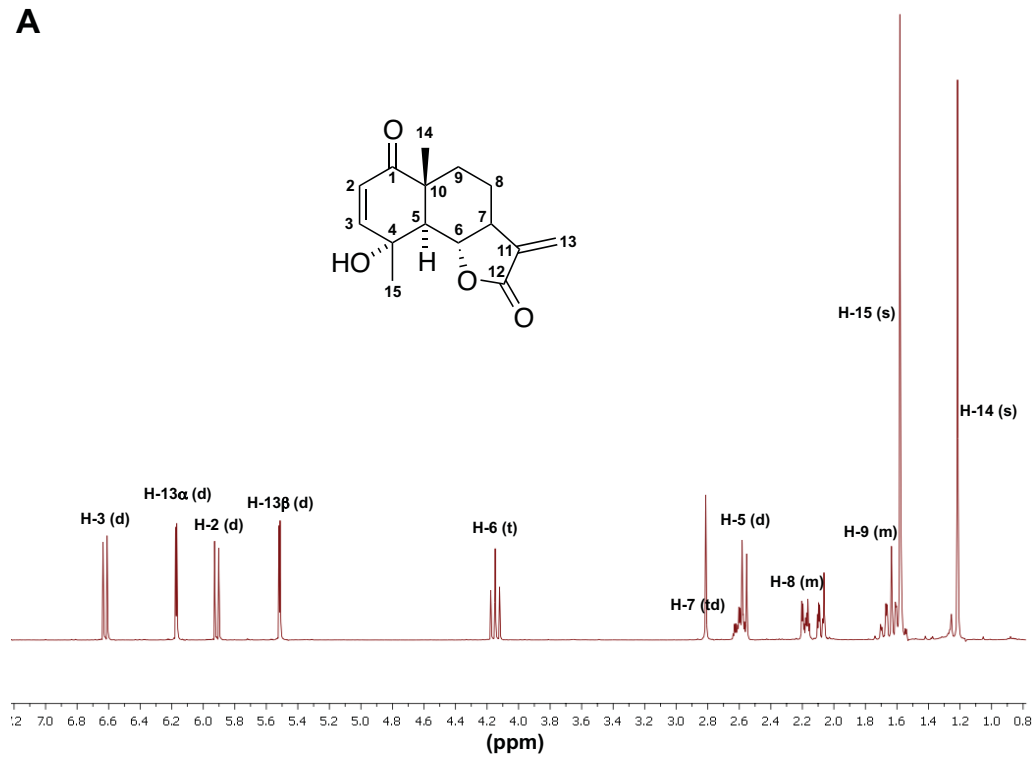
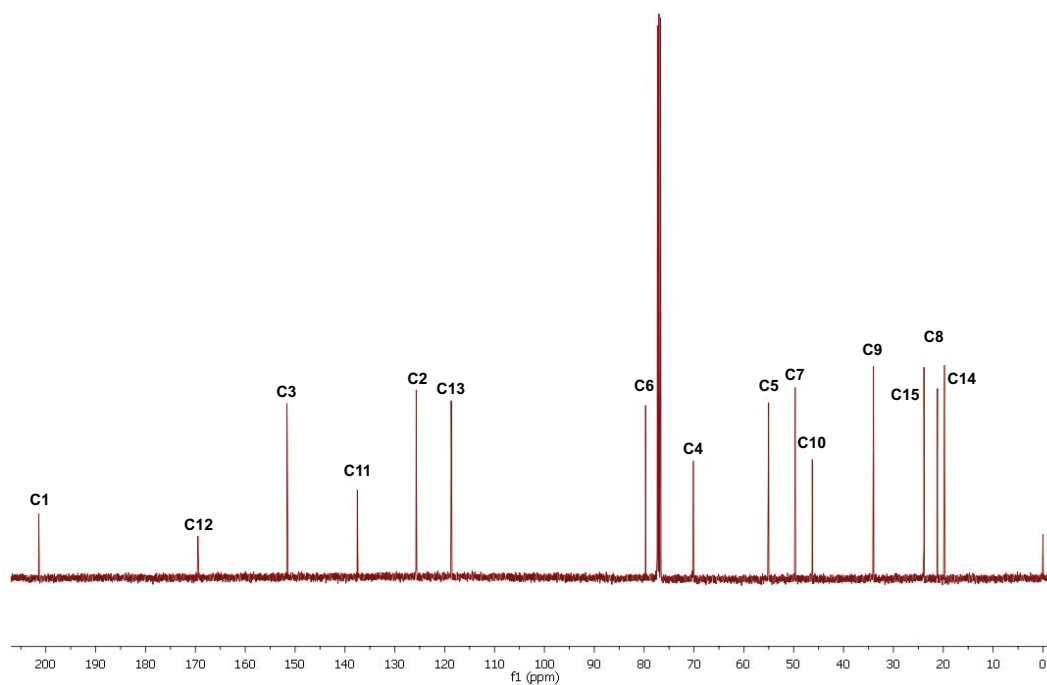
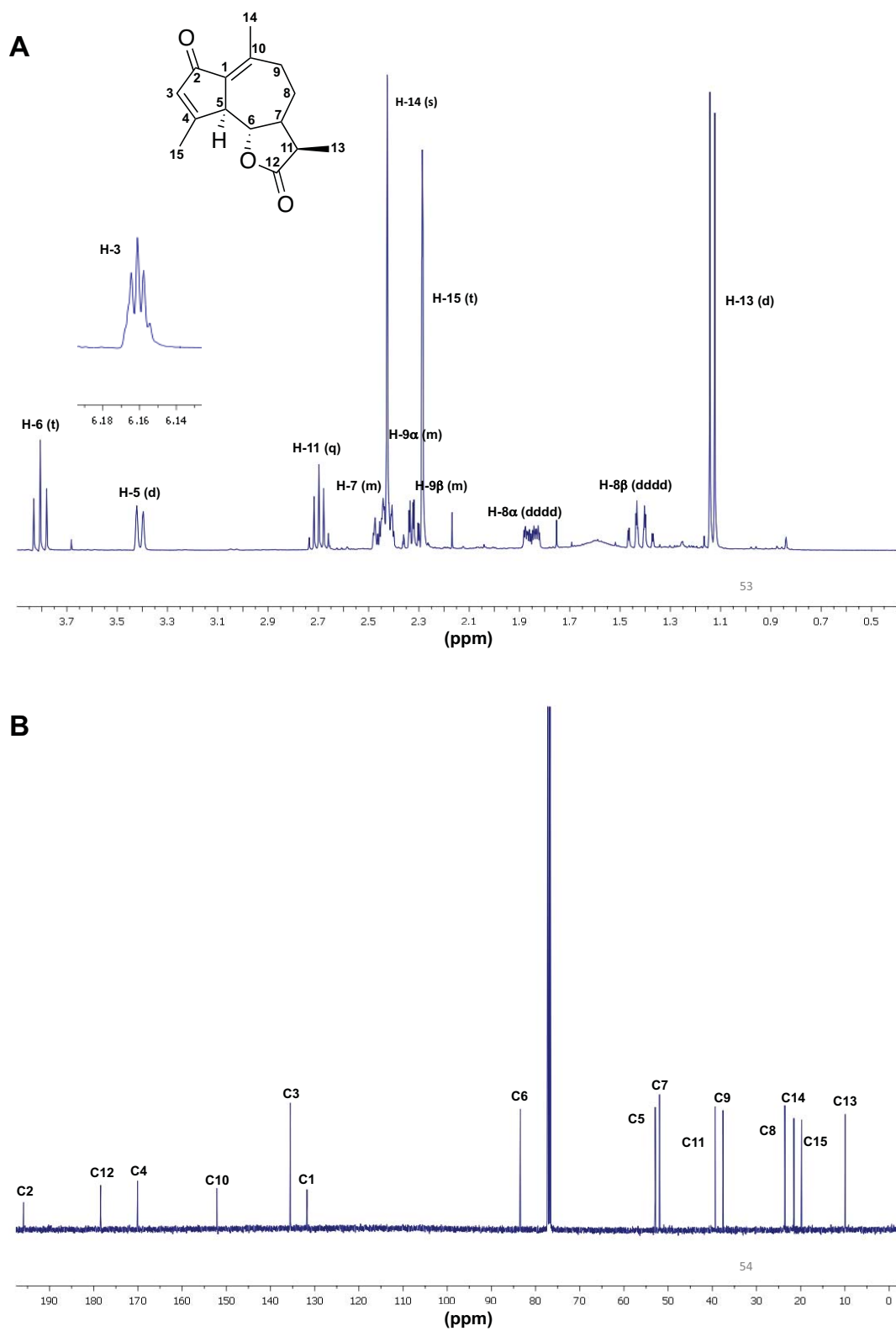
A**B**

Figura A2. A) Espectro de ^1H -RMN, B) ^{13}C -RMN de la arglanina (8) en CDCl_3 .



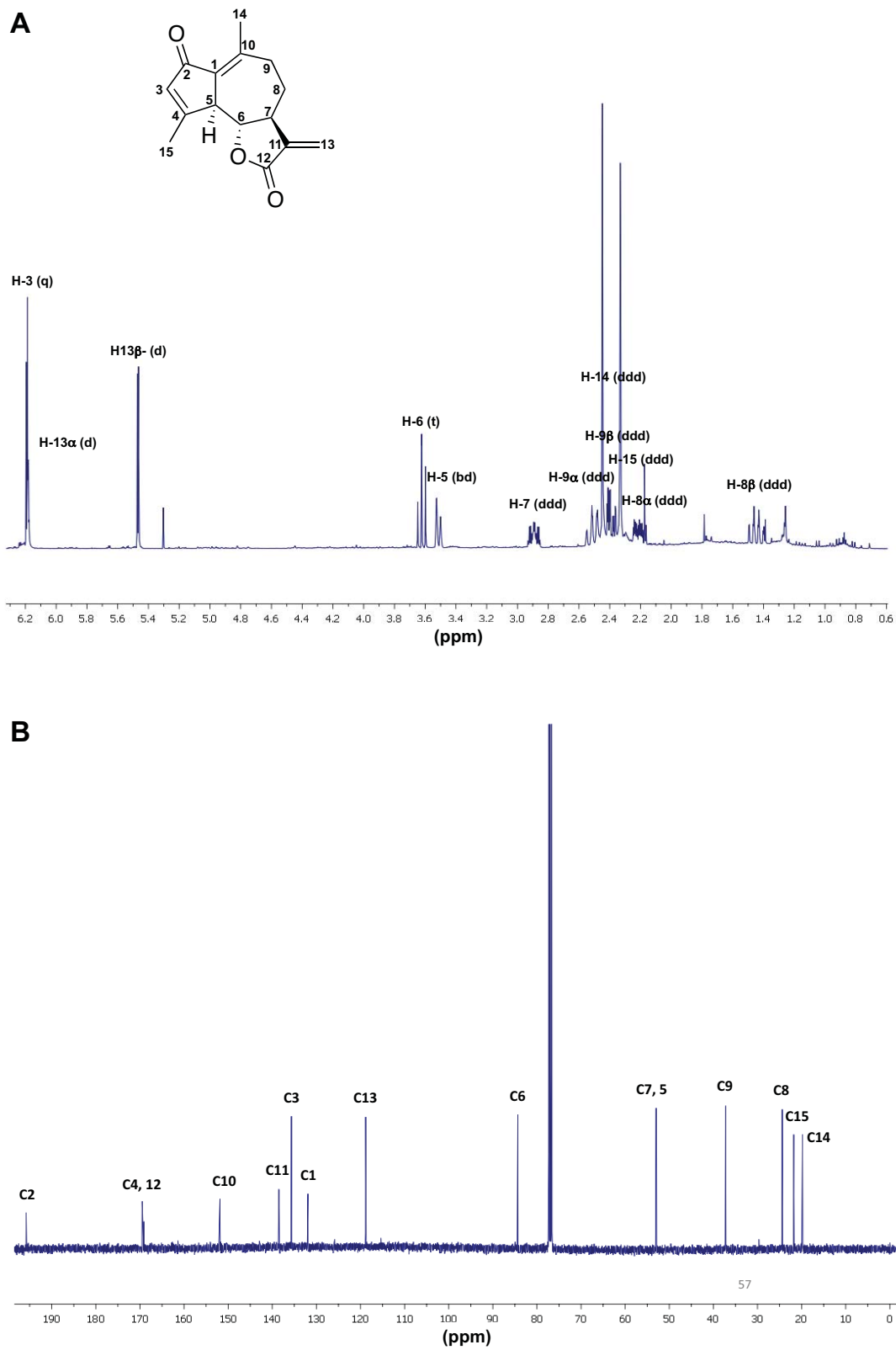


Figura A4. A) Espectro de ^1H -RMN, B) ^{13}C -RMN de la deshidroleucodina (**164**) en CDCl_3 .



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Research Paper

Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt[☆]



Gerardo D. Anaya-Eugenio, Isabel Rivero-Cruz, José Rivera-Chávez, Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 March 2014
Received in revised form
22 May 2014
Accepted 23 May 2014
Available online 2 June 2014

Keywords:
Artemisia ludoviciana
Hypoglycemic
Antihyperglycemic
Arglanin
Eupatilin
Salvinine

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Artemisia ludoviciana*, commonly known as “estafiate”, plays an important role in contemporary Mexico for treating several diseases including diabetes. To establish the preclinical efficacy of *Artemisia ludoviciana* as hypoglycemic and/or antihyperglycemic agent using well-known animal models.

Materials and methods: Acute hypoglycemic as well as oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests were used to demonstrate the value of the plant for treating diabetes. An essential oil (EO), an organic extract (OE) and an infusion (AE) were assayed in normal and NA-STZ-treated mice. The acute toxicity of the three preparations was analyzed by the Lorke method. The infusion was subjected to conventional phytochemical study using chromatographic conventional procedures. Some of the isolates were evaluated using the same pharmacological assays as well as an enzymatic test. The latter was employed to assess their potential inhibitory effect on yeast α -glucosidase.

Results: Oral administration of OE to normal mice significantly decreased blood glucose level only at the dose of 100 mg/kg; in NA-STZ-mice the hypoglycemic effect was observed at the three doses tested (31.6, 100, and 316 mg/kg). The infusion reduced significantly, blood sugar levels only in diabetic mice; the best effect was observed at the dose of 316 mg/kg. The EO was inactive when evaluated in normal mice. Regarding to the antihyperglycemic effect, the best effect was observed with the OE, during the OGTT and OSTT in diabetic mice. The infusion (AE) showed better effects during the OGTT in both normal and diabetic animals at the dose of 100 mg/kg. Finally, the EO was inactive during an OGTT at the three doses tested (31.6, 100, and 316 mg/kg) in diabetic mice. In addition, the results of AE on the enzymatic test using yeast α -glucosidase revealed an inhibition of 45%; this finding was consistent with the results obtained with the same preparation *in vivo* during an OSTT. Conventional phytochemical analysis of the active AE led to the isolation and characterization of eupatilin (**1**), jaceosidin (**2**), arglanin (**3**), salvinine (**4**), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (**5**). Biological testing of **1** and **3** revealed their hypoglycemic effect. The hypoglycemic effect of arglanin (**3**) was attenuated in the presence of nicorandil, which suggested that the lactone behaved as an ATP-K⁺-channel blocker as glibenclamide. Salvinine (**4**) turned out to be a mixed α -glucosidase inhibitor, while **3** was inactive.

Conclusions: *Artemisia ludoviciana* preparations showed hypoglycemic and antihyperglycemic effects, which could explain its effectiveness for treating diabetes in contemporary Mexico. Some of the active principles of the plant included compounds **1–5**. These compounds seem to be acting synergistically on different molecular targets which involved glucose absorption and insulin liberation.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type-2 Diabetes mellitus (T2DM) is a complex metabolic disorder characterized by two major defects, which result in impaired glucose uptake: decreased secretion of insulin by the pancreas and resistance to the action of insulin in various tissues

(muscle, liver and adipose). This disease is found worldwide, and according to the International Diabetes Federation (IDF) around 382 million people were affected in 2012; the prevalence is expected to rise beyond 592 million in less than 25 years (Guariguata et al., 2014). The best treatment for T2DM involves hyperglycemic control using appropriate therapies and a healthy lifestyle. Although metformin remains the most important oral agent for the initial management of T2DM, the current therapies include also sulfonylureas, α -glucosidase inhibitors, thiazolidinediones, and dipeptidyl peptidase-4-inhibitors. Frequently, these drugs are combined to make the treatment more efficient (Irons

[☆]Taken in part from the Ph.D. Thesis of G. Anaya-Eugenio.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5289; fax: +52 55 5622 5329.

E-mail address: rachel@unam.mx (R. Mata).

and Minze, 2014). In addition, herbal medicine has played an important role in treating diabetes worldwide for centuries (Simmonds and Howes, 2006).

As elsewhere, the incidence of diabetes in Mexico is very high, with the number of cases increasing rapidly; in 2013 the number of people with T2DM approached 8.2 million, and the prevalence is expected to rise to 15.7 million by 2035 (Guariguata et al., 2014). A large segment of Mexican population believes that treatment with plants is safer and less expensive than with allopathic prescription. This situation is not unusual in a country like Mexico that is rich in medicinal plants strongly attached to the cultural values of the population. Furthermore, some patients stop their conventional treatments and begin using plants (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). According to recent reviews, in Mexico there are at least 383 plant species employed for the treatment of T2DM, but only a few of these have been investigated for their preclinical or clinical efficacy (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Mata et al., 2013). Therefore, it is important to pursue the pharmacological research of a few of these species to support their rational use, and to discover new herbal-based therapies for the treatment of diabetes; the latter issue is more relevant for those long-term diabetic patients who being treated ineffectively suffers from complications of retinopathy, nephropathy, neuropathy coma and cardiovascular diseases.

Artemisia ludoviciana, commonly known as “estafiate”, has been used in Mexico since Pre-Hispanic times (Argueta et al., 1994; Heinrich, 2002). The oldest record that points the medicinal uses of *Artemisia ludoviciana* is found in the Badiano Codex which was written in the XVI century by Martin de la Cruz; in this ancient text this species, under the name of Iztauhyatl, is regarded as useful for treating weak hands, hurt feet, hemorrhoids, madness, and head lice (De la Cruz, 1991). According to Argueta et al. (1994), in the Florentin Codex the species was considered valuable for treating pain, fever, and cough. Later, Francisco Hernández documented its use for hemorrhoids, upset stomach, colics, bronchitis, indigestion, flatulence, dandruff, and inflammation. In the XVIII century, Esteyneffer (1732) first described the efficacy of the plant as anthelmintic. From then to date, most of these uses have persisted, although new uses have emerged and documented in several publications (Argueta et al., 1994; Heinrich, 2002). Thus, in modern Mexico, the infusion prepared from the aerial parts of *Artemisia ludoviciana* plays an important role in traditional healthcare practices for treating parasitic diseases, upset stomach, diarrhea, painful complaints, malfunction of the gall bladder, and diabetes (Argueta et al., 1994; Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). This plant has been also investigated thoroughly in terms of phytochemistry and pharmacology. As a result numerous secondary metabolites are now known to occur being monoterpenoids, sesquiterpenes lactones, and flavonoids the most relevant (Liu and Mabry, 1982; Mata et al., 1984; Ruiz-Cancino et al., 1993; Heinrich, 2002; Bora and Sharma, 2010). A significant number of publications exists concerning its biological activities; these studies have documented its *in vitro* cytotoxic (Vahdati-Mashhadian et al., 2009), antiprotozoal (Calzada et al., 2006) and antibacterial effects (García et al., 2006), including anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Jiménez-Arellanes et al., 2003) and anti-*Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2009). Other studies have shown its anti-diarrheal (Zavala-Sánchez et al., 2002) and anti-inflammatory (Bork et al., 1997). Finally, Alarcón-Aguilar et al. (1998) reported that the decoction of the plant was not effective for inhibiting the post-prandial peak during a glucose tolerance test (OGTT) in healthy rabbits, concluding that the plant has not potential as hypoglycemic agent.

On the basis of the above considerations, the present work was undertaken to establish the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae), using normal and NA-STZ-treated mice.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Streptozotocin (STZ), nicotinamide (NA), glibenclamide (GLI), acarbose (ACA), glucose, sucrose, nicorandil, and nifedipine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solvents used were analytical grade and obtained from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, NJ, USA).

2.2. Animals

ICR male mice, weighting between 20 and 25 g, selected for this study were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.) and kept in an environmentally controlled room maintained at 22 ± 1 °C with alternating 12 h light/dark natural cycle, with free access to standard rodent pellet diet and water *ad libitum*. All studies were conducted according to the principles and guidelines of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) with the approval of the Institutional Ethical Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/021/11).

2.3. Plant material

Aerial parts of *Artemisia ludoviciana* were collected in San Nicolás Tetelco, Mexico City, on October 2009 by Gerardo Anaya. The plant was authenticated at the Science School Herbarium (FCME), UNAM and a voucher specimen no. 119871 was deposited.

2.4. Samples preparation

The material was air-dried and ground into powder and extracted exhaustively by maceration using dichloromethane-methanol (1:1) at room temperature. After filtration, the organic extract was evaporated to dryness using a vacuum rotary evaporator to yield 30 g of crude extract (OE; 11.1%). The essential oil (EO) was made from 300 g of the dry plant material subjected to hydrodistillation using a modified Clevenger type apparatus for 1.5 h; anhydrous sodium sulphate was used to eliminate water after extraction. The EO was concentrated *in vacuo* to yield a yellow residue (0.56 g; 0.2%). Finally, *Artemisia ludoviciana* infusion (AE) was prepared pouring 1 L of boiling water on 40 g of crude drug; after 30 min, the aqueous extract was filtered and evaporated *in vacuo* to give 4.3 g of a brown residue (yield 10.1%). This process was repeated as necessary to yield 80 g of AE.

2.5. Phytochemical study

2.5.1. General procedures

Electron impact (EI) mass spectra (MS) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. IR spectra were acquired using KBr disks in a Perkin-Elmer FT 59913 spectrophotometer. The experimental optical rotations at the sodium D-line wavelength of salvinine (4) were recorded in methanol solution on a Perkin-Elmer 243 polarimeter at 23 °C. NMR spectra, including COSY, NOESY, HMBC, and HSQC experiments, were recorded in CDCl₃ or methanol-*d*₄ on a Varian Unity Plus 400 spectrometer operating at either 400 MHz (¹H) or 100 MHz (¹³C), using TMS as an internal standard. Open column chromatography: Silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 mesh (Merck). TLC analyses were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using a ceric sulphate (10%, *p/v*) solution in H₂SO₄ as color reagent.

2.5.2. Isolation of eupatilin (1), jaceosidin (2), arglanin (3), salvinine (4), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (5)

Sixty three grams of AE were partitioned between ethyl acetate and water (4 × 1 L); the organic phase was dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The resulting residue (16 g) was chromatographed on silica gel (320 g) using a gradient system of *n*-hexane–ethyl acetate (10:0 → 0:10) as eluents; this process gave 10 secondary fractions (AE₁–AE₁₀). From fraction AE₅, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (8:2), crystallized 35 mg of a yellow solid identified as eupatilin (1; m. p. 231–232 °C). From fraction AE₆, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (7:3), 25 mg of a yellow powder identified as jaceosidin (2; m.p. 223–224 °C) precipitated. From fraction AE₇, eluted with *n*-hexane–ethyl acetate (7:3), 30 mg of arglanin (3) crystallized spontaneously, m.p. 207–208 °C. Column chromatography of the mother liquors of fraction AE₇ on a silica gel, eluting with a gradient of *n*-hexane–dichloromethane (10:0 → 0:10) afforded twelve tertiary fractions (AE_{7.1}–AE_{7.XII}), from fraction AE_{7.X} 23 mg of salvinine (4) were obtained as a glassy solid. Preparative TLC on silica gel [EtOAc–CH₂Cl₂–HCOOH–CH₃COOH–H₂O (100:25:10:10:11)] of fraction AE₁₀ (1 g) yielded 300 mg of 3,5-dicaffeoylquinic acid (5). All isolates (Fig. 1) were analyzed by NMR and identified by comparison of their spectral data with those reported in the literature (Mata et al., 1984; Ruiz-Cancino et al., 1993; Cheng-Bi et al., 2009; Csapi et al., 2010; Khan et al., 2012).

2.6. Acute oral toxicity study

The acute oral toxicity of *Artemisia ludoviciana* preparations (OE, AE, EO) was conducted according the Lorke procedure in mice (Lorke, 1983). ICR male mice were divided into four groups of three animals. The control group received vehicle (NaCl 0.9%; 0.2 mL/10 g) and other three groups received the treatments in two phases; in the first one, mice were treated with doses of 10, 100, and 1000 mg/kg of each preparation in separated experiments. In the second phase, the animals received doses of 1600, 2900, and 5000 mg/kg; in both stages, the animals were kept under observation and the body weight was recorded for consecutive 14 days. After this period of time, the toxic effects or macroscopic injuries were observed in the lungs, heart, stomach coma and intestines removed under dissection.

2.7. Pharmacological evaluations

2.7.1. Nicotinamide-streptozotocin (NA-STZ) induced experimental type II diabetes in mice

The animal model for diabetes mellitus type-II study was based on a single intraperitoneal injection of 50 mg/kg of nicotinamide (NA) followed by 120 mg/kg of streptozotocin (STZ) in 100 mM citrate buffer (pH 4.5) 15 min later; afterward food and water was supplied (Escandón-Rivera et al., 2012). The control group only received the vehicle. After seven days, blood glucose level was determined using a glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, CA, USA); mice having blood glucose ≥ 190 mg/dL were considered hyperglycemic and selected for the study.

2.7.2. Acute hypoglycemic study

Acute hypoglycemic activity was evaluated in normal and NA-STZ-treated mice randomly divided into five groups containing eight animals each. In each case, control groups (I and II) were orally administered with vehicle and glibenclamide (GLI; 15 mg/kg), respectively. Groups III–V were treated either with OE, AE, EO, 1 or 3 at the doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg for the preparations, and 5.6, 17.7, and 31.6 mg/kg for the pure compounds. Blood samples were taken from the tail vein at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after the administration by a small incision at the end of the tail.

2.7.3. Oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests

Normal or NA-STZ-treated mice were divided also into five groups (I–V) of eight mice each. After four hours fasting, the animals of groups I and II (control) as well as those of groups III–V were administered orally with the treatments (OE, AE or EO) at the doses of 31.6, 100, and 316 mg/kg. Thirty min after administering the treatments (samples or controls), an oral glucose (1.5 g/kg) or sucrose (3 g/kg) load was given to each animal. Blood glucose levels were determined at 30, 60, 90, and 120 min post-administration of the carbohydrate load. The positive controls employed for the OGTT and OSTT were glibenclamide (GLI, 15 mg/kg) and acarbose (ACA, 5 mg/kg), respectively. The % of glycemic variation was determined as previously described (Escandón-Rivera et al., 2012).

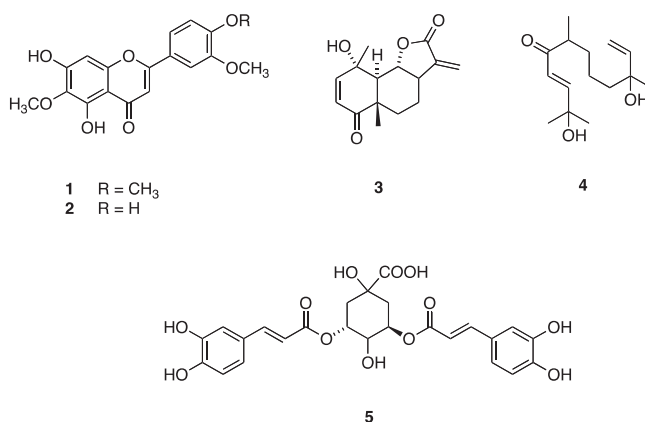


Fig. 1. Metabolites isolated from the infusion of *Artemisia ludoviciana*.

2.7.4. Co-treatment of compounds **1** and **3** with Ca^{2+} and K^+ ion channels regulators

NA-STZ-treated mice were randomly divided into seven groups of six mice each. Control group was administrated with vehicle (Group I). Groups II–IV were treated orally with glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**) and arglanin (**3**) the last two at the dose of 17.7 mg/kg. Groups V–VII were administered with

glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**, 17.7 mg/kg) and arglanin (**3**, 17.7 mg/kg), respectively plus nifedipine (13.6 mg/kg). The last three groups VIII–X were given glibenclamide (15 mg/kg), eupatilin (**1**, 17.7 mg/kg) and arglanin, (**3**, 17.7 mg/kg) respectively plus nicorandil (6.8 mg/kg). Blood samples were collected from tail veins at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h post-treatment (Wu et al., 2011).

2.7.5. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error. Statistical significance differences were ascertained by means of *post-hoc* Dunnett's test using GraphPad Prism 5.0 software. A value of $p \leq 0.05$ indicates significant differences between groups.

2.8. Assay for α -glucosidase inhibitors

The aqueous extract (AE), compounds **2–4** and ACA (positive control) were dissolved in MeOH or phosphate buffer solution (PBS, 100 mM, pH 7). Aliquots of 0–10 μL of testing materials (triplicated) were incubated for 10 min with 20 μL of enzyme stock solution [0.125 units of yeast α -glucosidase (αGHY) in PBS]. After incubation, 10 μL of substrate [4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG), 5 mM] was added and incubated for 20 min at 37 °C. Absorbance at 405 nm was then determined (Escandón-Rivera et al., 2012).

The inhibitory activity of the extract was calculated as a percentage in comparison to a blank according with the following equation:

$$\% \alpha\text{-GHY of inhibition} = 1 - (A_{405t_n} - A_{405t_0}) \times 100$$

where % α -GHY is the percentage of inhibition, A_{405t_n} is the corrected absorbance of AE or compound testing and A_{405t_0} is the absorbance of blank. The concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50% (IC_{50}) was calculated by regression analysis, using the

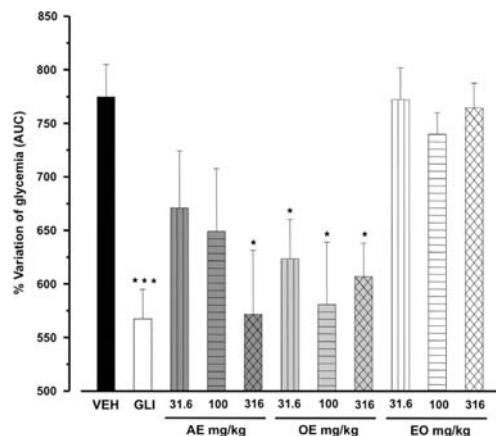


Fig. 2. Hypoglycemic activity of *Artemisia ludoviciana* preparations: aqueous (AE) and organic extracts (OE), and essential oil (EO) in NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

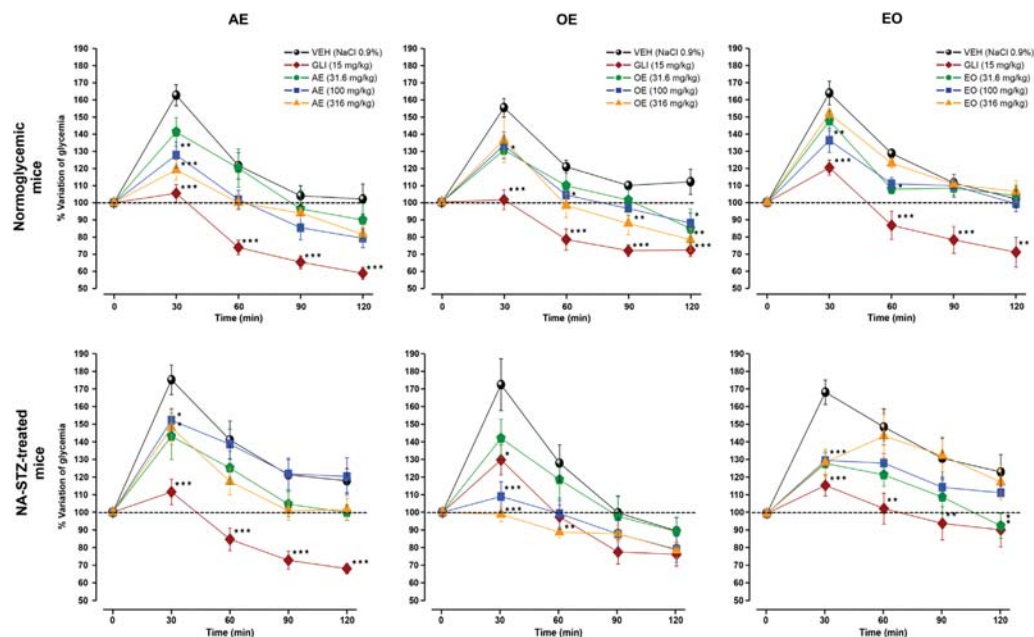


Fig. 3. Effect of AE, OE and EO from *Artemisia ludoviciana* on blood glucose levels in normal and NA-STZ treated mice during an OGTT. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's *post hoc* test compared with control group.

following equation:

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{A_{100}}{1 + (I/IC_{50})^s}$$

where A_{100} is the maximum inhibition, I is the inhibitor concentration, IC_{50} is the concentration required to inhibit activity of the enzyme by 50%, and s is the cooperative degree (Copeland, 2000).

The mode of inhibition of α -glucosidase was determined by a double reciprocal Lineweaver–Burk plots. Nonlinear least regression was used to determine the inhibitory constants. The inhibition is described by the following equation:

$$v = \frac{V_{\max}S}{k_m(1 + [I]/k_i) + S(1 + [I]/\alpha k_i)}$$

where v is the initial velocity in the absence and presence of the inhibitor; S and I , are the concentration of substrate and inhibitor, respectively; V_{\max} is the maximum velocity; k_m is the Michaelis–Menten constant; k_i is the competitive inhibition constant, and αk_i is the uncompetitive inhibition constant. The kinetic data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software.

2.9. Docking of salvinine (4)

First yeast isomaltase (α -GHY) crystallographic structure was downloaded from the Protein Data Bank site (PDB:3A4A).

Subsequently all hydrogen and Kollman charges were assigned using AutoDockTools 1.5.4. The starting conformation of the ligand was an energy-minimized form with geometric optimization using the program HyperChem 8.0. ACA and salvinine (4) were prepared by assigning the Gasteiger–Marsilli atomic charges and nonpolar hydrogens using AutoDockTools 1.5.4 (<http://mgtools.scripps.edu/>). Blind docking was carried out with AutoDock4 software (<http://autodock.scripps.edu/>) using the default parameters, except for the number of GA runs (100) and the Lamarckian genetic algorithm with local search and 25 million energy evaluations (Long, Evals.) per run. The protein was held rigid during the docking process while the ligands were allowed to be flexible. The grid box size was $126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA} \times 126 \text{ \AA}$ in the x , y and z dimensions, with the center of the grid corresponding to the protein.

3. Results and discussion

3.1. Acute oral toxicity study

Acute toxicity was first studied in mice according to the Lorke procedure. All preparations (OE, AE, and EO) of *Artemisia ludoviciana* did not provoke behavior alterations, lesions, or bleeding of the internal tissues and organs of the animals throughout the experiments; in all cases the LD_{50} must be greater than 5000 mg/kg. Therefore, according to the Lorke criteria the

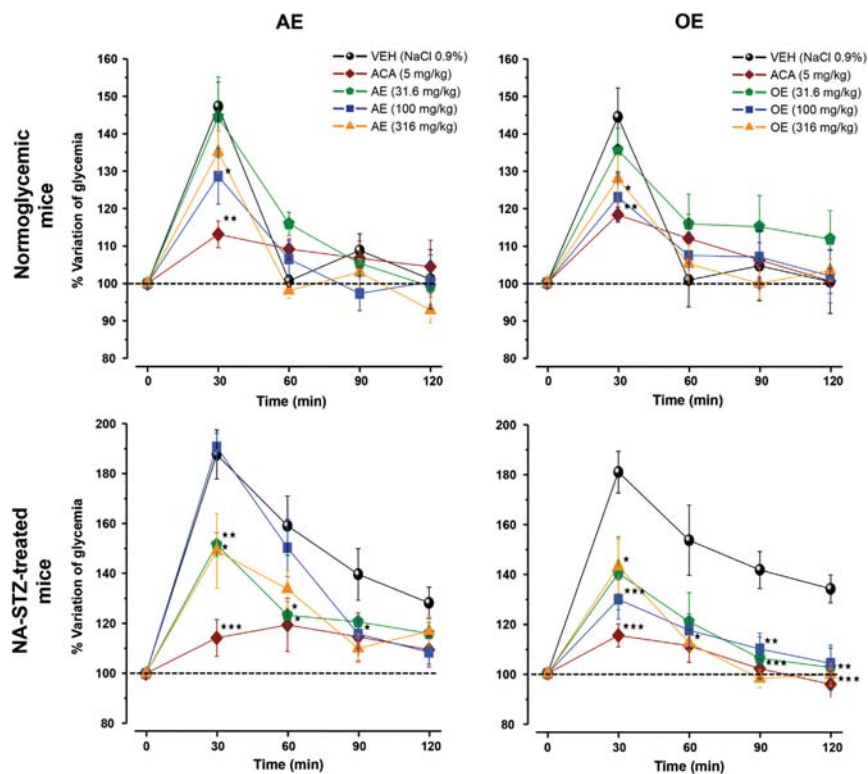


Fig. 4. Effect of AE and OE from *Artemisia ludoviciana* on blood glucose levels in normal and NA-STZ treated mice during an OSTT. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's post hoc test compared with control group.

three preparations of *Artemisia ludoviciana* tested are devoid of acute toxic effects for mice.

3.2. Hypoglycemic and antihyperglycemic activities of *Artemisia ludoviciana* preparations

Artemisia ludoviciana is widely commercialized in contemporary Mexico for the treatment of several illnesses, including diabetes. This fact encouraged us to establish its preclinical efficacy as a hypoglycemic agent using well-known animal models. Three different preparations (OE, AE and EO) were tested in both normal and NA-STZ-treated mice using logarithmic doses (31, 100, and 316 mg/kg); the doses were chosen according to a standard protocol of allometric scaling (Wojcikowski and Gobe, 2014). Oral administration of OE to normal mice (Fig. S1) significantly decreased blood glucose level at the dose of 100 mg/kg. However, in NA-STZ-treated mice, an important hypoglycemic effect was observed in the groups treated with OE at the three doses tested (Fig. 2); the effect was comparable to that of GLI (15 mg/kg). In the

OGTT (Fig. 3), the OE at 316 mg/kg induced a significant drop in the postprandial peak after the glucose challenge in normal mice, in diabetics, the effect was observed at the doses of 100 and 316 mg/kg. Finally, during the OSTT (Fig. 4) the preparation reduced glucose levels in blood after the administration of the disaccharide; the effect was more pronounced in diabetic mice.

The aqueous extract (AE) was also evaluated as hypoglycemic agent considering that the plant is consumed as infusion (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). Treatments of mice with AE reduced significantly, in a non-dependent dose manner, blood sugar levels in diabetic mice; the best effect was observed at the dose of 316 mg/kg. In normal mice no significant changes in blood glucose concentrations were observed at all doses tested, although, a lowering trend was observed. In the oral glucose tolerance test (OGTT), AE at the doses of 100 and 316 mg/kg provoke an important decrease of the postprandial peak (Fig. 3) in both normal and treated mice.

Next, AE was enzymatically tested to find out the presence α -glucosidase inhibitors using a spectrophotometric assay.

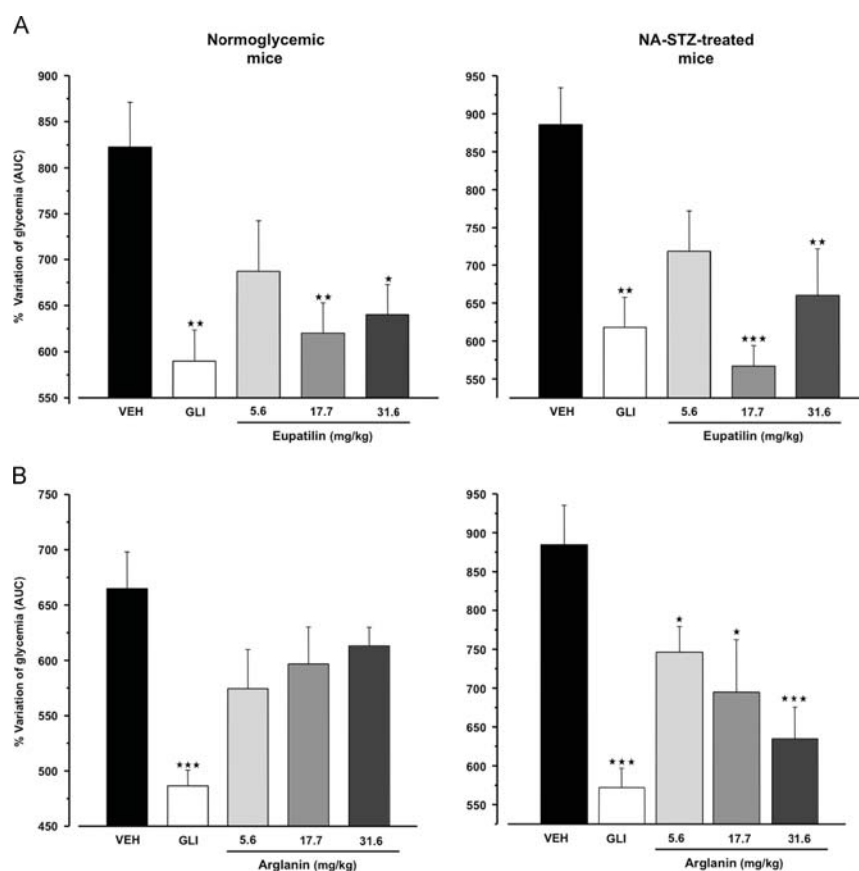


Fig. 5. Hypoglycemic activity of (A) eupatilin (1) and (B) arglanin (3) isolated from *Artemisia ludoviciana* in both normal and NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM ($n=6$). * $p < 0.05$, Dunnett's post hoc test compared with control group.

The results revealed that AE inhibited by 45% the activity of the enzyme, suggesting the presence of such inhibitors. The results of an OSTT in diabetic mice supported *in vivo* this hypothesis (Fig. 4).

Finally, EO was tested because it is commonly sold by several laboratories throughout Mexico for treating several complaints; the oil did not induce hypoglycemic action in both normal and diabetic mice (Fig. 2). As OE the essential oil was capable of promote glucose uptake or/and utilization since it induces an important lowering of the postprandial peak during the OGTT in normal and diabetic mice. This preparation, however, did not affect the postprandial peak in the OSTT.

Altogether these pharmacological results revealed the potential of *Artemisia ludoviciana* as hypoglycemic and antihyperglycemic agent. Other species of this genus have also demonstrated potential for the development of new preparations for treating diabetes, in particular *Artemisia herba-alba* (Al-Waili, 1986), *Artemisia dracuncululus* (Obanda et al., 2012), *Artemisia princeps* (Jung et al., 2007), *Artemisia capillaris* (Islam et al., 2013), and *Artemisia judaica* (Nofal et al., 2009). Furthermore, from *Artemisia dracuncululus*, an ethanol preparation, named Tarralin™, has been developed (Ribnicky et al., 2006); and from *Artemisia judaica*, a patent was developed concerning a novel methodology for the preparation of clinically useful extracts possessing insulin-like activity (Whittle and Skett, 2002). From *Artemisia capillaris*, a tablet and a rice cracker containing the aqueous extract were also formulated for treating diabetes (Masao et al., 2013). From *Artemisia argyi* and *Prunella spica*, an insulin mimetic preparation was developed which inhibits the activity of protein tyrosine phosphatase 1B (PTB1B) (Gyeong et al., 2013). From *Artemisia rupestris* another preparation was developed (Qunfang et al., 2011). Finally, *Artemisia annua* can be combined with drugs and health foods for controlling postprandial blood sugar, alleviating insulin resistance, and for preventing and treating diabetes (Shuying et al., 2011).

3.3. Chemistry

Although previous chemical studies of these species revealed the presence of a number of flavonoids with antidiabetic properties *in vivo* and/or *in vitro*, chemical analysis of the infusion of *Artemisia ludoviciana* was initiated with the purpose of identify all possible active components. Thus, the application of conventional partition and chromatographic procedures allowed the isolation of eupatilin (1), jaceosidin (2), arglanin (3), \pm salvinine (4), and 3,5-dicaffeoylquinic acid (5), which is the major component of the infusion according to the chromatographic profiles. The identification and characterization of these metabolites were accomplished by means of IR, NMR and MS analyses. The last two compounds are reported for the first time in *Artemisia ludoviciana*. This is the second report of the occurrence of salvinine (4) in nature; it was previously isolated from *Salvia divaricata* as a racemic mixture (Ulubelen, 1992). The $[\alpha]_D$ value obtained in the present study as well as its spectral data is included in the supplementary information (Figs. S4 and S5). Eupatilin (1) and jaceosidin (2) has been previously reported in *Artemisia ludoviciana*.

3.4. Hypoglycemic effect of eupatilin (1) and arglanin (3)

In a previous investigation, eupatilin (1) demonstrated noted hypoglycemic action in a subchronic experiment in Db/db mice. The flavonoid also decreased HbA_{1c}, plasma glucagon levels with the simultaneous increase of insulin and adiponectin levels; in the same work it was also established that eupatilin (1) supplementation modified the activity of a few hepatic enzymes involved in glucose metabolism (Kang et al., 2008). These results could in part explain the effects of the OE and AE. Arglanin (3), however, has not been analyzed for its antidiabetic potential. Therefore its

hypoglycemic action in mice (Fig. 5) at the doses of 5.6, 17.7, and 31.6 mg/kg was assessed using 1 and GLI as positive control. The sesquiterpene lactone induced a significant dose-dependent reduction on blood glucose levels in diabetic mice. However, eupatilin (1) showed the best effect.

When plasma glucose level rises, insulin secretion is promoted by closure of K⁺-ATP and activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels; these effects produce membrane depolarization which triggers Ca²⁺ entry and insulin release (Rorsman et al., 2011). The potential involvement of K⁺-ATP sensitive and Ca²⁺ voltage dependent channels in the hypoglycemic action of eupatilin (1) and arglanin (3) was next investigated. For that two set of experiments were carried out in the presence of nicorandil and nifedipine a K⁺-ATP channel opening drug and a Ca²⁺ channel blocker, respectively. Glibenclamide was also included in these experiments since this drug induces hypoglycemic action by a mechanism, which involves insulin liberation by closing K⁺-ATP channels in pancreatic β cells. The results revealed (Fig. 6) that co-treatment of diabetic mice (NA-STZ) with nicorandil (6.8 mg/kg) or nifedipine (13.6 mg/kg) and GLI (10 mg/kg) or 3 (17.7 mg/kg) reduced significantly the hypoglycemic action of GLI and the natural product. These data suggest that compound 3 exert its hypoglycemic activity promoting insulin secretion via a mechanism involving K⁺-ATP channel blocking as GLI does. On the other hand, with 1 (17.7 mg/kg) the hypoglycemic activity was only attenuated when co-administered with nifedipine (Fig. 6). This information was consistent with 1 being a modulator of intracellular Ca²⁺ concentration.

In addition, to the results described above it has been reported that 1 and 2 lowered fasting blood glucose concentration in Db/db mice significantly, reduced hemoglobin HbA_{1c}, and plasma glucagon levels along with a simultaneous increase in plasma insulin and adiponectin levels, lowered hepatic glucose-6-phosphatase, and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities, and increased glucokinase activity in the liver (Kang et al., 2007, 2008). Thus, as in the case of *Artemisia princeps* the presence of 1 and 2 in *Artemisia ludoviciana* contributes highly to its hypoglycemic

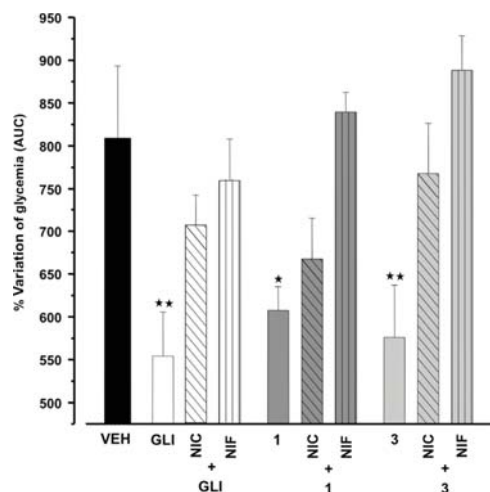


Fig. 6. Effect of nicorandil (NIC, 6.8 mg/kg), and nifedipine (NIF, 13.6 mg/kg), potassium and calcium ion channels regulators, on the hypoglycemic activity of the GLI (15 mg/kg), eupatilin (1, 17.7 mg/kg), and arglanin (3, 17.7 mg/kg) in NA-STZ-treated mice. Data are presented as mean \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$, Dunnett's post hoc test compared with control group.

properties. A preparation containing both compounds was developed from *Artemisia princeps* for preventing and treating diabetes mellitus (Myeong et al., 2009).

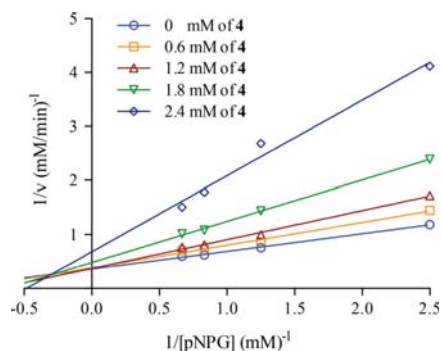


Fig. 7. Double reciprocal Lineweaver-Burk plot of α -glucosidase yeast inhibition of salvinine (**4**) at different concentrations of substrate (pNPG).

In the case of 3,5 dicaffeoylquinic acid (**5**), its antihyperglycemic potential has been reported a few times (Matsui et al., 2004).

3.5. Effect of arglanin (**3**) and salvinine (**4**) on the activity of yeast α -glucosidase

Compound **4** inhibited α GHY, a type I α -glucosidase which hydrolyzes heterogeneous substrates including sucrose and pNPG, in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of 1.65 mM. The effect, was however lower than that of ACA (positive control, IC_{50} =545.4 μ M). Compound **3** was inactive and **1**, **2** and **5** were not evaluated because their inhibitory effect on yeast α -glucosidase has been already analyzed (Gao et al., 2010; Zhang et al., 2013). In particular, **1** was able to inhibit the activity of the enzyme with an IC_{50} of 0.49 μ M vs. 5.5 μ M for ACA.

In order to obtain further evidence of the nature of the interaction of **4** with α GHY a kinetic analysis was carried out; ACA was also included in the study. Double reciprocal Lineweaver-Burk plots were constructed using different concentrations of inhibitors and substrate. The results in Fig. 7 revealed that **4** behaved as a mixed type of inhibitor, with series of lines with different slopes intersecting in the first quadrant between x and y axes. The calculated k_i and α values were 1.34 and 3.19 μ M, respectively. These results suggested that **4** binds to α -GHY and/or

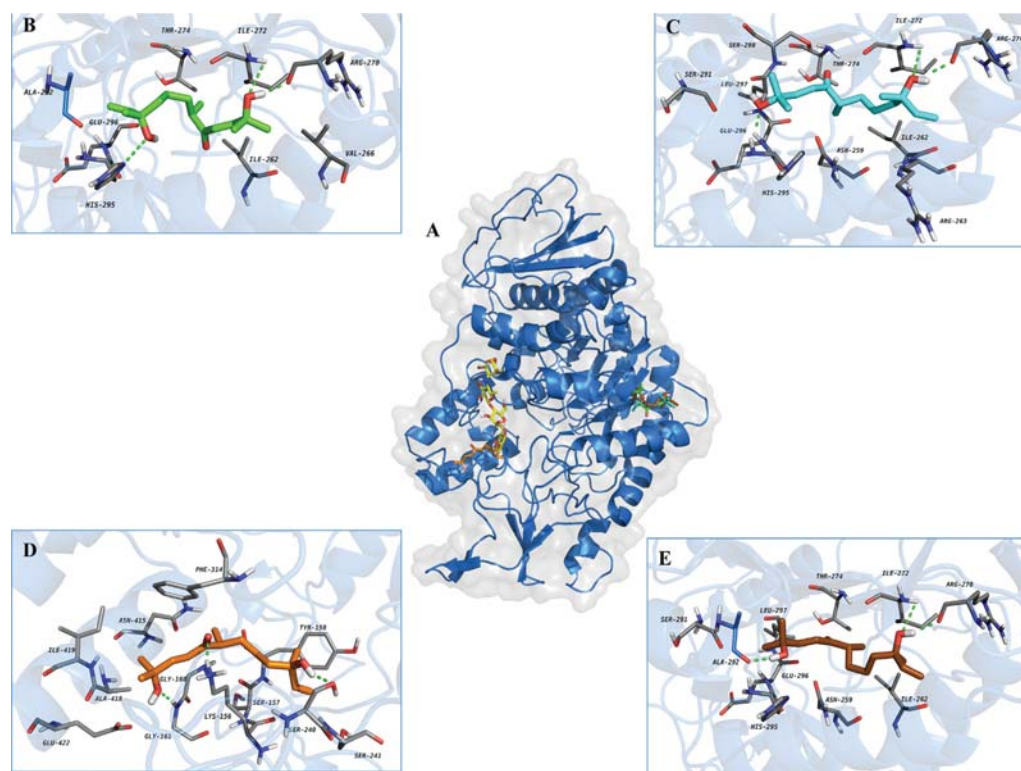


Fig. 8. (A) Structural model of diastereoisomers **4a–4d** (green, cyan, orange and brown sticks, respectively) – α -GHY and acarbose (yellow sticks) – α -GHY. 3D Representation of the interaction between α -GHY and salvinine diastereoisomers **4a** (B), **4b** (C), **4c** (D), and **4d** (E) in the binding site predicted. Graphics generated with PyMol. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to the substrate-enzyme complex (pNPG- α -GHY in this case) (Copeland, 2000; Xu, 2010). ACA ($k_i=156.1 \mu\text{M}$), on the other hand, behaved as competitive inhibitor.

In order to predict the mode of interaction of compound **4** with α -GHY, docking analyses of the four possible diastereoisomers (**4a–4d**) of the compound were carried out (Morris et al., 1998; Rudnitskaya et al., 2010). Molecular dockings were performed using a crystallized glucose- α -glucosidase (isomaltase-sucrase) complex. The structure (PDB: 3A4A) was obtained from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>).

Diastereoisomers **4a–4d** and ACA were next docked into both α -glucosidase models. The lowest energy conformation obtained for each ligand in a blind docking was selected and re-docked in the binding site in order to get the better model of interaction. The docking results of **4a–4d** (Fig. 8) and ACA with α -GHY showed that the four ligands lodged in different sites. In all cases, hydrogen bonds and hydrophobic-contacts were the most important type of interactions with the enzyme. Diastereoisomer **4c** was the only binding to pocket near to the active site. The pocket for **4c** included Lys-156, Ser-157, Tyr-158, Gly-160, Gly-161, Ser-240, Ser-241, Phe-314, Asn-415, Ala-418, Ile-419, and Glu-422. Hydrogen bonds were observed between OH-10 and Ser-240, and OH-2 with Gly-161. In addition, the carbonyl ketone at C-5 displayed hydrogen bond with Lys-156; the estimated k_i was $5.04 \mu\text{M}$. On the other hand, **4a**, **4b** and **4d**, bind to site comprising Ala-292, His-295, Glu-296, Asn-289, Ile-262, Thr-274, Arg-270, Ile-272, and Val-276. Their theoretical k_i values were 5, 14 and $8.66 \mu\text{M}$, respectively. Diastereoisomers **4a**, **4b** and **4d** also had hydrogen bond with Arg-270 and Ile-272. Other hydrogen bonds observed for **4a** were with His-295 and Asn-289; for **4b** with Glu-296, and for **4d** with Ala-292. Thus, the *in silico* results for **4c** tend to support the outcomes from the experimental kinetic analysis regarding the mixed nature of the interaction of **4** with the enzyme. However, no certain conclusion could be drawn till the absolute configurations at the chiral centers of salvinine (**4**) are established.

4. Conclusions

The pharmacological and toxicological results obtained in the present investigation for *Artemisia ludoviciana* could explain its effectiveness for treating diabetes in folk medicine. These findings contrasted with those previously described by Alarcón-Aguilar et al. (1998), who found no effect of *Artemisia ludoviciana* extracts on normal rabbits.

The hypoglycemic and antihyperglycemic actions of some of the major components of the infusion were established. These compounds seem to be acting synergistically on different molecular targets which involved glucose absorption and insulin liberation. This is the first report of the antidiabetic action of arglanin (**3**), which could promote insulin liberation as glibenclamide does, according to the experiments with nicorandil and nifedepine. It was demonstrated that salvinine (**4**) behaves as mixed inhibitor of the enzyme; docking analysis revealed that one of its four diastereoisomers (**4c**) bind close to the catalytic site of the enzymes. Finally, it is important to point out that according to the extensive work on the chemistry of this species, the infusion of *Artemisia ludoviciana* could contain more compounds contributing to the antidiabetic effect pharmacologically and enzymatically demonstrated.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma

de México (UNAM). This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-212913) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 150966). The authors thank the technical assistance Araceli Pérez-Vasquez, Georgina Duarte, Ramiro Del Carmen and Rosa Isela del Villar. The valuable recommendations of Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres from the Biochemistry Department are also acknowledged. G.A. acknowledges the fellowship from CONACYT to pursue graduate studies.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.051>.

References

- Al-Waili, N.S., 1986. Treatment of diabetes mellitus by *Artemisia herba-alba* extract: preliminary study. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 13, 569–573.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutiérrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Saenz, J.L., 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 101–110.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325–348.
- Argueta, V.A., Cano, A.L.M., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., pp. 628–630.
- Bora, S.K., Sharma, A., 2010. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology* 49, 101–109.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M., 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor κB (NF- κB). *Federation of European Biochemical Societies Letters* 402, 85–90.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Aguilar, A., 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 367–370.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 402–405.
- Cheng-Bi, C., Seung, K.J., Jeong, Y.L., Soon, O.L., Il-Jun, K., Soon, S.L., 2009. Inhibitory activity of caffeoylquinic acids from the aerial parts of *Artemisia princeps* on rat lens aldose reductase and on the formation of advanced glycation end products. *Journal of the Korean Society for Applied Biochemical Chemistry* 52, 655–662.
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, second ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Csapi, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Berényi, A., Forgo, P., Szabó, P., Hohmann, J., 2010. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research* 24, 1664–1669.
- De la Cruz, M., 1991. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Ed., Fondo de Cultura Económica, México. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R., 2012. α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavayilensis*. *Journal of Natural Products* 75, 968–974.
- Esteyneffer, J.D., 1732. *Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades*, 5^a. Imprenta, Manuel Fernández (Ed.), 1732. Madrid, España.
- Gao, H.Y., Wu, D., Lu, C., Xu, X.M., Huang, J., Sun, B.H., Wu, L.J., 2010. Constituents from the testas of *Castanea mollissima* Blume with α -glucosidase inhibitory activity. *Journal of Asian Natural Products Research* 12, 144–149.
- García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C., Heredia, N., 2006. Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesion of *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 669–674.
- Guariguata, L., Whiting, D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J.E., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice* 103, 137–149.
- Gyeong, M.Y., Sang, O.K., Bok, N.K., Jae, H.J., Chung, G.N., Seon, P.N., 2013. *Prunella spica* and *Artemisia argyi* extracts for Inhibiting Protein Tyrosine Phosphatase. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*. KR 2013055395A 20130528.
- Heinrich, M., 2002. Ethnobotany, phytochemistry and biological/pharmacological activities of *Artemisia ludoviciana* ssp. In: Colin, W.W. (Ed.), *Mexicana (Estafiate)*. *Artemisia*. Taylor and Francis Inc., New York, NY, pp. 107–111.
- Irons, B.K., Minze, M.G., 2014. Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* 7, 15–24.

- Islam, N.M., Jung, H.A., Sohn, H.S., Kim, H.M., Choi, J.S., 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Archives of Pharmacological Research* 36, 542–552.
- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J., 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research* 17, 903–908.
- Jung, J.U., Baek, N.I., Chung, H.G., Bang, M.H., Yoo, J.S., Jeong, T.S., Lee, K.T., Kang, Y.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Yeo, J.Y., Choi, M.S., 2007. The anti-diabetic effects of ethanol extract from two variants of *Artemisia princeps* Pampanini in C57BL/KsJ-db/db mice. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2022–2029.
- Kang, Y.J., Jung, U.J., Jeon, S.M., Yeo, J.E., Kim, H.J., Kim, D.J., Lee, M.K., Baek, N.I., Chung, H.G., Choi, M.S., 2007. Antihyperglycemic and antioxidant properties of jaceosidin, a flavonoid isolated from *Artemisia princeps*, in type 2 diabetic mice. *Diabetes* 56, A667.
- Kang, Y.J., Jung, U.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Jeon, S.M., Park, Y.B., Chung, H.G., Baek, N.I., Lee, K.T., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2008. Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice* 82, 25–32.
- Khan, M., Yu, B., Rasul, A., Shawi, A.A., Yi, F., Yang, H., Ma, T., 2012. Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/703034>.
- Liu, Y.L., Mabry, T.J., 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry* 21, 209–214.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Masao, T., Yoshihiko, N., Takashi, T., Hiroshi, H., Atsuko, Y., 2013. Adiponectin Production Promoting Compositions Containing Aqueous Extract of *Artemisia capillaris* and Cosmetics, Health Food, and Pharmaceuticals Containing the Compositions. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 2013237658A 20131128*.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, L., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products* 76, 468–483.
- Mata, R., Delgado, G., Romo del Vivar, A., 1984. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry* 23, 1665–1668.
- Matsui, T., Ebuchi, S., Fujise, T., Abesundara, K., Doi, S., Yamada, H., Matsumoto, K., 2004. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-*o*-caffeoylquinic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1797–1803.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639–1662.
- Myeong, S.C., Yeong, J.K., Seon, M.J., 2009. Eupatilin and Jaceosidin for Preventing and Treating Diabetes Mellitus. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*. KR 200906858A 20090624.
- Nofal, S.M., Mahmoud, S.S., Ramadan, A., Soliman, G.A., Fawzy, R., 2009. Antidiabetic effect of *Artemisia judaica* extracts. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4, 42–48.
- Obanda, D.N., Hernández, A., Ribnicky, D., Yu, Y., Zhang, X.H., Wang, Z.Q., Cefalu, W.T., 2012. Bioactives of *Artemisia dracuncul* L. mitigate the role of ceramides in attenuating insulin signaling in rat skeletal muscle cells. *Diabetes* 61, 597–605.
- Qunfang, C., Meizhu, F., Xiaoning, L., Yonghong, F., Yongxing, W., Xin, X., 2011. Application of *Artemisia rupestris* Preparation in Medicine for Treating Diabetes. *Faming Zhuanli Shenqing CN 102166243A 20110831*.
- Ribnicky, D.M., Poulev, A., Watford, M., Cefalu, W.T., Raskin, L., 2006. Antihyperglycemic activity of Tarralin, an ethanolic extract of *Artemisia dracuncul* L. *Phytomedicine* 8, 550–557.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Kanno, T., Zhang, Q., Gopel, S., 2011. Electrophysiology of pancreatic β -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107, 224–235.
- Rudnitskaya, A., Torok, B., Torok, M., 2010. Molecular docking of enzyme inhibitors. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 38, 261–265.
- Ruiz-Cancino, A., Cano, A.E., Delgado, G., 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana*. *Phytochemistry* 33, 1113–1115.
- Shuying, H., Zhilu, W., Jianxing, W., Jinxiu, C., Hong, J., Liping, W., 2011. Process for Manufacturing Extract of *Artemisia annua* for Controlling Postprandial Blood Sugar. *Faming Zhuanli Shenqing CN 101933965A 20110105*.
- Simmonds, M.S.J., Howes, M.J.R., 2006. Plants used in the treatment of diabetes. In: Soumyanath, A. (Ed.), *Traditional Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants*. Taylor and Francis Inc., Boca Raton, pp. 19–82.
- Ulubelen, A., 1992. New diterpenoids from *Salvia divaricata*. *Journal of Natural Products* 55, 1518–1521.
- Vahdati-Mashhadian, N., Emami, S.A., Oghazian, M.B., Vosough, R., 2009. The cytotoxicity evaluation of seven species of *Artemisia* on human tumor cell lines. *Pharmacologyonline* 1, 229–242.
- Whittle, B.A., Skett, P.G., 2002. *Artemisia judaica* Fractionation Method. *Phytotech Limited*. US 6350478 B1.
- Wojcikowski, K., Gobe, G., 2014. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytotherapy Research* 28, 22–27.
- Wu, C., Li, Y., Chen, Y., Lao, X., Sheng, L., Dai, R., 2011. Hypoglycemic effect of *Belamcanda chinensis* leaf extract in normal and STZ-induced diabetic rats and its potential active fraction. *Phytomedicine* 18, 292–297.
- Xu, H., 2010. Inhibition kinetics of flavonoids on yeast-glucosidase merged with docking simulations. *Protein and Peptide Letters* 17, 1270–1279.
- Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez-Saldivar, D., Arias-García, L., 2002. Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology* 40, 263–268.
- Zhang, Z., Luo, A., Zhong, K., Huang, Y., Gao, Y., Zhang, J., Gao, H., Xu, Z., Gao, X., 2013. α -Glucosidase inhibitory activity by the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Functional Foods* 5, 1253–1259.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jepAntinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*[☆]Gerardo D. Anaya-Eugenio^a, Isabel Rivero-Cruz^a, Robert Bye^b, Edelmira Linares^b, Rachel Mata^{a,*}^aDepartamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico^bJardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2015

Received in revised form

8 January 2016

Accepted 9 January 2016

Available online 11 January 2016

Keywords:

Artemisia ludoviciana

Gas chromatography

Mass spectrometry

Volatile composition

Paw formalin Test

Hot plate test

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Aerial parts of *Artemisia ludoviciana* are widely used in Mexico for treating gastrointestinal disorders, painful complaints and diabetes.**Aim of the study:** To establish the preclinical efficacy as antinociceptive agent of the essential oil (EO) from the aerial parts of *A. ludoviciana* using well-known animal models.**Materials and methods:** Acute antinociceptive effect of EO (1, 10, 31.6, 100, and 316 mg/kg, i.p.) was evaluated using the hot plate and paw formalin models in mice. The motor effects were assessed with the rota-rod and open field assays. The volatile components obtained by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and hydrodistillation were determined using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis.**Results:** EO decreased first and second phases of formalin test; in the first stage, the better effect was obtained with the treatment of 316 mg/kg but in the second phase, time licking was attenuated at the doses of 31.6, 100 and 316 mg/kg. The effectiveness of EO (ED₅₀ = 25.9 mg/kg) for attenuating neurogenic pain was corroborated using the hot plate test. The antinociceptive action of EO was blocked by naloxone suggesting that its mode of action involved an opioid mechanism. Furthermore, EO (316 mg/kg) did not affect animal motor and coordination functions when tested by the rota-rod and open field tests. The latter results indicated that the pharmacological effects exerted by EO during the hot plate and formalin test are truly antinociceptive. GC-MS analysis of EO revealed that (±)-camphor, γ-terpineol, 1,8-cineole and borneol were the major volatile compounds of the plant.**Conclusion:** EO from *A. ludoviciana* showed significant antinociceptive effect, which appeared to be partially mediated by the opioid system. These findings could support the long-term use of *A. ludoviciana* for treating painful complaints in Mexican folk medicine.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Artemisia ludoviciana Nutt. (Asteraceae) [Syn: *A. vulgaris*, *A. mexicana* and *A. albulu*, among others] commonly known as “estafiate” in Spanish, and “iztauhyatl” in Nahuatl, is one of the most popular remedies in contemporary Mexico. The oil and the crude drug (aerial parts) are widely commercialized throughout the country for treating gastrointestinal disorders, pain and diabetes

Abbreviations: EO, essential oil; HS-SPME, headspace solid phase microextraction; GC-MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; MOR, morphine; ATR, atropine; GLI, glibenclamide; L-NAME, N^G-L-nitro arginine methyl ester; NLX, naloxone; CAR, carboxen; PDMS, polydimethylsiloxane; DVB, divinylbenzene; VEH, vehicle; DZP, diazepam; NO, nitric oxide; TRPA1, transient receptor potential A1 channel; TNFα, tumor necrosis factor alpha; IL, interleukin; ED, Effective doses; LD50, Lethal doses 50

[☆]Taken in part from the PhD thesis of G.D. Anaya-Eugenio.

* Corresponding author.

E-mail address: rachel@unam.mx (R. Mata).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.008>

0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

(Heinrich, 2002; Romero-Cerecero et al., 2009). The persistence of this species in Mexican markets is a legacy of pre-Colombian cultures as recorded in the most important codices such as the Cruz-Badiano and Florentine (Heinrich, 2002).

Phytochemical studies carried out with *A. ludoviciana* resulted in the isolation of several monoterpenoids (Jakupovic et al., 1991), sesquiterpenoids (Mata et al., 1984; Jakupovic et al., 1991; Ruiz-Cancino et al., 1993; Heinrich, 2002; Anaya-Eugenio et al., 2014), and flavonoids (Liu and Mabry, 1982; Jakupovic et al., 1991; Ruiz-Cancino et al., 1993; Heinrich, 2002). In addition, the essential oil of the plant collected in different regions (Canada, USA and México) has been also analyzed, and oxygenated monoterpenoids were found the main components of all samples (Manjarrez and Medina, 1964; Blust and Hopkins, 1987; Zavala-Sánchez et al., 2002; Lopes-Lutz et al., 2008). The oil made up with *A. ludoviciana*, *Persea americana*, *Tagetes erecta*, *Zingiber officinale* and *Ocimum basilicum*, along with camphor, is rub for treating rheumatic pain. In addition, the infusion or tincture prepared from the whole plant is

taken orally for alleviating all kind of painful complaints. Rubbing of the whole plant is used also as a remedy of pain and inflammations. Inhalation of the plant is regarded useful for treating colds, bronchitis as well as throat and head sores (Argueta et al., 1994).

According to pharmacological studies the extracts prepared from the aerial parts showed antibacterial (Castillo-Juárez et al., 2009), antiprotozoal (Malagón et al., 1997; Calzada et al., 2006), anti-diarrheal (Zavala-Sánchez et al., 2002), and smooth muscle relaxant effects (Estrada-Soto et al., 2012). In our previous work with this plant we demonstrated *in vivo* and *in vitro* the hypoglycemic and antihyperglycemic properties of preparations and major constituents of the plant (Anaya-Eugenio et al., 2014).

Essential oils from a wide range of *Artemisia* species have been largely employed for their antiinfective, analgesic, antipaludic, anticancer and anti-inflammatory alleged properties. According to a recent review, the pharmacological studies of a few species have demonstrated some of these actions (Abad et al., 2012). Although, their biological properties are the result of the interactions of their multiple compounds, the major active constituents in most species analyzed are camphor, 1,8-cineole, borneol, β -thujone and γ -terpineol (Bakkali et al., 2008; Abad et al., 2012).

On the basis of the above considerations, the present investigation was undertaken to investigate the preclinical efficacy of the essential oil (EO) prepared from the aerial parts of "estafiate" for treating painful disorders, either topically or orally. EO was studied using two well-known antinociceptive animal assays, namely the hot plate and paw formalin tests. In addition, the nature of the volatile constituents, obtained by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and hydrodistillation, was determined using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Morphine sulfate (MOR) was donated by Alfredo Covarrubias, M.D. Atropine sulfate (ATR), glibenclamide (GLI), N^G -L-nitro arginine methyl ester (L-NAME), naloxone (NLX), acetic acid, 1,8-cineole, (–)-*trans*-pinocarveol, (\pm)-camphor, borneol, bornyl acetate, homologous series of *n*-alkanes C_8 – C_{20} , were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA). All solvents used were analytical grade and obtained from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, New Jersey, USA).

2.2. Plant material

Aerial parts of *Artemisia ludoviciana* were collected and identified by Dr. Robert Bye in Ozumba, Estado de Mexico, on November 2009. A voucher specimen (Bye & Linares 36224) has been deposited at the National Herbarium (MEXU) of Instituto de Biología, UNAM, Mexico City.

2.3. Preparation of the essential oil

The essential oil (EO) from *A. ludoviciana* was prepared from air-dried and ground aerial parts (300 g) by hydrodistillation in a modified Clevenger type apparatus using 1.5 L of distilled water for 3 h. The EO was separated from the hydro distilled by liquid-liquid extraction with CH_2Cl_2 (3×2 L); anhydrous Na_2SO_4 was used to eliminate water after extraction. The resulting organic phases were concentrated *in vacuo* to yield a yellow oil (0.56 g; 0.18%), which was stored at $-4^\circ C$ until chemical analysis and pharmacological experiments.

2.4. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME)

Volatile components of *A. ludoviciana* were identified by HS-SPME technique. One centimeter long carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), carboxen/divinylbenzene/polydimethylsiloxane (CAR/DVB/PDMS), and polydimethylsiloxane (PDMS)-coated (Supelco Technology, St. Louis, Missouri, USA) fibers were used for this analysis. The fibers were conditioned in a gas chromatogram injection port at $250^\circ C$ for 2 h, prior to use. The extraction procedure was conducted as follows: the sample phases containing dried plant material (500 mg), sodium chloride (75 mg), and distilled water (5 mL) were placed in suitable vials; then, the fiber-containing needles of the SPME device were pierced through the septum of the vials to the headspace during 10 min at room temperature. Once the equilibrium was reached, the fibers were withdrawn into the needle and transferred to the injection port of the GC for thermally desorption during 2 min at $250^\circ C$. Then, volatile components were separated on a DB-5 fused silica capillary column (10 m, 0.18 mm; film thicknesses 0.18 μm ; Supelco). All samples were analyzed by triplicate and the relative content of the individual components adsorbed to the fiber under these conditions was calculated on the total ion chromatogram (TIC) peak areas as a percentage of the sum of all peak areas.

2.5. GC-MS analyses

For GC-MS analyses, an Agilent 6890N series gas chromatograph coupled to a LECO time-of-flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, USA) was used. Compounds were separated on a DB-5 capillary column (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) with the following temperature program: oven temperature was programmed from 40 to $260^\circ C$ at $4^\circ C/min$ during 20 min, and finally up to $340^\circ C$ for 20 min isothermally; injector and MS transfer line temperatures were set at 200 and $300^\circ C$, respectively; Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL/min; split ratio, 1:20. A mixture of the homologous series of *n*-alkanes (C_8 – C_{20}) in hexane was directly injected into the GC under the above temperature program, in order to calculate the RIs of peaks in the chromatograms. All mass spectra were acquired in EI mode (scan range m/z 40–400, ionization energy 70 eV). Major volatile compounds were identified by co-injection with authentic standards by comparing the retention times of the chromatographic peaks, and their MS fragmentation patterns with those of pure compounds, of the spectral database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS or from literature data (Adams, 2007).

2.6. Animals

ICR male mice (20–25 g) were used in all experiments. Animals were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.) and maintained in standard laboratory conditions ($22 \pm 1^\circ C$ and 12 h light/dark cycle). Mice were fed with standard rodent pellet food and water *ad libitum*. All studies were conducted according to the guidelines of the Mexican Official Norms for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and officially approved by the Institutional Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/084/14).

2.7. Evaluation of antinociceptive activity of EO

2.7.1. Hot plate test in mice

The conventional hot plate apparatus (Ugo Basile, Italy) was used to measure the nociceptive response. Briefly, mice were placed into an acrylic cylinder on the heated surface ($55 \pm 0.2^\circ C$)

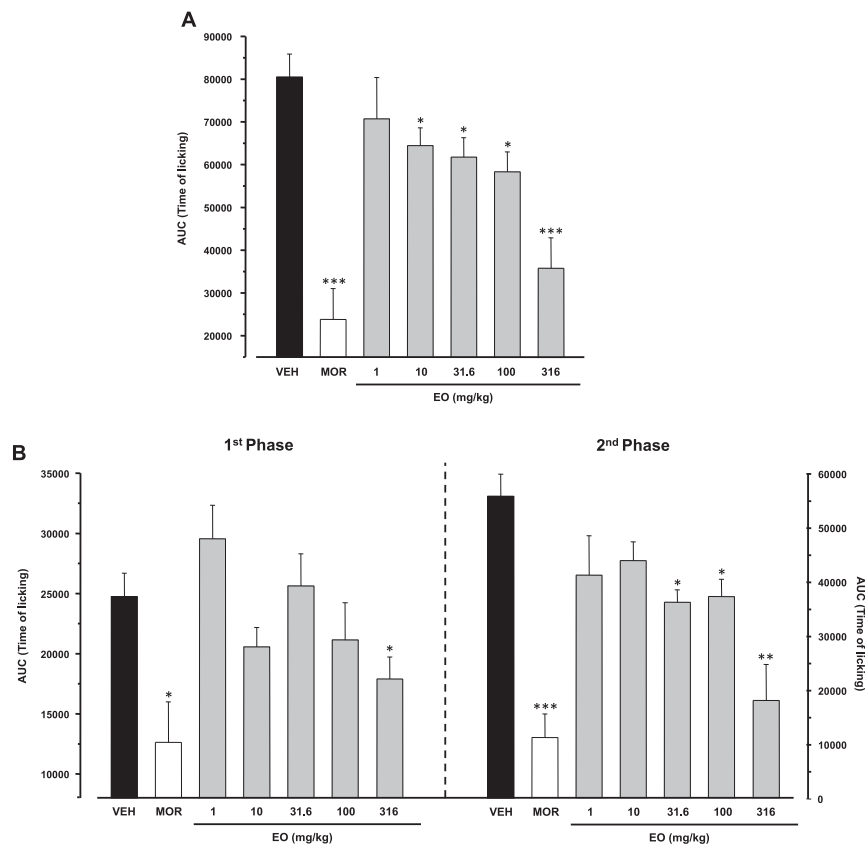


Fig. 1. (A) Antinociceptive effect of the essential oil (EO, i.p.) from aerial parts of *A. ludoviciana* in the formalin test. (B) Time of licking during phases 1 and 2. All results are presented as mean \pm SEM ($n=8$) of area under the curve (AUC) of time of licking. Vehicle (VEH, NaCl 0.9%), morphine (MOR, 5 mg/kg). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Dunnett test. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$ when compared to VEH.

and the latency to respond to the thermal stimulus evaluated, as the time for forepaw licking or jumping. A cut off time of 30 s was used to avoid damage to the animals paw. EO was administered to the animals in increasing logarithmic dose (1, 10, 17.7, 31.6 and 100 mg/kg, i.p.); the doses were chosen according to a standard protocol of allometric scaling (Wojcikowski and Gobe, 2014). The control group received saline solution (VEH, 0.1 mL/10 g, i.p.) and reference group morphine sulfate (MOR, 5 mg/kg, i.p.). Mice were placed on the heated plate 30 min after treatment (Zimmerman, 1983).

2.7.2. Formalin-induced test in mice

The formalin assay was assessed according to Hunskaar and Hole (1987). The animals were divided to seven groups ($n=8$). Each animal was administered by intraplantar (i.pl.) injection with formalin solution in normal saline (2%, 30 μ L, v/v), into the mice dorsal surface of the right hind paw using a micro syringe with a 30-gauge needle. All animals were put into the chamber and the observation period started. Only licking or biting of the injected paw was defined as a nociceptive response. Certain groups received an intraperitoneal administration of VEH or increasing

logarithmic doses of EO (1, 10, 31.6, 100, and 316 mg/kg, i.p.) or MOR (5 mg/kg, i.p.) 30 min before formalin injury. On the basis of the response pattern described elsewhere, two distinct periods of intensive licking activity were identified and scored separately unless otherwise stated. The first period (early phase) was recorded 0–10 min after the injection of formalin and the second period (late phase) was recorded 15–30 min after administration.

2.7.3. Assessment of some mechanisms involved the hot plate and formalin tests

The mechanism of analgesic action of EO was further investigated using specific antagonists in both antinociceptive tests. The doses of antagonist and other drugs were selected on the basis of previous literature and pilot experiments in our laboratory (Figueiredo et al., 2013). In these experiments, mice were pretreated with naloxone (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropine sulfate (ATR, 1 mg/kg, i.p.), N^G -L-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) or glibenclamide (GLI, 10 mg/kg, i.p.). In all cases, 30 min after the pretreatment, the animals were administered with EO, vehicle or morphine sulfate (5 mg/kg) and were subjected to the hot plate (EO, 17.7 mg/kg) or formalin (EO, 31.6 mg/kg) tests.

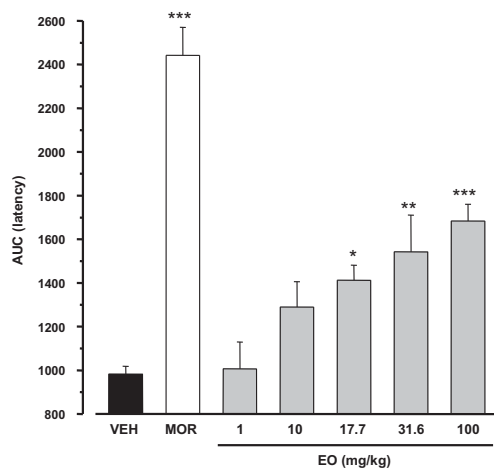


Fig. 2. Antinociceptive effect of the essential oil (EO, i.p.) from aerial parts of *A. ludoviciana* in the hot plate test. All results are presented as mean \pm SEM ($n=8$) of area under the curve (AUC) of latency. Vehicle (VEH, NaCl 0.9%), morphine (MOR, 5 mg/kg). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Dunnett test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to VEH.

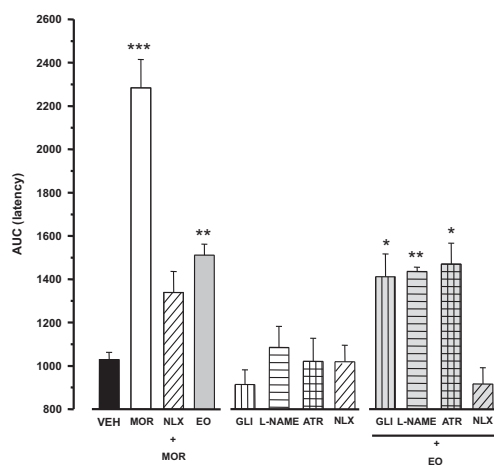


Fig. 3. Antinociceptive action of EO (17.7 mg/kg, i.p.) of *A. ludoviciana* in combination with naloxone (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropine (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamide (GLI, 10 mg/kg, i.p.), and N^G -L-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) using the hot plate test in mice. All results are presented as mean \pm SEM ($n=8$) of area under the curve (AUC) of latency. Vehicle (VEH, NaCl 0.9%), morphine (MOR, 5 mg/kg). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Dunnett test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to VEH.

2.8. Rota-rod test in mice

The rota-rod test was performed according to the method described by Dunham and Myia (1957), and was used for evaluating the activity of EO in motor coordination. Briefly, mice were trained for three days on the rota-rod (model 7600; Ugo Basile) at a constant speed of 16 rotations per minute (rpm), according to their ability to remain on the rotating bar without falling for at least

3 min in undefined attempts. On the test day (24 h after the final training trial), the mice were divided into groups ($n=8$) and pre-treated (i.p.) with VEH, EO (316 mg/kg) or diazepam (DZP, 4 mg/kg). Then, the animals were tested on the rota-rod 30, 45, and 60 min after treatment, and the time the mice remained on top of the bar was recorded at a maximum of 180 s.

2.9. Open field test in mice

The open field test was used to evaluate the effect of EO on locomotor activity. Mice were individually placed on the center of a clean cage similar to the home cage, an acrylic box measuring $20 \times 40 \times 15$ cm³, and divided in eight equal squares; locomotor activity was measured by counting the number of squares crossed with all paws (line-crossings) during a 2 min period. Animals were treated with VEH (i.p.), or EO (316 mg/kg, i.p.), or DZP (4 mg/kg, i.p.) 30 min before the test.

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as a mean \pm SEM and analyzed by a one-way ANOVA, followed by Dunnett's *post hoc* test when the data involved three or more groups. All data were analyzed using the GraphPad Prism program version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); p -values less than 0.05 ($p < 0.05$), 0.01 ($p < 0.01$), and 0.001 ($p < 0.001$) were used as the significance levels.

3. Results and discussion

3.1. Antinociceptive effects of EO

The use of different preparations of *A. ludoviciana* for treating painful complaints prompted us to evaluate the antinociceptive activity of the essential oil (EO) obtained from the aerial parts of the plant using two well-known animal models, the hot plate and paw formalin tests. The formalin test is a useful and reliable model of nociception. It allows an assessment of analgesic action and provides the ability to distinguish the site of action of analgesics, modeling both central and tonic peripheral pain. Formalin induces spontaneous biphasic nociceptive behavior. The first phase reflects centrally mediated pain with release of substance P, while the second (tonic phase) is due to release of histamine, serotonin, bradykinin, and prostaglandins (Tjolsen et al., 1992). The hot plate test measures the nociceptive responses of mice when they are placed on a warmed metal plate at a constant temperature. The latency to a nociceptive response is the time elapsed until the subject licks or flicks its hind paw; both responses are supraspinally integrated (Le Bars et al., 2001).

Injection of 2% formalin solution subcutaneously in the hind paw of mice pretreated with vehicle resulted in intense spontaneous licking of the injected paw with a classic biphasic response. However, pretreatment of the mice with EO (1, 10, 31.6, 100, and 316 mg/kg, i.p.) decreased both the first and second phases of formalin-induced nociception; in the first stage (Fig. 1), the effect was only observed at the highest dose (316 mg/kg, $p < 0.01$) tested, but in the second, the animal responses were attenuated in a dose-dependent manner ($p < 0.01$). The effectiveness of EO (1, 10, 17.7, 31.6, and 100 mg/kg) for attenuating neurogenic pain was corroborated using the hot plate test (Fig. 2). The results indicated a significant ($p < 0.01$) dose-dependent antinociceptive action at the doses of 17.7–100 mg/kg. The mean ED₅₀ value calculated was 25.9 mg/kg. MOR was used as positive control in both tests. It is important to point out that the i.p. route was selected to administer EO in order to improve its bioavailability, since no toxic or

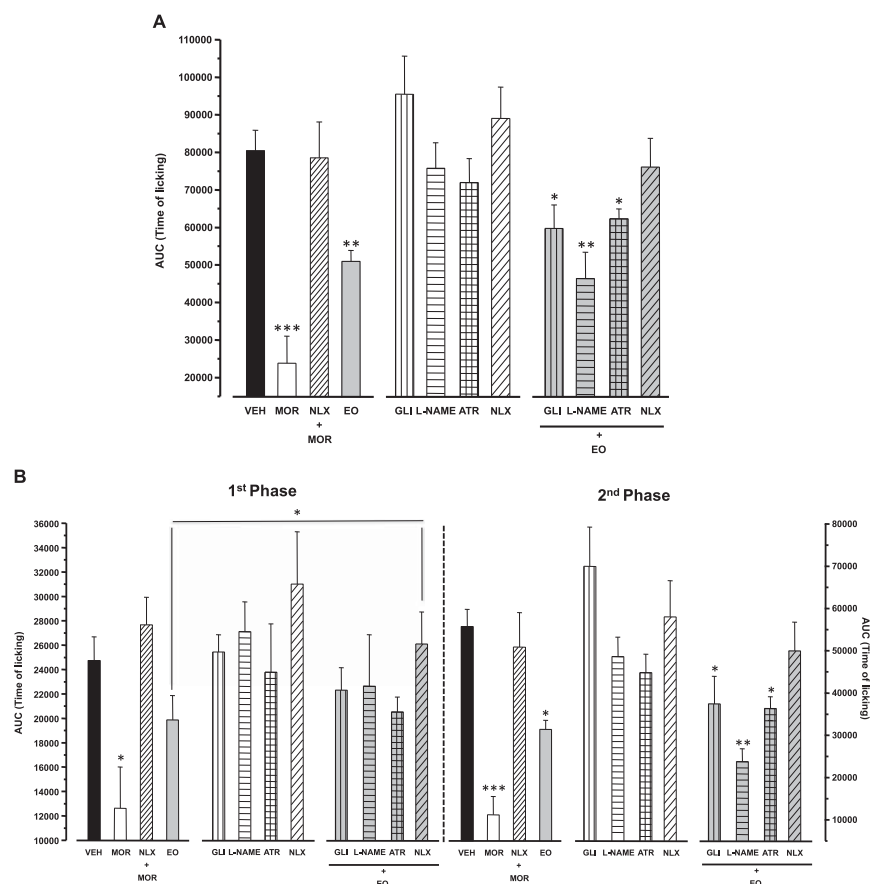


Fig. 4. (A) Antinociceptive action of EO (31.6 mg/kg, i.p.) of *A. ludoviciana* in combination with naloxone (NLX, 1 mg/kg, i.p.), atropine (ATR, 1 mg/kg, i.p.), glibenclamide (GLI, 10 mg/kg, i.p.), and *N*^G-L-nitro arginine methyl ester (L-NAME, 3 mg/kg, i.p.) using the formalin test in mice. (B) Time of licking during phases 1 and 2. All results are presented as mean \pm SEM ($n=8$) of area under the curve (AUC) of time of licking. Vehicle (VEH, NaCl 0.9%, i.p.), morphine (MOR, 5 mg/kg, i.p.). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Dunnett test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to VEH.

hypoglycemic action was observed during oral administration (Anaya-Eugenio et al., 2014).

The mechanism by which EO produces neurogenic antinociception was next examined. In these experiments, mice were pre-treated with NLX (1 mg/kg), a non-selective opioid receptor antagonist; ATR (1 mg/kg), a cholinergic receptor antagonist; L-NAME (3 mg/kg), a NO synthase inhibitor or GLI (10 mg/kg), an ATP-sensitive K^+ channels blocker. In all cases, 30 min after the pretreatment, the animals were administered with EO, VEH or MOR (5 mg/kg) and were subjected to the hot plate (EO, 17.7 mg/kg) or formalin (EO, 31.6 mg/kg) tests. When EO was administered at the dose of 17.7 mg/kg (equivalent to the ED_{40}) its antinociceptive response was only reversed in the presence of NLX (Fig. 3). The same trends of effects were observed in the formalin assay. In the latter case the experiments were carried out at the dose of 31.6 mg/kg (ED_{25} ; Fig. 4). Once more, only the pretreatment with NLX abolished the effect induced by EO. Altogether, these results indicate that EO antinociception involve endogenous

opioid receptors; the effect is similar to that of MOR, since it produces spinal, and supraspinal antinociception when assessed in chemical (formalin) and thermal (hot plate) nociception models in mice. It is well known that the opioids system plays an important role in nociception, participating in both perception and modulation process (Stein and Kuchler, 2013). In addition, a large number of *in vitro* and *in vivo* investigations have demonstrated that peripherally active opioids can reduce the release of pro-inflammatory molecules (Bruehl et al., 2009).

In order to demonstrate that the antinociceptive activity of EO was not due to direct interference on motor function or coordination, the effect of EO on rota-rod and open field tests was assessed. As shown in Fig. 5, mice treated with EO (316 mg/kg) did not exhibit any motor disturbance when assayed in both experimental models. However, DZP (4 mg/kg, i.p.) reduced significantly ($p < 0.01$) the time of mice on the rota-rod or the number of line-crossings in the open field test. These results indicated that the pharmacological effects exerted by EO during the hot plate and

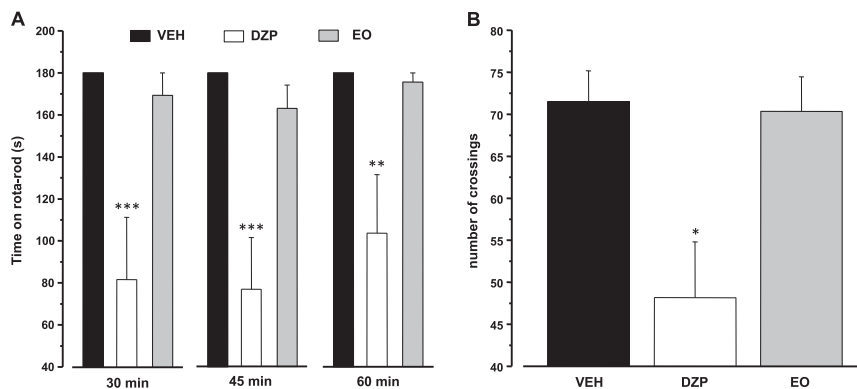


Fig. 5. Effect of essential oil (EO, 316 mg/kg) from *A. ludoviciana* on (A) rota-rod test and (B) open field test in mice. All results are presented as mean \pm SEM ($n=8$). Vehicle (VEH, NaCl 0.9%, i.p.), diazepam (DZP, 4 mg/kg, i.p.). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Dunnett test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to VEH.

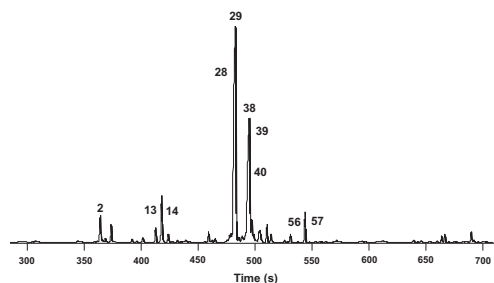


Fig. 6. TIC chromatogram of the essential oil (EO) of *Artemisia ludoviciana*. Peaks: 2-(5*H*)-furanone-5,5-dimethyl- (2); 1,8-cineole (13); lavender lactone (14); isoborneol (28); camphor (29); γ -terpineol (38); borneol (39); terpine-4-ol (40); bornyl acetate (56); myrtenyl acetate (57).

formalin tests are truly antinociceptive. Although, as discussed below, camphor and borneol are the major components of the oil the amount administered of these compounds are considerably below their medium lethal dose (LD_{50}), which in the case of rodents is 1.3 and 1.71 g/kg, respectively (Liu and Gao, 2010; Alsaad et al., 2015).

It is important to point out that other species of the genus *Artemisia* have also shown antinociceptive activity. For example, Maham et al. (2014) reported that the oil of *A. dracunculoides* L. showed peripheral and central antinociceptive effect. *A. absinthium* L. oil also displayed analgesic and anti-inflammatory effects (Hadi et al., 2014). On the other hand, *A. princeps* Pamp oil and its major volatiles, 1,8-cineole and α -terpineol, inhibited the expressions of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α), COX-2, iNOS, the activation of NF- κ B and increased the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Hien-Trung et al., 2011). Altogether, these investigations support our findings.

3.2. Volatile chemical composition analysis

The volatile constituents of *A. ludoviciana* were established through conventional GC-MS analyses of the components obtained by HS-SPME and hydrodistillation. The results are presented in Fig. 6 and Table 1. The essential oil of *A. ludoviciana* was characterized mainly by oxygenated monoterpenes (10

components accounting for 77% of the oil). The most representative were (\pm)-camphor (21%), γ -terpineol (18%), borneol (18%), terpine-4-ol (3.5%), 1,8-cineole (3.4%), lavender lactone (3.4%), isoborneol (2.4%), camphen-6-ol (2.3%), *trans*-sabinyl acetate (2.2%), and bornyl acetate (2.2%). The yield of EO obtained by hydrodistillation of the aerial parts was 0.18% (w/w, dry plant material).

HS-SPME was employed as complementary technique for determining the principal light volatiles components of the plant; CAR/PDMS, CAR/DVB/PDMS, and PDMS-coated fibers were used for solid extraction allowing the identification of 30, 37, and 27 compounds, respectively (Table 1). In all cases *trans*-pinocarveol, 1,8-cineole, camphen-6-ol, (\pm)-camphor, artemiseol, artemisia ketone, borneol, myrtenyl acetate, and bornyl acetate were identified.

The composition of the EO of *A. ludoviciana* found in this work shows similarities, albeit partial, with that reported for the plant material collected in other regions of Mexico, Canada and the USA. In all cases, 1,8-cineole and (\pm)-camphor are the most relevant components (Blust and Hopkins, 1987; Lopes-Lutz et al., 2008). Manjarrez and Medina (1964) identified also ($-$)- α -phellandrene, (+)-limonene, ($-$)-*para*-phellandrene, and borneol, from the oil of the leaves of *A. mexicana*, collected in Mexico City. Zavala-Sánchez and coworkers (2002) found also the presence of *para*- α -dimethyl benzyl alcohol and linalol in the oil of *A. ludoviciana* collected in Huixquilucan, Estado de Mexico, Mexico.

The chemical composition of *A. ludoviciana*'s essential oil further supports its noted antinociceptive activity since (\pm)-camphor, γ -terpineol, borneol, terpine-4-ol, and 1,8-cineole have noted anti-inflammatory and antinociceptive actions. Ehrnhöfer-Ressler et al. (2013) established that 1,8-cineole, borneol, (\pm)-camphor, and thujone reduced the release of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. In addition, (\pm)-camphor, 1,8-cineole, and borneol exhibited analgesic effects through the inhibition of type A1 transient receptor potential (TRP) channels, a chemical nociceptor, involved in nociception and inflammatory pain (Takaishi et al., 2014). Is it important to mention that (\pm)-camphor exhibits a biphasic response on mouse TRPA1 channels in a concentration dependent manner as antagonist (1 mM) or agonist (≥ 1 mM) (Alpizar et al., 2013). Almeida et al. (2013) found that the oral administration of borneol in some animal tests produced antinociceptive and anti-inflammatory effects. On the other hand, the antinociceptive effect of 1,8-cineole

Table 1
Volatile constituents obtained by hydrodistillation and HS-SPME techniques of *A. ludoviciana* identified by GC-MS.

| Compound | LRI ^a | RI ^b | % Area | | | | | Method of identification |
|----------|----------------------------------|-----------------|--------|----------------|------------|--------|------|--------------------------|
| | | | EO | HS-SPME | | | | |
| | | | | (DVB/CAR/PDMS) | (CAR/PDMS) | (PDMS) | | |
| 1 | 1-Hydroxy-2-pentanone | 803 | 805 | 0.4 | – | – | – | a,b |
| 2 | (Z)-Hex-3-en-1-ol | 851 | 859 | 0.1 | – | – | – | a,b |
| 3 | α -Pinene | 936 | 936 | – | – | 0.2 | – | a,b |
| 4 | Benzaldehyde | 941 | 943 | 1.0 | – | – | – | a,b |
| 5 | 2-(5H)-Furanone-5,5-dimethyl- | – | 949 | 1.3 | – | – | – | a,b |
| 6 | Thuja-2,4(10)-diene | 946 | 952 | 0.2 | 0.3 | 0.2 | – | a,b |
| 7 | Camphene | 950 | 956 | 0.1 | – | – | – | a,b |
| 8 | Artemiseol | – | 981 | – | 3.4 | 3.5 | 1.6 | a,b |
| 9 | 2,3-Dehydro-1,8-cineole | 993 | 992 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 10 | 3-Methyl-hepta-1,6-dien-3-ol | – | 997 | 0.1 | – | – | – | a,b |
| 11 | α -Phellandrene | 1002 | 1003 | 0.3 | 0.2 | – | – | a,b |
| 12 | α -Terpinene | 1013 | 1017 | – | 0.2 | 1.0 | – | a,b |
| 13 | <i>para</i> -Cymene | 1015 | 1017 | 0.5 | – | 12.3 | 0.5 | a,b |
| 14 | 1,8-Cineole | 1024 | 1027 | 3.4 | 9.6 | 21.6 | 7.2 | a,b |
| 15 | Lavander lactone | 1024 | 1027 | 3.4 | – | – | – | a,b |
| 16 | Limonene | 1025 | 1030 | – | 4.9 | – | – | a,b |
| 17 | Benzene acetaldehyde | – | 1038 | 0.3 | – | – | – | a,b |
| 18 | β -Ocimene | 1041 | 1042 | 0.1 | – | – | – | a,b |
| 19 | Artemisia ketone | 1044 | 1043 | – | 2.9 | 2.2 | 1.8 | a,b |
| 20 | γ -Terpinene | 1051 | 1052 | – | 0.3 | 0.1 | 0.2 | a,b |
| 21 | <i>trans</i> -Sabinene hydrate | 1053 | 1054 | – | 0.3 | – | 0.9 | a,b |
| 22 | Terpinolene | 1082 | 1086 | – | 0.3 | – | – | a,b |
| 23 | α -Thujone | 1089 | 1190 | 0.8 | 1.2 | 0.8 | 1.0 | a,b |
| 24 | Phenylethyl alcohol | – | 1193 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 25 | β -Thujone | 1103 | 1107 | 0.6 | 5.6 | – | 3.9 | a,b |
| 26 | Camphen-6-ol | 1110 | 1111 | 2.3 | 6.0 | 6.6 | 5.5 | a,b |
| 27 | <i>trans</i> -Sabinol | 1120 | 1120 | – | 12.8 | – | – | a,b |
| 28 | (\pm)-Camphor | 1123 | 1126 | 21.4 | 12.2 | – | 21.2 | a,b |
| 29 | <i>trans</i> -Pinocarveol | 1126 | 1126 | 0.5 | 13.0 | 6.7 | 15.0 | a,b |
| 30 | Sabina ketone | 1132 | 1133 | – | – | 0.2 | – | a,b |
| 31 | <i>trans</i> -Verbenol | 1136 | 1136 | – | – | – | 8.2 | a,b |
| 32 | 3-Caren-10-al | – | 1140 | – | – | 7.5 | – | a,b |
| 33 | Myrtenal | 1136 | 1243 | – | 0.7 | 0.9 | – | a,b |
| 34 | Isoborneol | 1142 | 1148 | 2.4 | – | – | – | a,b |
| 35 | Borneol | 1150 | 1150 | 18.0 | 1.9 | 4.1 | 12.3 | a,b |
| 36 | α -Thujenal | 1158 | 1158 | – | 0.6 | 0.5 | 0.9 | a,b |
| 37 | <i>cis</i> - α -Terpineol | 1159 | 1058 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 38 | Terpine-4-ol | 1164 | 1169 | 3.5 | 0.4 | – | 1.4 | a,b |
| 39 | Isopinocarvone | 1168 | 1169 | – | 0.6 | 1.0 | 0.7 | a,b |
| 40 | (+)-Camphor | 1173 | 1173 | – | 5.7 | 8.6 | – | a,b |
| 41 | α -Terpineol | 1176 | 1179 | 0.9 | – | 0.9 | 1.0 | a,b |
| 42 | Myrtenol | 1178 | 1180 | 0.9 | 5.9 | – | – | a,b |
| 43 | Piperitol | 1181 | 1183 | 1.0 | – | – | – | a,b |
| 44 | <i>cis</i> -Verbenone | 1183 | 1184 | 1.0 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | a,b |
| 45 | Verbenone | 1183 | 1184 | – | 3.6 | – | – | a,b |
| 46 | γ -Terpineol | 1188 | 1184 | 18.0 | – | – | – | a,b |
| 47 | (-)-Myrtenal | 1193 | 1198 | – | 0.6 | 0.9 | 1.4 | a,b |
| 48 | <i>trans</i> -Carveol | 1200 | 1205 | 0.7 | 0.1 | 0.1 | – | a,b |
| 49 | Carvone | 1214 | 1213 | 0.3 | – | – | – | a,b |
| 50 | <i>cis</i> -Mentha-1,8-dien-2-ol | 1217 | 1219 | 0.1 | – | – | – | a,b |
| 51 | Piperitone | 1226 | 1225 | 0.6 | 0.6 | – | – | a,b |
| 52 | Isobornyl formate | 1228 | 1228 | – | – | 0.2 | 0.3 | a,b |
| 53 | <i>cis</i> -Verbenyl acetate | 1266 | 1269 | – | 0.6 | 0.9 | – | a,b |
| 54 | Bornyl acetate | 1270 | 1274 | 2.2 | 1.5 | 2.5 | 2.7 | a,b |
| 55 | <i>trans</i> -Sabinyl acetate | 1278 | 1278 | 2.2 | – | – | – | a,b |
| 56 | Carvacrol | 1278 | 1379 | – | 0.2 | 0.8 | – | a,b |
| 57 | <i>para</i> -Cumenol | 1289 | 1286 | 0.7 | – | – | – | a,b |
| 58 | Myrtenyl acetate | 1313 | 1312 | – | 2.5 | 2.2 | 5.5 | a,b |
| 59 | 6-methyl-5-Hepten-2-one- | 1325 | 1321 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 60 | Eugenol | 1331 | 1358 | 0.4 | – | – | – | a,b |
| 61 | Cuminal | 1350 | 1338 | – | 0.3 | – | 0.4 | a,b |
| 62 | Ylangeno | 1375 | 1373 | – | 0.1 | – | 0.2 | a,b |
| 63 | Caryophyllene | 1421 | 1423 | – | – | 0.7 | – | a,b |
| 64 | Aromadendrene | 1443 | 1448 | – | 0.4 | – | 0.8 | a,b |
| 65 | α -Caryophyllene | 1467 | 1464 | – | – | 0.3 | – | a,b |
| 66 | Curcumene | 1473 | 1471 | – | 0.2 | 0.2 | 0.4 | a,b |
| 67 | Germacrene D | 1479 | 1450 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 68 | Davanone | 1539 | 1538 | 0.2 | – | – | – | a,b |
| 69 | (-)-Spathulenol | 1572 | 1574 | 0.8 | – | – | – | a,b |
| 70 | Caryophyllene oxide | 1546 | 1647 | 0.9 | 0.2 | – | 0.6 | a,b |
| 71 | Longiverbenone | 1641 | 1640 | 1.9 | – | – | – | a,b |

Table 1 (continued)

| Compound | LRI ^a | RI ^b | % Area | | | Method of identification |
|-----------|------------------|-----------------|--------|----------------|------------|--------------------------|
| | | | EO | HS-SPME | | |
| | | | | (DVB/CAR/PDMS) | (CAR/PDMS) | |
| Total (%) | | | 94.7 | 99.7 | 87.9 | 95.9 |

(-): Compound not detected. a: retention time. b: mass spectrum.

^a LRI: retention indexes on DB-5 capillary column literature.

^b RI: retention indexes on DB-5 capillary column.

also has been demonstrated using several tests in mice (Santos and Rao, 2000). Furthermore, Quintans-Júnior et al. (2011) showed that the antinociceptive response induced by α - and γ -terpineol, is mediated by a central analgesic mechanism. The presence of *trans*-caryophyllene could also contribute to the overall effect of EO by decreasing acute and chronic pain, throughout opioid and endocannabinoid systems (Paula-Freire et al., 2014). Finally, terpine-4-ol suppressed the production of TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-10 and PGE2 by LPS-activated monocytes (Hart et al., 2000).

In summary, these previous studies show that some EO constituents of *A. ludoviciana* *in vitro* have effects on the inflammatory process from the release or inhibition of typical expression of pro-inflammatory cytokines as well as TPRA1 antagonism.

4. Conclusions

This research provides rigorous scientific preclinical evidence which supports the ancient use of *A. ludoviciana* herbal remedies for treating painful complaints, while documenting biological mechanisms of action. The neurogenic and peripheral antinociceptive effects of the essential oil of the plant were demonstrated; since these effects were partially blocked by naloxone, an opioid mechanism action was proposed. The presence in significant amounts of (\pm)-camphor, γ -terpineol, borneol, terpine-4-ol, and 1,8-cineole in the oil could be related with its antinociceptive action. From primary health care point of view, the results of this investigation will promote the rational use and preservation of this valuable indigenous medical resource.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-217516) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 219765). The authors thank the technical assistance Araceli Pérez-Vasquez, and Georgina Duarte. The valuable help of Dr. Andrés Navarrete, Krutzkaya Juárez, and Berenice Ovalle is also recognized. G.D. Anaya-Eugenio acknowledges the fellowship from CONACYT to pursue graduate studies.

References

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P., 2012. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 17, 2542–2566.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy, Fourth ed. Allured Publishing Corporation, Chicago.
- Almeida, G.S.J.R., Souza, R.G., Silva, C.J., Saraiva, L.G.S.R., Júnior, O.G.R., Quintans, S.S. J., Barreto, S.S.R., Bonjardim, R.L., Cavalcanti, H.C.S., Junior, Q.L.J., 2013. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *Sci. World J.* 2013, 1–5.
- Alpizar, Y.A., Gees, M., Sanchez, A., Voets, T., Nilius, B., Talavera, K., 2013. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TPRA1. *Pflugers Arch.* 465, 853–864.
- Alsaad, A.M.S., Fox, C., Koren, G., 2015. Toxicology and teratology of the active ingredients of professional therapy MuscleCare products during pregnancy and lactation: a systematic review. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 40.
- Anaya-Eugenio, G.D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., Mata, R., 2014. Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *J. Ethnopharmacol.* 155, 416–425.
- Argueta, V.A., Cano, A.L.M., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Vol. II. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., pp. 628–630.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oil – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Blust, H.M., Hopkins, T.L., 1987. Gustatory responses of a specialist and a generalist grasshopper to terpenoids of *Artemisia ludoviciana*. *Entomol. Exp. Appl.* 45, 37–46.
- Bruehl, S., Burns, J.W., Chung, O.Y., Chont, M., 2009. Pain-related effects of trait anger expression: neural substrates and the role of endogenous opioid mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 475–491.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Aguilar, A., 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 108, 367–370.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122, 402–405.
- Dunham, N.W., Myia, T.S., 1957. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* 46, 208–209.
- Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J.M., Walker, J., Rychlik, M., Somoza, V., 2013. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3451–3459.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-barajas, M., 2012. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *J. Ethnopharmacol.* 139, 513–518.
- Figueiredo, S.M.G., Zardo, S.R., Silva, V.B., Violante, C.A., Fernandes, D.P., 2013. Convolutamydine A and synthetic analogues have antinociceptive properties in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 431–439.
- Hadi, A., Hossein, N., Shirin, P., Najmeh, N., Abolfazi, M., 2014. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Artemisia absinthium* and chemical composition of its essential oil. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 38, 237–244.
- Hart, P.H., Brand, C., Carson, C.F., Riley, T.V., Prager, R.H., Finlay-Jones, J.J., 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* 49, 619–626.
- Heinrich, M., 2002. Ethnobotany, phytochemistry and biological/pharmacological activities of *Artemisia ludoviciana* ssp. mexicana (Estafiate). In: Colin, W.W. (Ed.), *Artemisia*. Taylor and Francis Inc., New York, USA, pp. 107–111.
- Hien-Trung, T., In-Ah, L., Yang-Jin, H., Dong-Hyun, K., 2011. *Artemisia princeps* Pamp. Essential oil and its constituents eucalyptol and α -terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF- κ B activation. *Planta Med.* 77, 1996–2002.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Jakupovic, J., Tan, R.X., Bohmann, F., Boldt, P.E., Jia, Z.J., 1991. Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana*. *Phytochemistry* 30, 1573–1577.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Liu, J., Gao, M., 2010. Experimental study of acute toxicity of borneol on rat. *Chin. J. Public Eng.* 9, 360–361.
- Liu, Y.L., Mabry, T.J., 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry* 21, 209–214.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Kolodziejczyk, P.P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69, 1732–1738.
- Maham, M., Moslemzadeh, H., Jalilzadeh-Amin, G., 2014. Antinociceptive effect of

- the essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*). *Pharm. Biol.* 52, 208–212.
- Malagón, F., Vázquez, J., Delgado, G., Ruiz, A., 1997. Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in a rodent malaria model. *Parasitologia* 39, 3–7.
- Manjarrez, A., Medina, F., 1964. The analysis of the volatile oils of the leaves of *Artemisia mexicana* and *Artemisia klotzchiana*. *Can. J. Chem.* 42, 2085–2088.
- Mata, R., Delgado, G., Romo del Vivar, A., 1984. Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *angustifolia*. *Phytochemistry* 23, 1665–1668.
- Paula-Freire, L.I.G., Andersen, M.L., Gama, V.S., Molska, G.R., Carlini, E.L.A., 2014. The oral administration of *trans*-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. *Phytomedicine* 21, 356–362.
- Quintans-Júnior, L.J., Oliveira, M.G.B., Santana, M.F., Santana, M.T., Guimaraes, A.G., Siqueira, J.S., De Sousa, D.P., Almeida, R.N., 2011. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharm. Biol.* 49, 583–586.
- Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Huerta-Reyes, M., Tortoriello-García, J., 2009. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 8, 380–388.
- Ruiz-Cancino, A., Cano, A.E., Delgado, G., 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry* 33, 1113–1115.
- Santos, F.A., Rao, V.S.N., 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. Res.* 14, 240–244.
- Stein, C., Küchler, S., 2013. Targeting inflammation and wound healing by opioids. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 303–312.
- Takaishi, M., Uchida, K., Fujita, F., Tominaga, M., 2014. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. *J. Physiol. Sci.* 64, 47–57.
- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
- Wojcikowski, K., Gobe, G., 2014. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytother. Res.* 28, 22–27.
- Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez-Saldivar, D., Arias-García, L., 2002. Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharm. Biol.* 40, 263–268.
- Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.