



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO
ACUOSO DE LA PARTE AÉREA DE
Calea integrifolia (DC.) Hemsl. SOBRE LA
GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA EN
RATAS STZ-NA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CID ROBLES MARÍA YOKEBED



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**

Ciudad Universitaria, Cd.Mx.,2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad que me brindó al prepararme profesional y personalmente con educación de calidad, otorgándome grandes oportunidades y aprendizajes haciendo que me sienta muy orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios.

A la DGAPA PAPIIT (Proyecto IN228216) por los recursos brindados como apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por permitirme ser parte de su laboratorio, por darme la confianza de llevar a cabo este proyecto, así como ofrecerme grandes oportunidades que me permitieron crecer profesionalmente. También gracias por la paciencia, el respeto y el gran equipo de trabajo con el que me recibió.

De igual forma al Dr. René de Jesús Cárdenas, a la Dra. Patricia Guevara Fefer, a la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera, por sus valiosos comentarios y su tiempo otorgado a la revisión de este proyecto.

Finalmente, a la M. en C. Artemisa Espinoza, a la M. en C. Daniela Moreno y al M. en C. Gerardo Mata, por ser uno de los mejores referentes de lo que un profesor debería ser. Muchas gracias por la paciencia, la excelente disposición y transmisión de conocimientos, por el apoyo incondicional tanto profesional como personal. Agradezco infinitamente su entrega durante todo este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mí mamá Lulú por siempre quererme y apoyarme en cualquiera de mis decisiones, por impulsarme a ser una mejor persona, por enseñarme los valores que ahora me forman como individuo, así como ser uno de mis grandes ejemplos tanto profesional como personal. Del mismo modo a mi hermano Isaac por ser un ser lleno de luz que me hizo sonreír en mis momentos de quiebre.

A mis abuelos, Cristina, Margarita y Simitrio por siempre apoyarme e impulsarme para esforzarme cada día más, por todo su cariño y dedicación. A mi familia en general, que son y serán parte fundamental en mi carrera, por el apoyo, cariño, orgullo y disposición que mostraron en mí.

A mi hermana Ambar, por ser una amiga incondicional, por impulsar mis proyectos profesionales y personales, creer en mí, regañarme y acompañarme en todo momento.

Finalmente, y no menos importante a mis amigos principalmente a Abi mi compañera de danza, la cual siempre me ha mostrado su apoyo y su cariño incondicional, que ha sido parte fundamental en mi carrera y en mi vida. Al “Sitio”, mis amigos de la universidad que fueron y serán un pilar indispensable durante mi carrera, que me enseñaron a amar la Biología y ver la vida de otra forma, gracias por las experiencias y la amistad que siempre me mostraron.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1. DIABETES MELLITUS	3
1.1 CLASIFICACIÓN	3
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	7
2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	10
3. FISIOPATOLOGÍA DE DIABETES MELLITUS TIPO II	14
4. REGULACIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA	17
4.1 GLUCONEOGÉNESIS	17
4.2 REGULACIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS POR INSULINA Y SU ALTERACIÓN EN DM2	20
4.3 INHIBICIÓN DE LA VÍA GLUCONEOGÉNICA POR MEDIO DE LA METFORMINA	21
4.4 GLUCOSA-6-FOSFATASA COMO BLANCO TERAPÉUTICO	24
4.5 INHIBIDORES NATURALES DE G6PASA T1	26
5. ETNOFARMACOLOGÍA	28
6. CALEA INTEGRIFOLIA (DC.) HEMSL.	30
6.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	30
6.2 DISTRIBUCIÓN	31
6.3 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS, FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS	31
7. MODELO STZ-NA	33
JUSTIFICACIÓN	35
OBJETIVOS	36
HIPÓTESIS	37

METODOLOGÍA	38
1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	38
2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>C. INTEGRIFOLIA</i>	38
3. CÁLCULO DE DOSIS	38
4. EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> DE LA INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA	39
4.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	39
4.2 INDUCCIÓN DEL MODELO STZ-NA	39
4.3 PRUEBAS DE TOLERANCIA AL PIRUVATO	39
5. INHIBICIÓN DE LA G6PASA POR MEDIO DE EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	41
5.1 OBTENCIÓN DE MICROSOMAS	41
5.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE GLUCOSA-6-FOSFATASA DE LOS MICROSOMAS	41
5.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA G6PASA	42
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
RESULTADOS	44
1. CÁLCULO DE DOSIS	44
2. PRUEBA DE TOLERANCIA AL PIRUVATO	44
3. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE G6PASA	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS	55

Índice de figuras

Figura 1. Etapas del desarrollo de la DM1	4
Figura 2. Número de personas en el mundo que padecieron DM en el año 2019 y su proyección para el año 2030 y 2045	9
Figura 3. Homeostasis de la glucosa	11
Figura 4. Representación de la vía de señalización de la insulina	13
Figura 5. Fisiopatología de la DM2	16
Figura 6. Esquema de la gluconeogénesis	19
Figura 7. Esquema de la regulación de la gluconeogénesis por insulina	21
Figura 8. Esquema de los mecanismos de acción de la metformina en el hepatocito	24
Figura 9. Esquema del sistema enzimático de G6Pasa	26
Figura 10. Estructura del ácido 5-o-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico)	27
Figura 11. Ejemplar de herbario de <i>C. integrifolia</i>	30
Figura 12. Mapa de la distribución de <i>C. integrifolia</i> en México	31
Figura 13. Mecanismo de inducción del modelo STZ-NA	34
Figura 14. Gráfica de los valores medios de glucosa plasmática \pm error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato	46
Figura 15. Gráfica de AUC de los valores medios de glucosa plasmática \pm error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato	47
Figura 16. Curvas de inhibición concentración-respuesta de la actividad enzimática de G6Pasa	49

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros de diagnóstico para DM	6
Tabla 2. Grupos experimentales para las pruebas de tolerancia a piruvato con su respectivo tratamiento y dosis	40
Tabla 3. Valores medios de glucosa plasmática \pm error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato	46

Abreviaturas

AC	adenilato ciclasa
ADA	American Diabetes Association
ADP	adenosín difosfato
Akt	Proteína cinasa B
AMP	adenosín monofosfato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína cinasa activada por AMP
ATP	adenosín trifosfato
AUC	área bajo la curva
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad
DAG	diacilglicerol
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DMG	diabetes mellitus gestacional
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPP-IV	dipeptidil peptidasa-IV
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F1,6BPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
FMD	Federación Mexicana de Diabetes A.C.
FOXO1	Forkhead box O1
G3P	gliceraldehído-3-fosfato
G6P	glucosa-6-fosfato
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GLUT2	transportador de glucosa 2
GLUT4	transportador de glucosa 4
GLP-1	péptido similar al glucagón tipo 1
GS	glucógeno sintasa
GSK3	glucógeno sintasa cinasa 3
GTP	guanósín trifosfato
H	grupo control hiperglucémico
HbA1c	hemoglobina glicada
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfónico
HGP	producción de glucosa hepática
HP	grupo control hiperglucémico con piruvato
HPM	grupo control hiperglucémico con piruvato y metformina
HPCi	grupo hiperglucémico con piruvato y extracto de <i>C. integrifolia</i>
IC50	concentración inhibitoria 50
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
i.p.	intraperitoneal
IRE	elementos de respuesta a insulina
IRS	sustratos del receptor de insulina
i.v.	intravenoso

LDH	lactato deshidrogenasa
mGPD	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial
N	grupo control normoglucémico
NA	nicotinamida
NAD⁺/NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NEFA	ácidos grasos no esterificados
NP	grupo control normoglucémico con piruvato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP-1	poli(ADP-ribosa) polimerasa 1
PC	piruvato carboxilasa
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PFK-1	fosfofructocinasa-1
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína cinasa C
p.o.	vía oral
RI	resistencia a la insulina
SDS	dodecilsulfato sódico
STZ	estreptozotocina
T1	translocasa 1 de G6P
T2	translocasa 2 de fosfato
T3	translocasa 3 de glucosa

Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un conjunto de enfermedades crónicas caracterizado por presentar hiperglucemia, que es resultado de la resistencia a la insulina (RI) presente en los tejidos diana y de una insuficiencia en la secreción de esta hormona por daños en las células β pancreáticas. El uso de medicina tradicional ha persistido por ser una parte fundamental para la cultura mexicana y gracias a ciencias como la Etnofarmacología se han reportado una gran cantidad de especies vegetales utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la DM2, lo que ha dado pauta a investigaciones que permiten conocer los componentes químicos, así como los mecanismos de acción por los cuales ejercen su efecto hipoglucemiante.

La producción constante de glucosa por la vía gluconeogénica por parte del hígado es un factor fundamental para el desarrollo de la DM2. Por lo que la inhibición de dicha vía podría ser considerada como un blanco terapéutico para el control de la glucemia dado que estudios anteriores han revelado que existen plantas con propiedades hipoglucemiantes capaces de inhibir o reducir la producción de glucosa por parte del hígado. Por tal motivo, en el presente trabajo, se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. sobre la gluconeogénesis hepática *in vivo* e *in vitro*.

En este estudio se llevó a cabo la evaluación *in vivo*, se realizaron pruebas de tolerancia al piruvato en ratas con hiperglucemia inducida con el modelo de STZ-NA (estreptozotocina-nicotinamida). Por otro lado, la evaluación *in vitro* consistió en pruebas de concentración-respuesta en microsomas hepáticos de rata, con el fin de observar la inhibición de la actividad enzimática de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), una de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis, por medio de la obtención de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del extracto.

Como resultado de la prueba de tolerancia al piruvato se observó que el extracto acuoso de *C. integrifolia* evitó el aumento de la glucosa plasmática a lo largo del experimento, en comparación con el grupo control; mientras que en la curva de inhibición concentración-respuesta se presentó una disminución en la actividad de la enzima G6Pasa con una IC₅₀ de 406 $\mu\text{g/ml}$. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que uno de los

mecanismos de acción por los que *C. integrifolia* ejerce su efecto hipoglucemiante es la inhibición de la vía gluconeogénica, por lo que se sugiere la realización de estudios que permitan esclarecer la composición fitoquímica y los mecanismos de acción relacionados con la reducción de la producción de glucosa inducida con esta planta.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no la utiliza eficazmente, provocando un estado de hiperglucemia (Organización Mundial de la Salud, 2020). Uno de los tipos más frecuentes y con mayor importancia es la diabetes mellitus tipo (DM2) ya que se ha considerado un problema de salud a nivel mundial debido a que representa al menos el 90% del total de casos. Dicha afección se caracteriza por presentar hiperglucemia, la cual es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona, la cual se define como resistencia a la insulina (RI) (International Diabetes Federation, 2019).

Cualquier alteración en la homeostasis de la glucosa provocada por esta enfermedad, predispone a un aumento en las vías de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis, llevadas a cabo principalmente por el hígado, condicionando así el incremento de glucosa circulante (Riaño & Suárez, 2006). La gluconeogénesis es una vía metabólica para la síntesis de glucosa a partir de sustratos diferentes de los carbohidratos (Engelking, 2015).

Debido a que la producción de glucosa *de novo* es constante en pacientes con DM2, el inhibir la vía gluconeogénica sería un buen blanco terapéutico para la disminución de glucosa plasmática. En este contexto, existen moléculas naturales y sintetizadas químicamente que permiten la inhibición de la gluconeogénesis para el tratamiento de este trastorno; una de ellas es el ácido clorogénico, un producto natural que inhibe directamente la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) con efectos relevantes sobre la gluconeogénesis hepática (Tajik, Tajik, Mack, & Enck, 2017).

La ciencia encargada del estudio farmacológico de estas moléculas es la Etnofarmacología, por medio de la cual se han logrado conocer e identificar productos naturales biológicamente activos utilizados tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades como la DM. En el año 2005, se obtuvo un registro realizado por Andrade-Cetto & Heinrich, en el cual se dieron a conocer las plantas utilizadas en el tratamiento de la DM2 en la medicina tradicional Mexicana. Una de estas plantas fue *Calea integrifolia*, la

cual cuenta con estudios previos sobre su efecto hipoglucemiante y su efecto sobre la inhibición de α -glucosidasas; aun faltando por caracterizar su efecto sobre la inhibición de la producción de glucosa hepática, otro de los mecanismos de acción relevantes reportados para las plantas medicinales.

Antecedentes

1. Diabetes mellitus

La DM se define como un conjunto de enfermedades que se caracteriza por presentar niveles elevados de glucosa en sangre o hiperglucemia crónica, causada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, que conducen a que el organismo deje de producir o no produzca suficiente cantidad de la hormona denominada insulina, o no logre utilizar dicha hormona de modo eficaz (Couselo-Fernández & Rumbo-Prieto, 2018). De acuerdo a su origen, este trastorno metabólico se clasifica en cuatro tipos de diabetes: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional y otros tipos de diabetes menos frecuentes, relacionados principalmente con deficiencias genéticas (International Diabetes Federation, 2019).

1.1 Clasificación

- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

Este tipo de diabetes ocurre en personas genéticamente predisuestas y se caracteriza por la presencia de anticuerpos que actúan específicamente contra las células β de los islotes pancreáticos secretores de insulina. Sin embargo, no todos los pacientes con DM1 presentan las mismas características, por lo que se ha clasificado en: autoinmune, que se presenta en la mayoría de los pacientes, y se observan linfocitos T activados para la destrucción selectiva de las células β ; y la idiopática, que engloba a los pacientes con características particulares y no hay presencia de autoinmunidad (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014).

En las primeras etapas de la enfermedad, no se muestran alteraciones respecto a los niveles de glucosa en sangre debido a que, a pesar de haber una destrucción de las células, ésta no se ve reflejada ya que existe una reserva pancreática que permite mantener la euglucemia; conforme la enfermedad se va desarrollando aumenta la destrucción de las células β por lo tanto comienza a existir una disminución en los niveles de insulina y un aumento en la concentración de glucosa plasmática. Cuando la mayoría de las células β son destruidas se desarrolla la DM1 (**Fig. 1**) (Zaccardi, Webb, Yates, & Davies, 2016).

Es importante que, posterior al diagnóstico, los niveles de glucemia se mantengan estables ya que, de no ser así, podrían presentarse complicaciones asociadas a la enfermedad; también, es necesario preservar y proteger las células β aún restantes (Picardi et al., 2006).

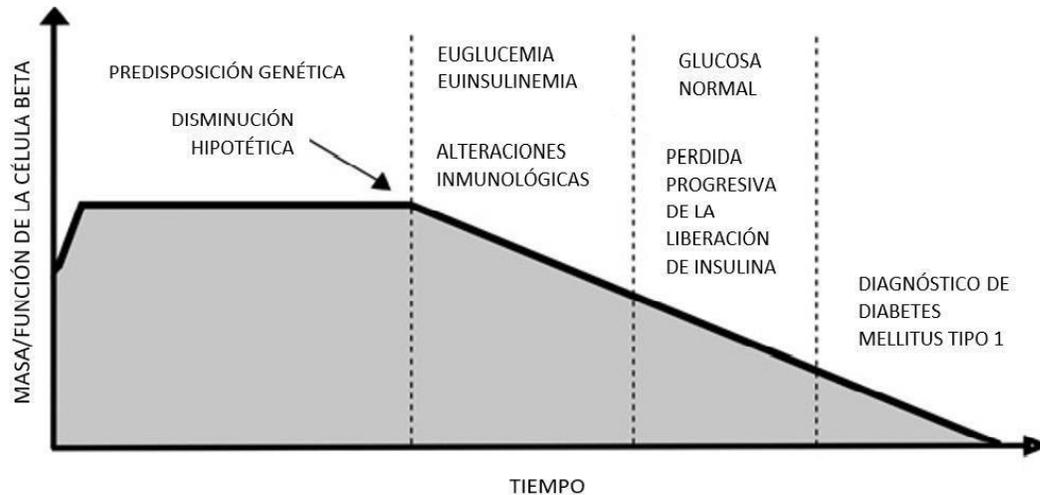


Figura 1. Etapas del desarrollo de la DM1. Se pueden observar las diferentes fases de la pérdida de masa y función de la célula β conforme transcurre la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo. Tomada y modificada de (Atkinson et al., 2014).

- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

Es un padecimiento caracterizado por un desequilibrio en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y resulta de una disminución progresiva de la secreción de insulina por las células β pancreáticas sobre un fondo de resistencia a la insulina (RI) preexistente en el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo (DeFronzo et al., 2015).

Este trastorno se ha considerado un problema de salud a nivel mundial debido a que representa al menos el 90% de todos los casos de DM. Las causas que la desencadenan se desconocen en el 70-85% de los pacientes; no obstante, influyen diversos componentes como la herencia poligénica, junto con factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

Los pacientes con DM2 no presentan manifestaciones clínicas o éstas son mínimas durante varios años antes del diagnóstico; incluso esta enfermedad puede ser precedida

por prediabetes, la cual se refiere a la condición en la que los valores de glucosa en plasma son más altos que los niveles normales pero aún más bajos que los utilizados para el diagnóstico de diabetes (Rajput, Garg, & Rajput, 2019).

En muchas ocasiones los síntomas que se llegan a presentar son difíciles de detectar ya que pueden confundirse o asociarse a otras enfermedades. De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) (2019), la sintomatología de la DM2 va desde una constante necesidad de orinar (poliuria), sed inusual (polidipsia), hambre excesiva (polifagia), pérdida inusitada de peso, fatiga e irritabilidad extremas (astenia); hasta infecciones frecuentes, visión borrosa, cortes o moretones que tardan en sanar, hormigueo o entumecimiento en las manos o los pies e infecciones recurrentes en la piel, encías o vejiga, por lo general estas últimas se presentan conforme se va desarrollando la enfermedad, por lo cual es importante realizarse pruebas constantes para un diagnóstico temprano.

Para llevar a cabo un diagnóstico es necesario realizar pruebas de laboratorio, en las cuales se miden las concentraciones de glucosa en sangre bajo distintas condiciones. A continuación se menciona cada una de ellas detalladamente:

- Glucosa plasmática en ayunas: esta prueba generalmente se realiza a primera hora de la mañana con 8 horas de ayuno, el diagnóstico es positivo cuando los niveles glucémicos son mayores a 200 mg/dl.
- Tolerancia a la glucosa oral: se miden los niveles glucémicos en la sangre antes y después de ingerir 75 g de glucosa en ayuno, realizando mediciones cada 30 min por 2 horas, una persona es diagnosticada como diabética tipo 2 cuando los niveles de glucemia están arriba de los 200 mg/dl.
- Prueba aleatoria de glucosa plasmática: consiste en un análisis de sangre en cualquier momento del día, una persona es diagnosticada con DM2 cuando presenta glucosa sanguínea superior a los 200 mg/dl.
- Prueba de hemoglobina glicada (HbA1c): cuantifica el nivel promedio de glucosa en la sangre durante los últimos 2 o 3 meses, dichos niveles de hemoglobina glicada deben encontrarse por encima de 6.5% (American Diabetes Association, 2019).

De acuerdo a los parámetros determinados por la ADA (2019) para el diagnóstico de DM2 (**Tabla 1**), si el análisis de sangre es normal, se deben repetir las pruebas cada 3 años; sin embargo, si la prueba indica prediabetes, se deben repetir cada 1 a 2 años, ya que algunos individuos clasificados como prediabéticos (alrededor del 10%) pueden desarrollar este trastorno (Alpert, 2016). De acuerdo a los parámetros establecidos, si se diagnostica DM2, es necesario acudir al médico para recibir el tratamiento adecuado.

Tabla 1. Parámetros de diagnóstico para DM. Se muestran las pruebas para el diagnóstico de DM, así como los niveles de corte de la concentración de glucosa normal, con prediabetes y diabetes.

Prueba	Normal	Prediabetes	Diabetes
Glucosa plasmática en ayunas	<100 mg/dl	100 – 125 mg/dl	≥ 126 mg/dl
Tolerancia a la glucosa	<140 mg/dl	140 – 199 mg/dl	≥ 200 mg/dl
Glucosa al azar	<100mg/dl	-	≥ 200 mg/dl
Hemoglobina glicada (HbA1c)	<5.7%	5.7 – 6.4%	≥ 6.5%

Modificada de (American Diabetes Association, 2019).

Si esta enfermedad no es diagnosticada a tiempo o no se le da un tratamiento adecuado pueden presentar una serie de complicaciones crónicas consecuencia de hiperglucemia crónica; estas se clasifican en dos tipos, microvasculares y macrovasculares. Las microvasculares dañan a los vasos sanguíneos más pequeños y abarcan retinopatía, nefropatía y neuropatía; mientras que las complicaciones macrovasculares dañan directamente las arterias, lo cual, es causante de enfermedades cardiovasculares acelerada que resulta en un infarto de miocardio y enfermedad cerebrovascular (Forbes & Cooper, 2013).

- Diabetes gestacional (DMG)

Es una forma de diabetes que consta de altos niveles de glucosa en la sangre durante el embarazo. Se desarrolla del 3 al 5% de embarazos a nivel mundial y se asocia con complicaciones tanto para la madre y el feto. El 80% de los casos se debe a una insuficiencia en la producción de insulina por las células β pancreáticas para compensar la resistencia fisiológica del embarazo a la insulina. Mientras que el otro 20% corresponde a un incremento de la RI la cual no se ve compensada por una respuesta pancreática normal (Contreras-Zúñiga et al., 2008).

Al igual que los otros tipos de diabetes se caracteriza por una insuficiencia en la producción de insulina por las células β pancreáticas para satisfacer las necesidades de insulina del cuerpo, y puede desarrollarse por las mismas causas en general, incluidas las enfermedades autoinmunes, las causas monogénicas y RI (Buchanan, Xiang, Kjos, & Watanabe, 2007).

- Otros tipos

Los otros tipos de diabetes son más específicos e incluyen una gran variedad de condiciones poco frecuentes como son: defectos genéticos de la función de la célula β , deficiencias genéticas en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, inducción por fármacos o químicos, infecciones ocasionadas por virus, diabetes mediada inmunológicamente, e incluso otros síndromes genéticos asociados a diabetes. En la mayoría de estos casos para el diagnóstico es necesario un análisis genético acertado, ya que sus síntomas son similares a los presentados en DM1 y DM2 (Kherra, Blouin, Santoni, & Schwitzgebel, 2017).

1.2 Epidemiología

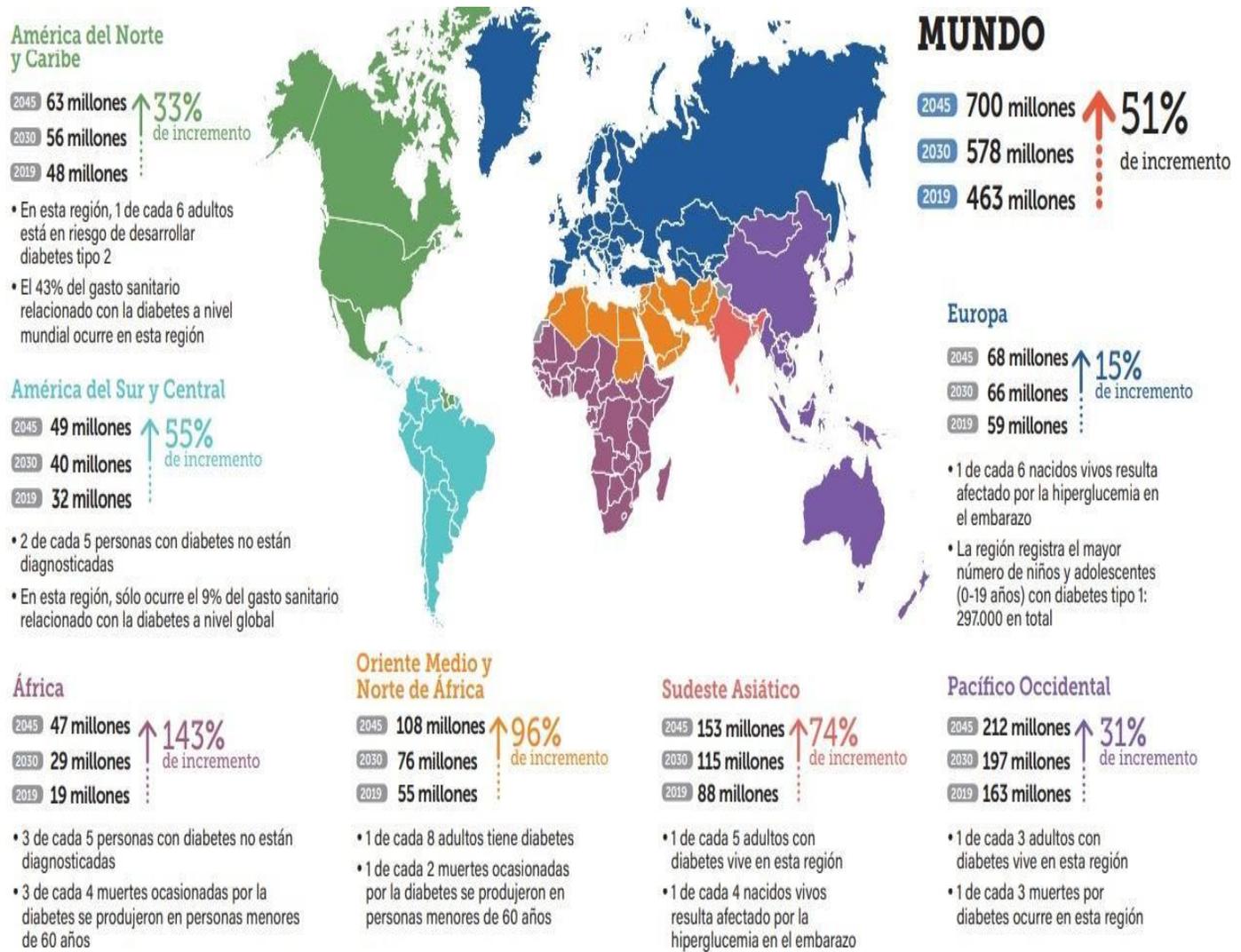
La diabetes, a lo largo de los años, se ha convertido en una de las mayores emergencias sanitarias a nivel mundial del siglo XXI. En los últimos años, esta afección ha tenido un gran auge en la mayoría de los países debido a la gran cantidad de personas que la padecen, así como los gastos que representa su tratamiento. Se estima que en la actualidad aproximadamente 463 millones de adultos presentan esta enfermedad en el mundo, y se espera que en el año 2045 esa cifra aumente a 700 millones (**Fig.2**) (International Diabetes Federation, 2019).

México se encuentra dentro de los diez países con mayor número de personas con diabetes y se estima que esta cifra incrementará para el año 2030 representando hasta el 7.7% de la población adulta en el mundo (Canché-Aguilar, Zapata-Vázquez, Rubio-Zapata, & Cámara-Vallejos, 2019). El Instituto Nacional de Estadística y Geografía, en el año 2016 reportó a la DM2 como la segunda causa de muerte en el país con un 15.4% de la población diagnosticada con este padecimiento (Federación Mexicana de Diabetes., 2018).

Los datos arrojados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de Medio Camino 2018, reportaron que la prevalencia nacional de DM2 es del 10.3% del cual el 11.4% son mujeres, mientras que el 9.1% son hombres; de estos casos por lo menos el 90% se relacionan principalmente con sobrepeso y obesidad. Así mismo, se ha reportado que el 87.7% de los pacientes reciben un tratamiento para el control de dicha enfermedad, sin embargo, menos del 50% de los mismos no realizan actividades preventivas para evitar o retrasar complicaciones (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018).

El tratamiento para esta patología ha generado un gran impacto en la economía del país, ya que ha llegado a representar hasta el 15% de los recursos invertidos por las instituciones de salud en México. De acuerdo a estudios realizados entre los años 2008 y 2013 se demostró que el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) es una de las instituciones que destina mayor cantidad de recursos al tratamiento, principalmente a las complicaciones generadas por DM; dicha institución durante este periodo invirtió un total de 1,563 millones de dólares por hospitalizaciones debidas a DM, de las cuales, las complicaciones diagnosticadas significaron un costo del 83.02% y un costo anual aproximado de 260 millones de dólares (Salas-Zapata, Palacio-Mejía, Aracena-Genao, Hernández-Ávila, & Nieto-López, 2018).

Figura 2. Número de personas en el mundo que padecieron DM en el año 2019 y su proyección para el año 2030 y 2045. Estimación en porcentaje del número de personas que padecerán DM en el año 2030 y 2045 en diferentes regiones del mundo. Tomada de (International Diabetes Federation, 2019).



2. Homeostasis de la glucosa

Los organismos vivos son sistemas abiertos capaces de mantener una estabilidad interna que les permite llevar a cabo sus funciones, a este proceso se le conoce como homeostasis. Para la mayoría de los organismos, entre ellos los humanos, la glucosa es de gran importancia debido a que es la mayor fuente de energía para todas las células, por lo que es indispensable que los niveles sanguíneos de éstas permanezcan en un rango de 70-100 mg/dl y así mantener un balance entre la entrada de glucosa a la circulación y su captación por los tejidos periféricos (**Fig. 3**) (Bermúdez et al., 2007; Osorio & Salceda, 2012).

El cerebro es el órgano con mayor necesidad de glucosa ya que es su principal fuente de energía, además de ser incapaz de sintetizarla, por lo que es necesario un aporte continuo. La glucosa plasmática proviene de tres fuentes principales: absorción intestinal procedente de la digestión de carbohidratos a partir de la dieta, degradación de glucógeno hepático por medio de glucogenólisis y producción endógena a partir de precursores como lactato, piruvato, entre otros aminoácidos, por la vía gluconeogénica en los riñones y principalmente por el hígado (Jara, 2011).

La glándula del sistema endocrino responsable del control homeostático de la glucosa es el páncreas, el cual interactúa tanto con la hipófisis como con el hígado para regular la cantidad de glucosa en la sangre (**Fig.3**). En el páncreas hay dos tipos de células que actúan directamente para mantener la homeostasis de la glucosa: las alfa y las beta, encargadas de secretar glucagón e insulina, respectivamente (Osorio & Salceda, 2012). La insulina es una hormona peptídica que consta de dos cadenas unidas por tres enlaces disulfuro; es secretada por las células β de los islotes de Langerhans, localizados en el páncreas, y tiene como función facilitar la entrada de glucosa a las células del cuerpo (Berg, Stryer, & Tymoczko, 2008).

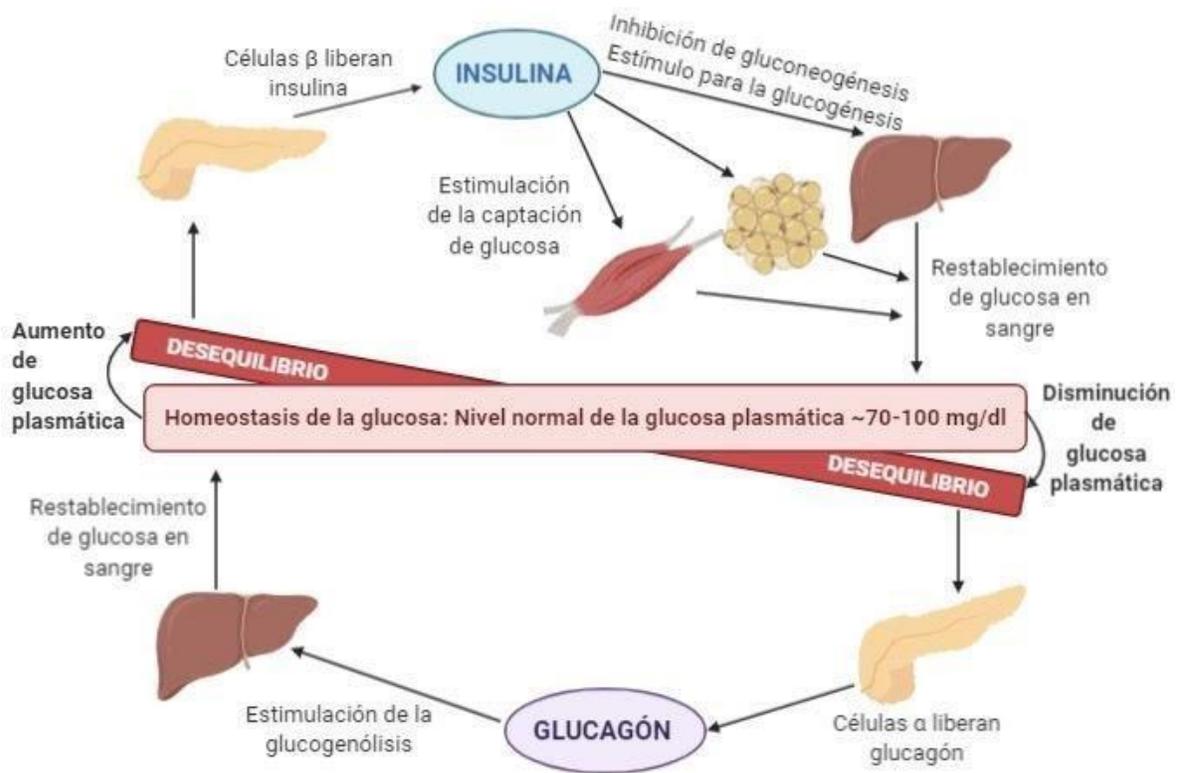


Figura 3. Homeostasis de la glucosa. La alteración o desequilibrio del nivel de glucosa sanguínea es censada por el páncreas y es regulada por la insulina y el glucagón. El glucagón, por medio de la glucogenólisis permite la producción de glucosa en el hígado, mientras que la insulina permite la captación de glucosa por músculo y tejido adiposo, así como la activación de la producción de glucógeno y la inhibición de la vía gluconeogénica en el hígado; de esta forma los niveles de glucosa vuelven a estabilizarse. Tomada y modificada de (Norman & Henry, 2015).

La homeostasis de la glucosa puede dividirse en tres estados: absorptivo (postprandial), ayunas (postabsortivo) e inanición; esta última a su vez se subdivide en inicial y tardía, de acuerdo a la vía metabólica que provea de glucosa durante la falta de alimento (Appleton & Vanbergen, 2013). El estado postprandial es un estado anabólico y es el periodo entre 0-4 h después de haber ingerido algún alimento, y es específicamente el momento en el que se están absorbiendo, usando y almacenando los productos de la digestión (Silverthorn, 2014).

Al momento de ingerir carbohidratos, éstos son hidrolizados y transportados al torrente sanguíneo en forma de glucosa, la cual es censada por el páncreas promoviendo la liberación de insulina. Este proceso de liberación sucede cuando la glucosa ingresa en la célula β a través del transporte facilitado mediado por el transportador de glucosa 2 (GLUT2); la glucosa es fosforilada por la glucocinasa y metabolizada mediante glucólisis y

la cadena transportadora de electrones, trayendo como consecuencia un aumento en la relación ATP/ADP, y provocando que los canales de potasio sensibles a ATP se cierren, lo que conlleva a una despolarización de la membrana y esto, a su vez, a la apertura de los canales de calcio, que por medio de cascadas de señalización permiten la secreción de insulina al torrente sanguíneo (Riaño & Suárez, 2006).

La insulina secretada se une a su receptor en los tejidos periféricos, iniciando las vías de señalización que permiten la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) hacia la membrana plasmática, y así llevar a cabo su función de transportar la glucosa de la sangre al interior de la célula (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013) **(Fig. 4)**. En el tejido adiposo, la insulina estimula la glucólisis en el interior del adipocito generando el substrato 3 α -glicerol fosfato indispensable en la lipogénesis y, a su vez, en la síntesis de triglicéridos. Mientras que en el músculo, la insulina activa y promueve la captación y transporte de glucosa y de aminoácidos para la síntesis de glucógeno y proteínas, respectivamente (Serrano, Cascales, & Larrad, 2016).

Por otro lado, en el hígado, por medio de la vía de glucogenogénesis permite el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno, que, una vez llenos, los excedentes de glucosa son transformados en ácidos grasos y transportados a las células adiposas para su almacenamiento (Kumar, Abbas, & Aster, 2013; Osorio & Salceda, 2012).

Posteriormente, durante el periodo de 4 a 12 h después de haber ingerido alimento, los nutrientes obtenidos de la dieta comienzan a desaparecer del torrente sanguíneo, por lo que el organismo entra en un estado de postabsorción, en el cual, al disminuir los niveles de glucosa sanguínea, las células se ven obligadas a recurrir a las reservas almacenadas. Este almacenamiento de glucosa se encuentra principalmente en el hígado en forma de glucógeno; que es liberado en el momento en el que la falta de glucosa plasmática es censada por el páncreas, promoviendo la secreción de glucagón de las células alfa (Silverthorn, 2014).

Las acciones fisiológicas del glucagón en el hígado promueven la activación de la glucogenólisis, la cual consiste en la degradación del glucógeno para que este sea liberado en forma de glucosa al torrente sanguíneo y así satisfacer las necesidades del

cuerpo. Conforme los niveles de glucógeno hepático van disminuyendo, comienza a activarse otra vía productora de glucosa a partir de sustratos diferentes a los carbohidratos (lactato, glicerol y alanina); esta vía es la gluconeogénesis y es activada cuando el cuerpo se encuentra en un estado de inanición, es decir, en un rango de 12 horas hasta más de 16 días sin ingesta de nutrientes (Appleton & Vanbergen, 2013; Brendan et al., 2002).

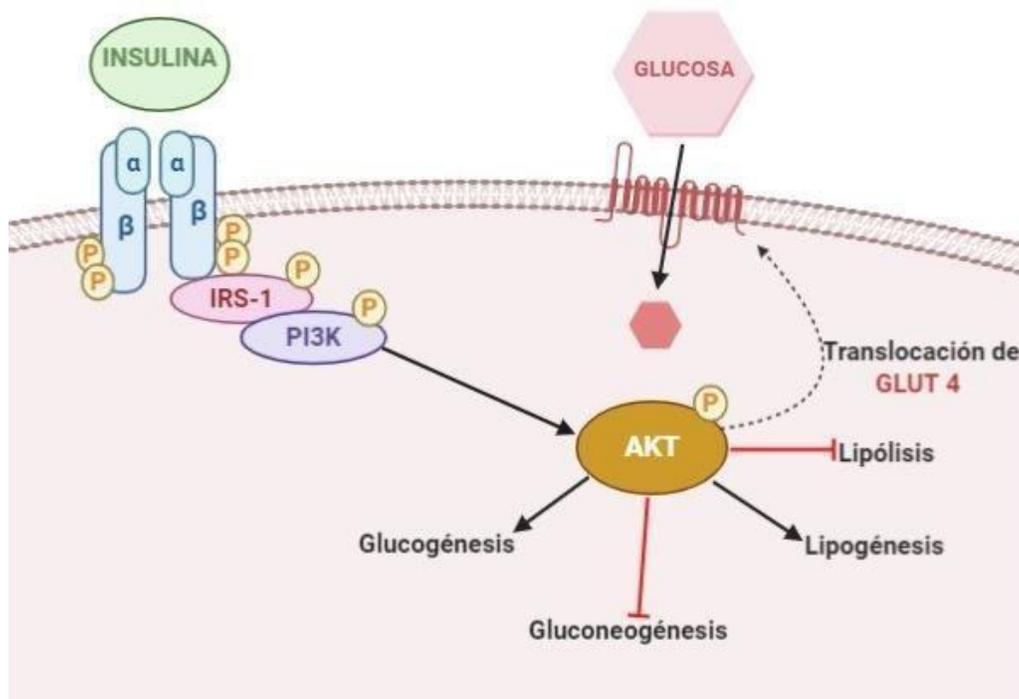


Figura 4. Representación de la vía de señalización de la insulina. En el momento en el que la insulina se une a su receptor, éste se autofosforila en los residuos de tirosinas específicas, fosforilando también al sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1). Posteriormente le sigue la fosforilación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína cinasa B (Akt), la cual promueve cambios en los procesos metabólicos de los lípidos y proteínas así como la captación de glucosa por medio de la translocación del transportador de glucosa GLUT4 en sus órganos blancos específicos. Tomada y modificada de (Thomas, Zhang, & Mitch, 2015).

3. Fisiopatología de diabetes mellitus tipo II

Como se mencionó anteriormente las causas que desencadenan la DM2 aún no se conocen con exactitud, sin embargo, se sabe que existen factores característicos que contribuyen al desarrollo de este trastorno metabólico que resultan de la pérdida gradual de la función de las células β pancreáticas, en presencia de RI (Ampudia-Blasco, 2003).

En las primeras etapas de la enfermedad o cuando los pacientes se encuentran en un estado de prediabetes, los efectos de la insulina se ven disminuidos, sin embargo, el sistema genera mecanismos compensatorios durante este periodo lo que conlleva a un aumento en la función de las células β conocido como hiperinsulinemia, manteniendo así la glucemia dentro de los niveles normales; por este motivo resulta difícil detectar la enfermedad dentro de las primeras etapas. No obstante, conforme la DM2 va en progreso comienza a haber un agotamiento de las células β provocado por la alta demanda de insulina debido al incremento constante de glucosa plasmática, ocasionando así una disfunción en las mismas. En este punto es cuando se diagnostica la diabetes (Ros-Pérez & Medina-Gómez, 2011; Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005).

La obesidad es uno de los factores que pueden llegar a desencadenar RI debido a la desregulada ingesta de alimentos ricos en carbohidratos, los cuales pueden no ser aprovechados como consecuencia de una baja actividad metabólica y/o sedentarismo, por lo cual, se almacenan y acumulan en el tejido adiposo (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013). Debido a la acumulación de ácidos grasos en este tejido, los adipocitos comienzan a presentar hipertrofia, que trae como consecuencia hipoxia, así como la activación de distintas respuestas celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplasmático, liberación de ácidos grasos y la liberación de citocinas proinflamatorias. Estas dos últimas interfieren directamente sobre la vía de señalización de la insulina en pasos posteriores a la unión de la insulina al receptor, lo cual condiciona a un estado de RI (Ros-Pérez & Medina-Gómez, 2011).

La RI se puede definir como la condición patológica que provoca la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana (Serrano Ríos, 2002). El desarrollo de dicha condición no incluye defectos en la unión de la insulina a su receptor en las membranas celulares, en cambio, produce "defectos posteriores al

receptor" que interfieren con los procesos de señalización intracelular en las células β pancreáticas (Thomas et al., 2015).

Al haber defectos en la señalización intracelular, la acción de la insulina se ve comprometida en los tejidos diana principales; en el tejido adiposo no hay una inhibición de la lipólisis, lo que conduce a un aumento en el suministro de ácidos grasos no esterificados tanto en el cerebro, páncreas, músculo e hígado (**Fig. 5**) (Delarue & Magnan, 2007).

Como consecuencia del aumento de ácidos grasos circulantes derivado de la RI, en el hígado comienza a haber una sobreproducción de glucosa, debido a que, por un lado, inhibe la captación de glucosa en la célula hepática mientras que, por el otro, se estimula la producción de glucosa endógena a través de la activación de acetil-CoA. Este fenómeno estimula la actividad de la enzima piruvato carboxilasa (PC), una de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis hepática. Debido a la sobreproducción de glucosa hepática provocada por la RI de este órgano, una gran parte de la hiperglucemia presente en la DM2 es causada por el hígado (Rodríguez-Rodríguez, Perea, López-Sobaler, & Ortega, 2009).

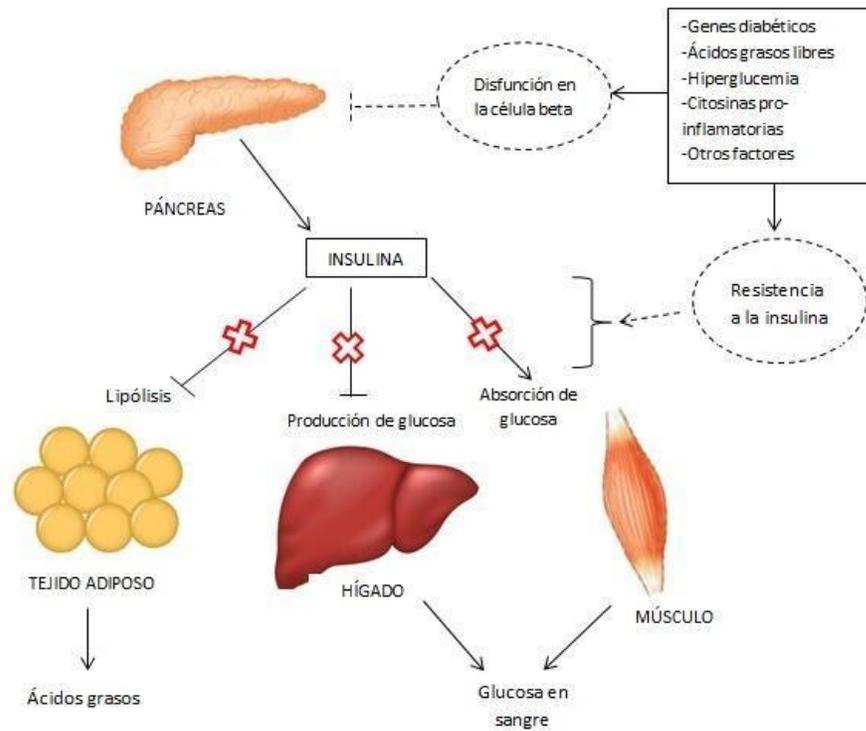


Figura 5. Fisiopatología de la DM2. Existen diferentes factores que contribuyen a la patogénesis de la DM2 afectando tanto la secreción de insulina como la acción de la misma. Al presentar RI, las vías de señalización de los tejidos diana se ven afectadas provocando un aumento de glucosa y ácidos grasos en el torrente sanguíneo. En el tejido adiposo, la lipólisis no es inhibida por lo tanto provoca una constante liberación de ácidos grasos al plasma, mientras que en el músculo, la glucosa no se capta de manera adecuada, por lo que los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo aumentan; por otra parte, en el hígado la producción de glucosa endógena generada por la gluconeogénesis no se ve inhibida, lo que trae como consecuencia que los niveles de glucosa sigan aumentando. Tomada y modificada de (Stumvoll et al., 2005).

4. Regulación hepática de glucosa

El hígado es un órgano indispensable para el control del metabolismo de los carbohidratos. Puede expresar enzimas que se activan o desactivan dependiendo de los niveles de glucosa en plasma; de igual manera, permite que las concentraciones de glucosa se mantengan dentro del rango normal ya sea en periodos largos o cortos de tiempo. En el periodo postprandial, el hígado capta una porción de los carbohidratos ingeridos para restaurar las reservas de glucógeno, mientras que en el estado postabsortivo, la producción de glucosa hepática (HGP) asegura un suministro al sistema nervioso central y al mismo tiempo regula las concentraciones de glucosa en ayunas (Postic, Dentin, & Girard, 2004).

Para el suministro de glucosa al cuerpo existen dos vías principales como son la glucogenólisis, que se encarga de la ruptura del glucógeno almacenado, y la gluconeogénesis, que sintetiza glucosa de *novo* a partir de sustratos de dos o tres carbonos. Ambos mecanismos son necesarios para mantener la glucemia en un estado de ayuno corto o prolongado. De acuerdo a estudios previos, la producción corporal total de glucosa en personas sanas a diferentes intervalos de ayuno depende de la vía gluconeogénica, que es responsable del 50-96% de la producción de glucosa y puede aumentar conforme la duración del ayuno se prolongue (Polonsky & Burant, 2017).

4.1 Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es una vía anabólica capaz de formar moléculas nuevas de glucosa a partir de sustratos diferentes a los carbohidratos como son lactato, glicerol, alanina, glutamina, entre otros aminoácidos; está asociada principalmente a la respuesta al ayuno, y es clave para el mantenimiento de la glucemia. Se sabe que el hígado es el principal órgano, aunque no el único, en donde se lleva a cabo tal vía, ya que se ha detectado, aunque en menor medida, en los riñones e incluso en el intestino (Pérez-Mendoza, Ita-Pérez, & Días-Muños, 2012).

Las reacciones químicas que se llevan a cabo en la gluconeogénesis están relacionadas con la glucólisis, ya que las que se llevan a cabo en una, son las inversas de la otra. Sin embargo, la gluconeogénesis se caracteriza por presentar enzimas paso-limitantes que no participan en la vía glucolítica, llamadas así debido a que controlan la vía en puntos específicos (**Fig. 6**) (Mckee & Mckee, 2009).

Esta vía es regulada por la disponibilidad de sustratos, metabolitos, los mecanismos de transcripción y el estado redox celular; una mala alimentación a base de grasas, e inanición o ayunos prolongados que proporcionan grandes cantidades de estas moléculas. Como ya se mencionó anteriormente, existen diferentes moléculas precursoras de la vía gluconeogénica provenientes de sitios atípicos: por ejemplo, la lipólisis en el tejido adiposo produce ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glicerol, que pueden estimular la gluconeogénesis. La β -oxidación de NEFA produce acetil-CoA mitocondrial, que promueve la gluconeogénesis activando a PC, que, a su vez, cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato; mientras que, por otro lado, el glicerol puede fosforilarse y convertirse en el precursor gluconeogénico dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que explica hasta el 20% de la HGP (Petersen, Vatner, & Shulman, 2017).

Las células musculares producen lactato y alanina que pueden ser transportados por los eritrocitos y otras células que carecen de mitocondrias (con concentraciones bajas de oxígeno) al hígado. El lactato es producido por medio de la enzima lactato deshidrogenasa; mientras que la alanina proviene de una reacción catalizada por la alanino transaminasa con participación del glutamato. Una vez en el hígado, estos sustratos son transformados en piruvato para dar inicio a la vía gluconeogénica (Manzanares & Aramendi, 2010; Mckee & Mckee, 2009).

Una vez que los sustratos fueron convertidos en piruvato, éste entra en la mitocondria, donde es transformado a oxalacetato por medio de la enzima PC. Posteriormente, el oxalacetato es reducido a malato, y al salir de la mitocondria se oxida para convertirse nuevamente a oxalacetato por la acción de la enzima malato-deshidrogenasa del citosol. El oxalacetato citosólico se descarboxila por la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) en presencia de guanósín trifosfato (GTP), de la cual se obtiene la energía para la síntesis

del fosfoenolpiruvato. Posteriormente, a partir de dos moléculas de 2-fosfoglicerato, la gluconeogénesis puede proceder en sentido inverso a la glucólisis hasta formar una molécula de gliceraldehido 3-fosfato (G3P) y otra de DHAP (**Fig.6**) (Castellanos, 2014).

Finalmente, ya formadas las moléculas G3P y DHAP, es generada la fructosa-1,6-bisfosfato (fructosa-1,6-P) por la acción de la aldosa. La fructosa-1,6-P se transforma en fructosa-6-fosfato (fructosa-6-P) por una reacción de hidrólisis, que es catalizada por la F1,6BPasa. Posteriormente, la glucosa-6-fosfato (G6P) producida es transformada a glucosa libre por la G6Pasa (reacción inversa a la realizada por la glucocinasa) (**Fig. 6**) (Castellanos, 2014; Engelking, 2015).

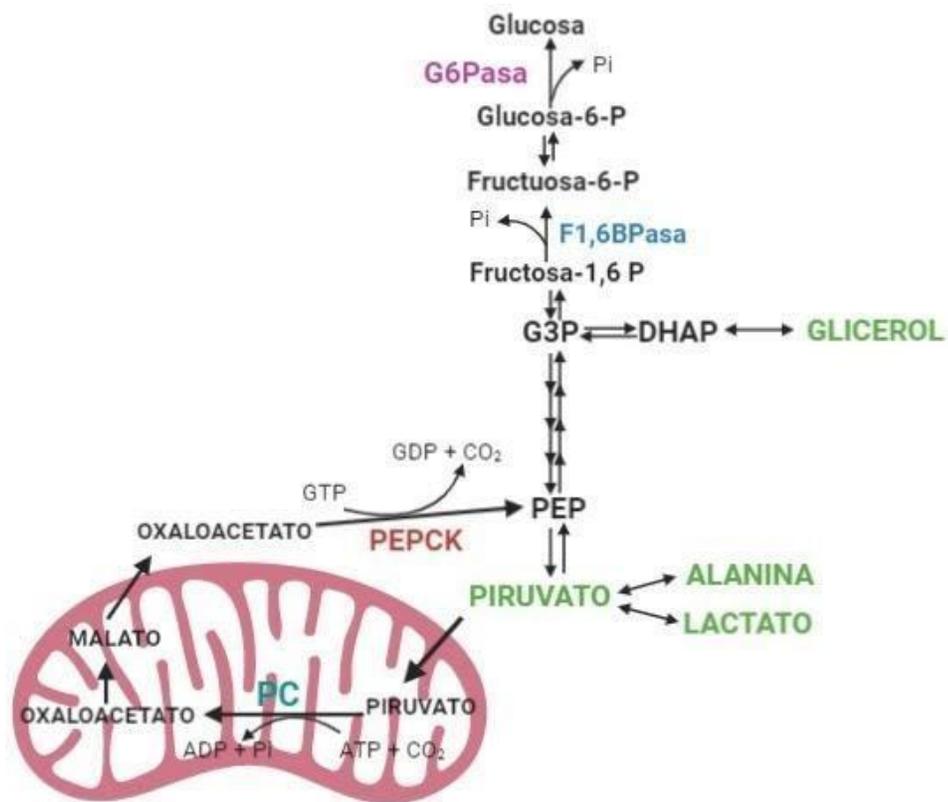


Figura 6. Esquema de la gluconeogénesis. Se muestra de manera general la vía metabólica. En color verde se indican los principales sustratos de la vía gluconeogénica. El lactato y la alanina son convertidos en piruvato, que entra posteriormente a la mitocondria; otro de los sustratos de la ruta es el glicerol, el cual es transformado en dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Las enzimas paso limitantes de la gluconeogénesis se muestran en diferentes colores: PC, piruvato carboxilasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa; F1,6BPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa. Tomada y modificada de (King, 2015; Mckee & Mckee, 2009).

4.2 Regulación de la gluconeogénesis por insulina y su alteración en DM2

Como se mencionó anteriormente la regulación del aporte de glucosa proveniente de la gluconeogénesis hepática al torrente sanguíneo se lleva a cabo principalmente por medio de la insulina, que en los hepatocitos cumple con su función basada sobre todo en procesos de fosforilación y desfosforilación. Su vía de señalización comienza cuando se une a su receptor y activa la vía de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y Akt2, suprimiendo la producción hepática de glucosa mediante dos mecanismos principales: la disminución de la expresión de las enzimas gluconeogénicas mediante fosforilación y exclusión nuclear del factor de transcripción "Forkhead box protein O1" (FOXO1), así como el aumento de la actividad de glucógeno sintasa (GS), mediante la fosforilación e inactivación de glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) (Berlanga, Guiu-Jurado, Porras, Aragonès, & August, 2016).

FOXO1 es un miembro de la familia de factores de transcripción FOX que interaccionan con las secuencias denominadas elementos de respuesta a la insulina (IRE). Entre sus dianas se encuentran los genes que codifican la PEPCK, enzima limitante de la velocidad de la utilización de la glucosa, y G6Pasa, enzima limitante de la producción de glucosa; por lo que al ser inhibido por medio de la insulina, la producción de glucosa se ve disminuida resultando en un mayor aprovechamiento de la misma a través de la glucólisis, entre otras vías. Por otro lado, GSK3, al estar en su forma inactiva, no cataliza la fosforilación y la inhibición de la actividad de GS, permitiendo así la síntesis de glucógeno hepático (**Fig. 7**) (Rodríguez, 2013). En consecuencia, cuando FOXO1 es inhibido por la insulina, los niveles de G6Pasa disminuyen, reflejando un descenso en la producción de glucosa, lo que es un efecto benéfico para los pacientes con DM2 (Morris, 2017).

Al presentar este trastorno metabólico, los pacientes con DM2 presentan un aumento en los niveles de diacilgliceroles (DAG), los cuales, al acumularse en el hígado, permiten la activación y translocación de la proteína cinasa Cε (PKCε), promoviendo la inhibición del receptor de la insulina, lo que trae como consecuencia un decremento en la fosforilación del mismo, en la actividad de AKT2 y la señalización intracelular. Finalmente, estos fenómenos traen como consecuencia que la actividad de la insulina para inducir la

síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis se vea disminuida (Berlanga et al., 2016).

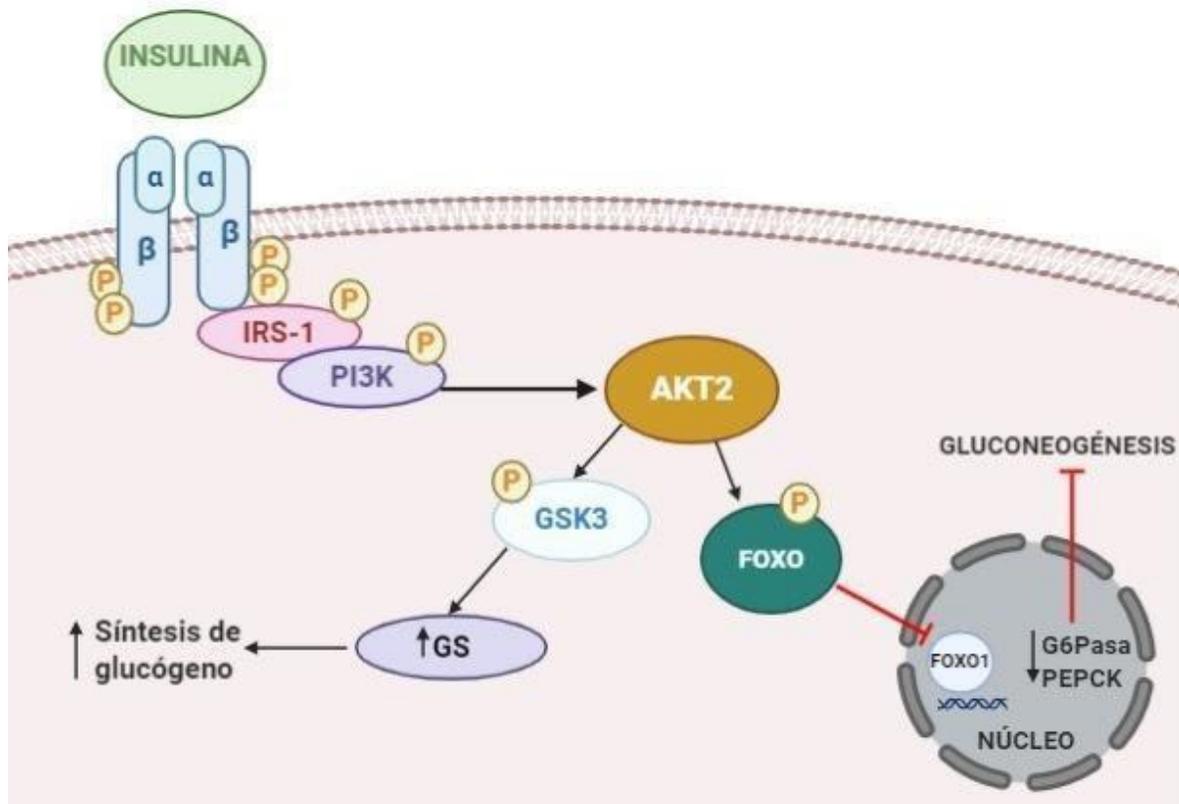


Figura 7. Esquema de la regulación de la gluconeogénesis por insulina. Se muestra una representación general de la regulación de la vía gluconeogénica por la insulina. La interacción de la insulina con su receptor induce la cascada de señalización que desemboca en la fosforilación de FOXO1, que promueve su translocación al núcleo, inhibiendo así la expresión de los genes que codifican para dos de las principales enzimas reguladoras de la gluconeogénesis PEPCK y G6Pasa. Tomada y modificada de (Berlanga et al., 2016).

4.3 Inhibición de la vía gluconeogénica por medio de la Metformina

Para el control de la glucemia de un paciente con DM2 es recomendable la dieta y ejercicio en conjunto con tratamiento farmacológico. Actualmente existen una gran variedad de hipoglucemiantes orales, cada uno con un mecanismo de acción diferente, como las meglitinidas, sulfonilureas, tiazolidinedionas, análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), los inhibidores de dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) y las biguanidas (Llave, 2008).

Las biguanidas son los fármacos de primera línea utilizados en la actualidad para el control de la glucemia, ya que son sensibilizadores a la insulina, capaces de disminuir la hiperglucemia sin estimular la producción de la misma. Uno de sus efectos es el de reducir los lípidos circulantes, cuyo incremento está asociado a un mayor riesgo cardiovascular, por tal motivo (comparándolo con otras biguanidas) el primer medicamento de elección para pacientes obesos o dislipidémicos con DM2 es la metformina, ya que no incrementa los niveles plasmáticos de insulina, e incluso es capaz de reducir la hiperinsulinemia (Rodríguez-Rivera, Cuautle-Rodríguez, & Molina-Guarneros, 2017).

La metformina proviene de la planta *Galega officinalis*, de la cual se identificó el principio activo isoamileño guanidina (también llamado galegina). Esta planta es conocida desde hace siglos por sus efectos benéficos en la diabetes. Estudios farmacológicos han demostrado que actúa disminuyendo diferentes marcadores de riesgo cardiovascular, incluidos el perfil lipídico y el hígado graso, así como la sensibilidad de receptores celulares periférico y hepático a la insulina. Por otro lado, es capaz de reducir el riesgo de cáncer, además de retardar la absorción de glucosa a nivel intestinal (Pernicova & Korbonits, 2014; PLM®, 2020).

La sensibilización de receptores celulares periféricos por parte de la metformina se ha observado en la oxidación aumentada de ácidos grasos y en la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) para aumentar la translocación de GLUT4 en el músculo. Estudios anteriores sugieren que el incremento en la concentración circulante de GLP-1 puede contribuir a los efectos metabólicos de la metformina, debido a una mayor secreción de esta hormona como consecuencia de una mayor absorción de glucosa en segmentos del intestino delgado, donde las células L secretoras de GLP-1 son más abundantes (Scarpello & Howlett, 2008).

Sin embargo, adicionalmente a los efectos descritos con anterioridad, se ha observado que la principal función de la metformina se lleva a cabo en el hígado, suprimiendo la producción de glucosa, lo que lleva a una reducción en los niveles de glucosa en plasma en ayunas y HbA1c (DeFronzo et al., 2015). La gluconeogénesis es inhibida por la metformina mediante diferentes mecanismos. En el primero de ellos se comporta como un

inhibidor no competitivo de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD), afectando la producción de DHAP y, por lo tanto, promoviendo una disminución en la gluconeogénesis a partir de glicerol y un aumento del estado redox citosólico, debido a la inhibición de la enzima lactato deshidrogenasa dependiente de redox (LDH). De esta manera, se limita la producción de piruvato y, por lo tanto, la gluconeogénesis a partir de lactato (Petersen et al., 2017).

Otro mecanismo de la metformina en el hepatocito es la promoción de la fosforilación estimuladora de AMPK a través de la desestabilización de la cadena transportadora de electrones al suprimir la función del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una disminución de ATP, trayendo como consecuencia una reducción de la transcripción génica de enzimas gluconeogénicas. Asimismo, al aumentar los niveles de AMP, se promueve la regulación alostérica de la F1,6-Pasa suprimiendo su actividad (**Fig. 8**) (Madiraju et al., 2014; Mata-Torres, Andrade-Cetto, Espinoza-Hernández, & Cárdenas-Vázquez, 2020).

Por otra parte, la metformina reduce la respuesta cíclica del AMP a la estimulación del glucagón en los hepatocitos, lo que ocasiona cambios en la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), inhibiendo la gluconeogénesis y así reduciendo la HGP (**Fig. 8**) (Madiraju et al., 2014; Vicente et al., 2019).

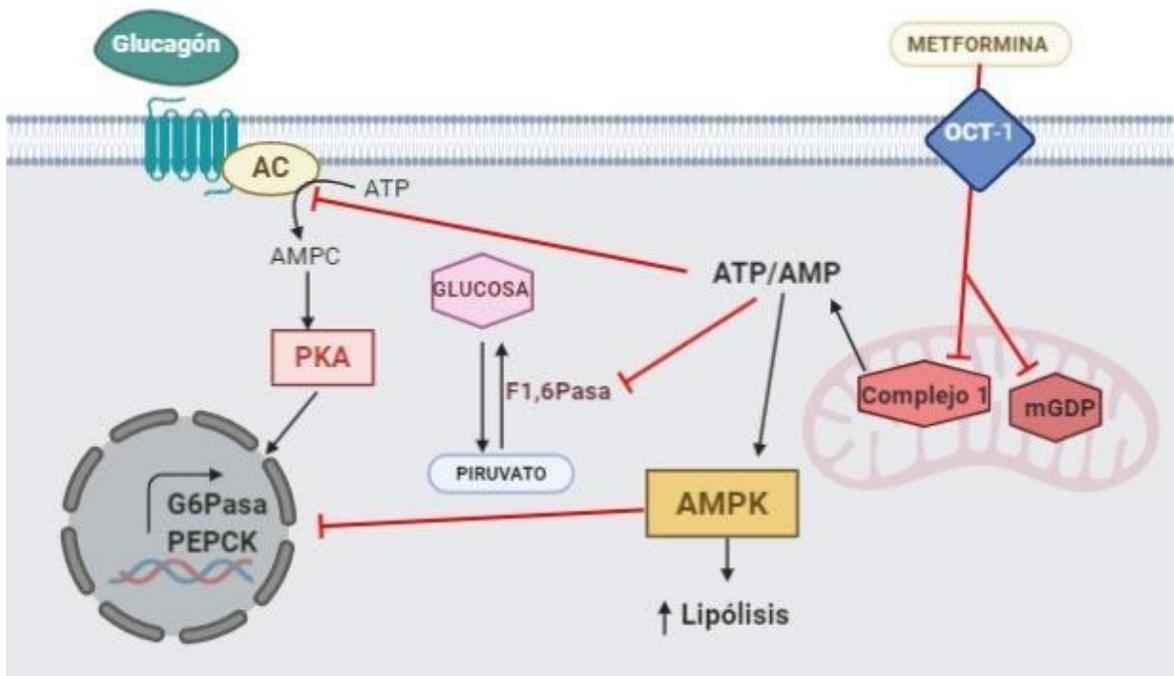


Figura 8. Esquema de los mecanismos de acción de la metformina en el hepatocito. Se muestran de manera general los diferentes mecanismos por los que actúa la metformina en el hepatocito. La metformina entra a la célula mediante el transportador OCT-1, dirigiéndose a la mitocondria donde inhibe tanto a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD) como al complejo 1 de la cadena de transporte de electrones, lo que provoca una disminución en la relación ATP/AMP intracelular, inhibiendo adenilato ciclasa (AC), la f-1,6-bisfasa y activando a AMPK. Este sensor energético inhibe la expresión de PEPCK y G6Pasa. Tomada y modificada de (Vicente et al., 2019).

4.4 Glucosa-6-fosfatasa como blanco terapéutico

La G6Pasa es una proteína de membrana asociada al retículo endoplásmico que se expresa principalmente en el hígado y en la corteza renal, los principales tejidos gluconeogénicos. La activación y concentración de la G6Pasa depende de la concentración de G6P, que a su vez puede ser aumentado por glucocorticoides, tiroxina, glucagón, e incluso cuando se presentan enfermedades como DM. La G6Pasa, es la enzima responsable de eliminar el fosfato de la G6P, permitiendo que la glucosa sea liberada por medio GLUT2 al torrente sanguíneo; este es el paso final en la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, aumentando la concentración de glucosa en la sangre (Baginski, Foà, & Zak, 1974; Van & Gerin, 2002).

La G6Pasa es una fosfatasa con una alta especificidad que se compone por una subunidad catalítica orientada hacia la luz del retículo endoplásmico. De igual manera se compone de tres sistemas de transporte diferentes (translocasas T1, T2 y T3) las cuales se encargan de transportar el sustrato a través del retículo endoplásmico (**Fig. 9**). T1 es una proteína estabilizadora de polipéptidos que transporta G6P desde la cara citosólica a la luz del retículo; la proteína T2 se encarga de transportar el fosfato liberado a partir de la hidrólisis de G6P (pirofosfato) fuera de la luz del retículo endoplásmico; mientras que el transportador de glucosa (T3) transporta la glucosa formada a partir de la hidrólisis de G6P fuera del retículo endoplásmico (Van & Gerin, 2002; Wolfsdorf, Holm, & Weinstein, 1999).

Debido a que el complejo G6Pasa juega un papel sumamente importante en la producción de glucosa liberada proveniente de vías como glucogenólisis y gluconeogénesis, es considerado como uno de los mejores blancos terapéuticos para el control de la glucosa plasmática, ya que, en personas sanas, la insulina inhibe la expresión de G6Pasa y, a su vez, la vía gluconeogénica, evitando la HGP. Mientras que en pacientes con DM2, al presentar RI la producción de glucosa liberada al torrente sanguíneo es constante, debido al aumento en la actividad de G6Pasa, por lo que este complejo representa un objetivo claro para la intervención terapéutica (Charkoudian, Farrell, & Khosla, 2012).

Existen dos categorías principales de inhibidores del complejo G6Pasa: los inhibidores de la subunidad catalítica y los inhibidores de la T1; sin embargo, uno de los aspectos a considerar al inhibir a la subunidad catalítica es que este tipo de inhibidores farmacológicos pueden llegar a inhibir a otras fosfatasas, lo que puede provocar efectos negativos. Debido a que T1 es estructuralmente distinto, es considerado el blanco para la intervención farmacológica, por lo que, hasta la fecha, se han identificado una gran cantidad de inhibidores de este transportador desde sintéticos hasta productos naturales (Charkoudian et al., 2012).

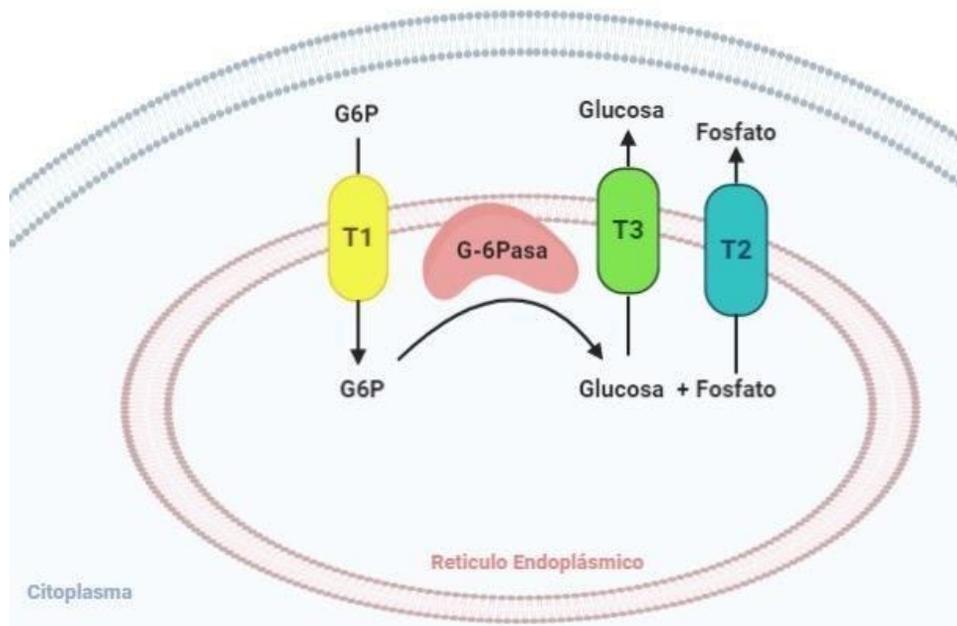


Figura 9. Esquema del sistema enzimático de G6Pasa. Se muestra el sistema de transporte de glucosa-6-fosfato (G6P) a través del retículo endoplásmico hepático, en donde entra en contacto con la enzima G6Pasa; posteriormente, la glucosa y el fosfato son liberados por sus respectivas translocasas al citoplasma. La glucosa obtenida es liberada al torrente sanguíneo. Tomada y modificada de (Sundaram & Alonso, 2011).

4.5 Inhibidores naturales de G6Pasa T1

Existen una gran cantidad de plantas, hongos y bacterias de los cuales se han logrado aislar una gran variedad de inhibidores de la enzima G6Pasa T1. Algunos de ellos son: la floretina, con una $IC_{50} = 340 \mu\text{M}$, componente fenólico de la manzana; trímeros de ácido siálico (tielavinas) obtenidos a partir de una cepa fúngica *Chaetomium carinthiacum* con IC_{50} de $0.33 \mu\text{M}$ a $250 \mu\text{M}$, y los tetrámeros de ácido siálico (CJ-21,164) con una IC_{50} de $1.6 \mu\text{M}$; kodiastatinas aisladas del hongo filamentoso *Aspergillus terreus* Thom DSM 12247; y la mumbaistatina, producida por la bacteria *Streptomyces* sp. DSM 11641, conocida como el inhibidor más potente de G6-Pasa T1 con una $IC_{50} = 5 \text{ nM}$ (Charkoudian et al., 2012).

Otro ejemplo de metabolito secundario aislado de plantas es el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico), el cual es el más abundante en la naturaleza y quizá el inhibidor por excelencia de la enzima G6Pasa T1 (Charkoudian et al., 2012). El ácido clorogénico es un polifenol dietético biológicamente activo, que se compone de ésteres

hidroxicinámicos con ácido quínico, incluidos los ácidos cafeoil, feruloil, dicaffeoil y cumaroilquínico (**Fig. 10**) con una $IC_{50} = 230 \mu M$ (Tajik et al., 2017). Gracias a su estructura, diferentes estudios han sugerido que el ácido clorogénico tendría un posible papel en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, así como una mejora en el metabolismo de glucosa en pacientes con diabetes debido a que tiene efectos hipoglucemiantes y sensibilizadores a la insulina (Bhandarkar, Brown, & Panchal, 2019).

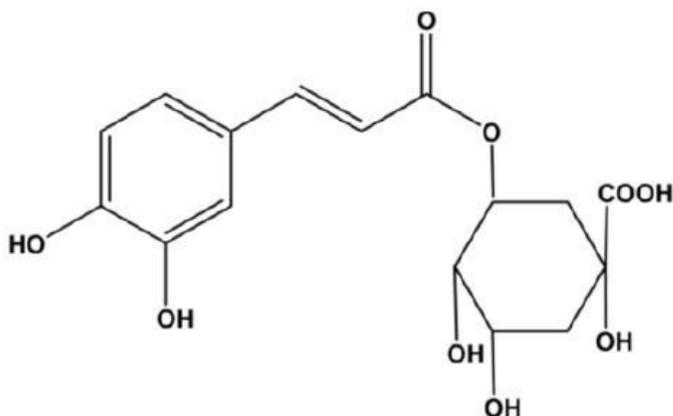


Figura 10. Estructura del ácido 5-O-cafeoil-ácido quínico (ácido clorogénico).

Tomada de (Chaves-Ulate & Esquivel-Rodríguez, 2019).

5. Etnofarmacología

La Etnofarmacología puede definirse como “el estudio de productos naturales biológicamente activos utilizados tradicionalmente, con el objetivo de comprender sus acciones terapéuticas”. Gracias a estudios etnofarmacológicos se han encontrado una gran cantidad de productos naturales con el propósito de tener una gama más amplia en los tratamientos terapéuticos de diversas patologías (Andrade-Cetto & Heinrich, 2011).

La OMS estima que el 80% de la población mundial utiliza recursos naturales, principalmente especies vegetales, como fuente de atención a problemas de salud, acudiendo a los herbolarios o a personas de la comunidad que posean un conocimiento tradicional empírico (Bueno, Gutierrez, Isaza, Carmona, & Perez, 2001). En México existe una extensa riqueza dentro de la herbolaria, y se sabe que nuestros ancestros han clasificado plantas medicinales a partir de su efecto. Desde entonces, hasta nuestros días, es conocido su uso terapéutico para la prevención de diferentes enfermedades como las cardiovasculares, hipertensión y DM2 (Jimenez-Corona & Mateo-Rivera, 2019).

La finalidad del tratamiento de la diabetes es la regulación de los niveles de glucosa en sangre y así evitar complicaciones micro y macrovasculares. Como se mencionó anteriormente, para controlar la hiperglucemia se utilizan diferentes fármacos, así como un régimen alimenticio y ejercicio. Sin embargo, a pesar de su efectividad, tienen un uso limitado debido a condiciones patológicas indeseables y a una alta tasa de efectos adversos; por lo cual, en la actualidad, el buscar agentes hipoglucemiantes con un mayor índice de efectividad y con menores efectos secundarios, se ha planteado como una prioridad para los investigadores (Surya et al., 2014).

En México, el tratamiento de enfermedades como la diabetes, sobre todo en poblaciones rurales, es comúnmente a base de plantas; es por eso que en el año 2005 se inventariaron un total de 306 especies para el uso popular en el tratamiento de esta enfermedad. En dicho estudio se registraron especies pertenecientes a diferentes familias como: Malvaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Agavaceae, Liliaceae, Bromeliaceae, Annonaceae, Cactaceae, Ericaceae, Cecropiaceae, Equisetaceae, Fabaceae, por decir

algunas. A especies de estas familias se aislaron compuestos fitoquímicos entre los que se encuentran tetrahidropiranos, aceites esenciales, sapogeninas, flavonoides, terpenos, compuestos sulfúricos, polisacáridos, lactonas, entre otros. (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005).

Se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios farmacológicos que permiten esclarecer y corroborar el efecto hipoglucemiante de estas especies utilizadas tradicionalmente en ciertas regiones; para ejemplificar mejor, a continuación se muestran algunos de los estudios realizados para diferentes especies:

Para la especie *Arocomia mexicana* se realizó un extracto metanólico de la raíz, de la cual se aisló un nuevo compuesto de tetrahidropirano, dicho extracto mostró un efecto reductor de glucosa en sangre en ratones normoglucémicos y con diabetes aloxana, mostrando una respuesta dependiente de la dosis en los modelos de ratones (Pérez G, Pérez G, Pérez G, Zavala S, & Vargas S, 1997).

En el caso de *Trigonella foenum-graecum* se realizaron y analizaron extractos acuosos y alcohólicos de sus hojas para determinar la actividad hipoglucemiante en ratas normoglucémicas y con diabetes inducida por aloxano. Este estudio arrojó dos diferentes resultados, en el caso del extracto etanólico produjo una reducción en la concentración de glucosa en sangre, sin embargo, produjo un daño directo en el hígado atribuido a su vía de administración; mientras que en el caso del extracto acuoso demostró un efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo (Abdel-Barry, Abdel-Hassan, & Al-Hakiem, 1997).

Al encontrar los mecanismos de acción por los cuales actúan ciertas especies vegetales ha ayudado a esclarecer muchos de los usos que les dan a las plantas tradicionalmente. Es por eso que existen estudios dirigidos a blancos terapéuticos específicos como es el caso de la investigación realizada a especies como *Smilax moranensis* y *Ageratina petiolaris*, en los cuales se evaluó el efecto del extracto etanol-agua de la raíz y el extracto acuoso de la parte aérea respectivamente; concluyendo que uno de los mecanismos de acción de ambas plantas con un efecto hipoglucemiante es la inhibición de la producción hepática por la vía gluconeogénica (Espinoza-Hernández, 2017).

6. *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

Una de las plantas reportadas con efecto hipoglucemiante en el trabajo de Andrade-Cetto y Heinrich (2005), utilizada en México, es *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. de la familia Asteraceae. Se describe como un arbusto de hasta 3 m de alto; sus hojas se presentan de manera opuesta, pueden ser ovaladas, muy angostas y puntiagudas, llegan a medir hasta 12 cm de largo y hasta 4 cm de ancho; presentan un margen a veces aserrado o entero, con abundantes tricomas en el haz y envés de la hoja. En las puntas de las ramas y axilas de las hojas se pueden encontrar las cabezuelas densamente agrupadas en inflorescencias ramificadas, las cabezuelas se conforman por las flores liguladas (femeninas) que se encuentran en la periferia con forma oblonga y de color blanco; y las flores del disco (hermafroditas) en la parte central de la cabezuela dividida en 5 lóbulos iguales, de color amarillo. El fruto es seco e indehiscente, conocido como aquenio en forma de cono invertido de color negruzco, cubierto de pelillos (**Fig. 11**) (Vibrans, 2009).

6.1 Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Enlace Asterales

Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Género: *Calea* L.

Especie: *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

Sinónimos:

Allocaurus integrifolius DC.

Calea integrifolia var. *dentata* JM Coult.



Figura 11. Ejemplar de herbario de *C. integrifolia*

Tomada de (Hinton, s/f).

6.2 Distribución

En el continente americano se ha reportado la distribución de *C. integrifolia* desde el sur hasta el norte de América. En México, se ha registrado en los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Veracruz (**Fig.12**) (CONABIO, 2019).

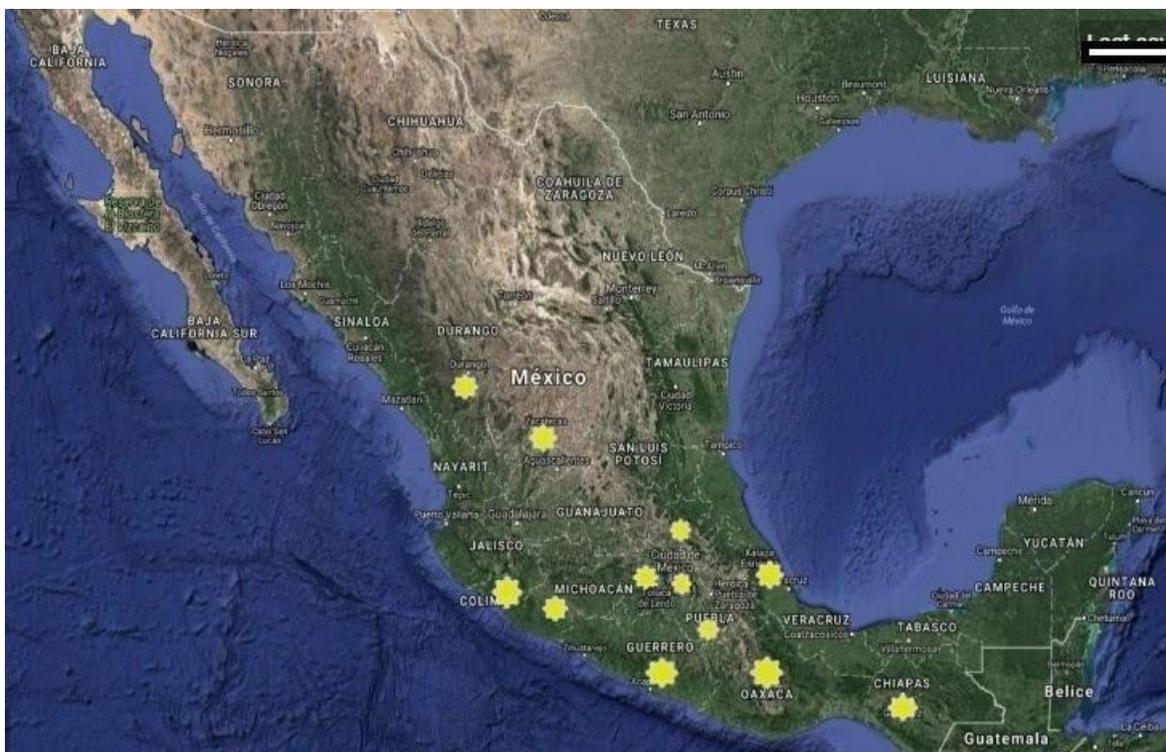


Figura 12. Mapa de la distribución de *C. integrifolia* en México. Registros obtenidos de CONABIO 2019. Tomada de (CONABIO, 2019). Modificada en BioRender.com

6.3 Antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos

Un gran número de especies pertenecientes al género *Calea* son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades como fiebre, dolor de estómago, ulceraciones, heridas infectadas, hiperacidez, artritis, enfermedades hepáticas, de los riñones, diarreas, hipertensión y diabetes (Aguiar et al., 2017). *C. integrifolia* es una de las especies pertenecientes a este género con uso medicinal importante.

Algunas de las comunidades en las que se ha registrado el uso de *C. integrifolia* para el tratamiento de la diabetes es Uruapan, Michoacán, en la cual su nombre común es “amula de Monterrey” y se ingiere por medio de un té de toda la planta; por otro lado, en Tamala, Hidalgo, se conoce como “jehuite amargoso” y, al igual que en San Miguel Suchixtepec, Oaxaca, en donde la nombran “prodigiosa”, se consume en infusiones del tallo, principalmente (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Ruiz, 2000).

Los estudios fitoquímicos de *C. integrifolia* siguen siendo escasos hasta la fecha. El primer registro fue en 1976, Alemania, donde se reportó que la raíz de *C. integrifolia* contiene el aldehído heptadeca-2-t-9,16-trien-1-al, así como pequeñas cantidades de alcohol (Bohlmann & Zdero, 1976). En el año 2005, se registró la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005); mientras que en el año 2019, se lograron identificar compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y rutina, ambas registradas como inhibidores naturales de la gluconeogénesis, uno de los mecanismos que le da el efecto hipoglucemiante a esta planta (Yacini, 2019).

Para esclarecer el mecanismo de acción de *C. integrifolia* se han llevado a cabo diferentes estudios farmacológicos. En uno de ellos, se observó la inhibición de la inducción de diferenciación de precursores de adipocitos por medio de derivados sesquiterpénicos, obtenidos a partir de un extracto de varias especies del género *Calea*, entre ellas *C. integrifolia* (Linuma et al., 2005). En otro estudio, se reportó que el extracto acuoso de *C. integrifolia* disminuyó de forma significativa los niveles de glucosa sanguínea a pesar de no presentar un efecto inhibitorio sobre el pico hiperglucémico postprandial en ratas STZ-NA durante una prueba de tolerancia a la sacarosa oral; en el mismo estudio, en la prueba *in vitro*, se advirtió la ausencia de un efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas alfa-glucosidasas, por lo tanto, quedó descartado este mecanismo de acción para el efecto hipoglucemiante de esta planta (Ramos-Torres, 2018).

Finalmente en un estudio reciente, se comprobó el efecto sobre los niveles de glucosa sanguínea de *C. integrifolia* en ratas STZ-NA durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral, en la cual, a pesar de no haber una inhibición del pico hiperglucémico postprandial, se observa un cambio descendente en la glucosa plasmática en los diferentes tiempos de la prueba, alcanzando valores normoglucémicos (Yacini, 2019).

7. Modelo STZ-NA

A pesar de ser tan estudiada, todavía existen muchas incógnitas sobre la fisiopatología y estrategias terapéuticas efectivas para el control de la DM (Masiello, 2006). Por este motivo, para tener un mayor entendimiento, tanto de la patología como de los posibles tratamientos, se han llegado a desarrollar diferentes modelos animales utilizados en investigaciones sobre la DM2, en los que se generan estados hiperglucémicos y otras alteraciones metabólicas relacionadas; estos modelos, en su mayoría, son inducidos de forma experimental en los laboratorios (Hugués, Rodríguez, Rodríguez, & Marrero, 2002).

Una de las principales finalidades de generar estos modelos inducidos a un estado hiperglucémico es la de comprobar la toxicidad y/o eficiencia de múltiples fármacos, productos y extractos naturales. Existe una gran variedad de métodos descritos para la inducción de estos modelos animales los cuales, como se mencionó anteriormente, ilustran muchas de las anomalías metabólicas propias de la enfermedad; estos métodos de inducción van desde estrategias quirúrgicas, dietas especiales, modificaciones genéticas, y aplicación de fármacos con toxicidad específica sobre el páncreas (Moreno-Cortés, Gutiérrez-García, & Contreras, 2020).

En 1998, Masiello y colaboradores desarrollaron un modelo en ratas para inducir diabetes experimental, en la cual la administración de estreptozotocina (STZ) y nicotinamida (NA) son claves para el desarrollo de una hiperglucemia moderada estable en los roedores, debido a que la STZ ejerce un efecto citotóxico sobre la célula β , mientras que la NA ofrece una protección parcial a la misma (Masiello et al., 1998). Por tal motivo se seleccionó dicho modelo, ya que al presentar hiperglucemia moderada permite observar los cambios, resultado de diferentes factores como son el ayuno, la ingesta de fármacos, así como la administración del extracto.

El modelo STZ-NA consiste principalmente en la administración de dosis reguladas de STZ y NA. La STZ, debido a su estructura, es reconocida por el glucotransportador GLUT2, permitiéndole el acceso a la célula β pancreática, provocando un daño en el DNA y estimulando un aumento en la actividad de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa

(PARP-1). La actividad exacerbada de esta enzima resulta en el decaimiento intracelular de NAD y ATP y, por consiguiente, a una muerte celular. Por otro lado, la NA se administra con el fin de proteger parcialmente a las células secretoras de insulina de la STZ. Esta acción protectora se debe a la inhibición de la actividad de PARP-1; por otra parte, la NA es un precursor de NAD⁺, por lo que se evita una disminución de ATP y muerte celular posterior (**Fig.13**) (Szkudelski, 2012).

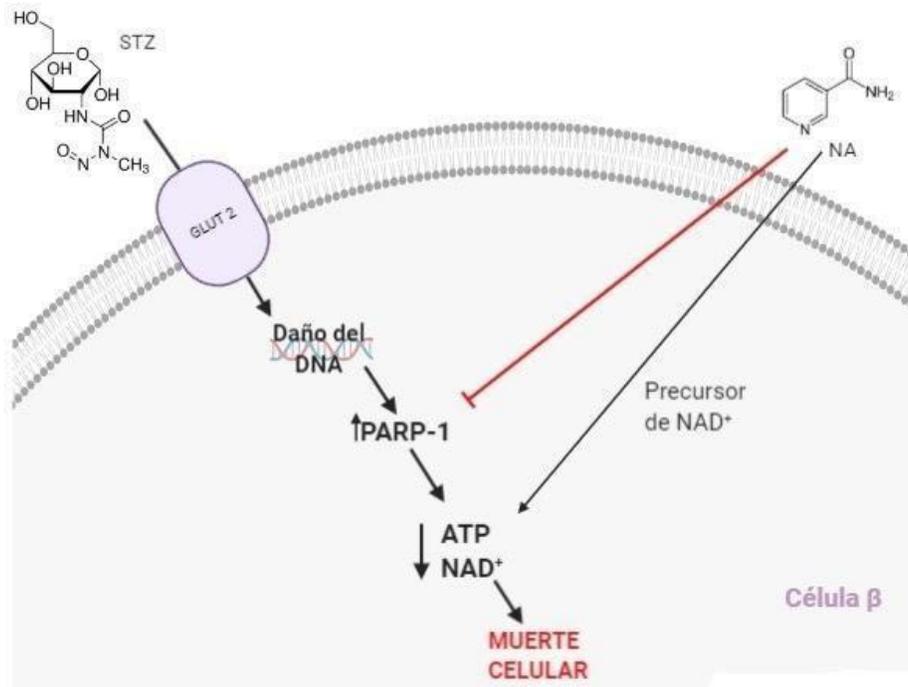


Figura 13. Mecanismo de inducción del modelo STZ-NA. Se muestra la representación esquemática de la acción citotóxica de la STZ y la acción protectora de la NA en la célula β. La STZ provoca daño directo en el DNA, aumentando los niveles de PARP-1, lo que lleva a una disminución en los niveles energéticos celulares que a su vez incita a una muerte celular. La NA es un precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y un inhibidor de PARP-1, lo que permite una protección parcial de la célula β. Tomada y modificada de (Szkudelski, 2012).

Justificación

La DM2 se ha convertido en un grave problema de salud a nivel mundial debido a su elevada morbilidad y mortalidad; sin embargo, los esfuerzos que se han llevado a cabo para entender esta enfermedad no han sido suficientes, ya que en la actualidad aún existen muchas incógnitas, tanto del cómo y cuándo se desarrolla tal enfermedad, así como de su tratamiento, su detección temprana y, por supuesto, su prevención. Por lo tanto, es importante promover la búsqueda de nuevas moléculas que, adicionalmente a los conocimientos ya adquiridos, permitan controlar de mejor manera los niveles de glucosa que, a largo plazo, pueden conducir a complicaciones vasculares y disminuir la calidad de vida de los pacientes.

Al ser México un país con una alta gama de tradiciones y cultura, los conocimientos del uso tradicional de una gran cantidad de productos naturales han sido aplicados a lo largo de la historia al tratamiento de muchas de las enfermedades y, gracias a ello, por medio de herramientas como la etnofarmacología, se han podido recopilar una gran cantidad de datos, para posteriormente llevar a cabo estudios que nos permitan evaluar la eficacia de estas moléculas o extractos completos sobre la DM. En este caso, se utilizan modelos animales inducidos para evaluar el efecto hipoglucemiante de plantas, que forman parte de la medicina tradicional de las comunidades étnicas, como lo es *C. integrifolia*, de la cual gracias a estudios previos se ha podido corroborar su efecto sobre la hiperglucemia inducida en ratas, por consiguiente es importante dilucidar el mecanismo de acción y el tejido blanco sobre el cual actúa.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

-Evaluar el efecto del extracto acuoso de la parte aérea (tallos y hojas) de *Calea integrifolia* sobre la gluconeogénesis hepática.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Evaluar el efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* sobre la gluconeogénesis hepática en ratas STZ-NA realizando pruebas de tolerancia al piruvato.

-Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa de microsomas hepáticos de rata.

Hipótesis

- En la prueba *in vivo*, el extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* inhibirá la gluconeogénesis en las pruebas de tolerancia al piruvato; observando un efecto antihiper glucemiante posterior a la administración del extracto y del piruvato.
- En la prueba *in vitro*, el extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* inhibirá a la actividad de la enzima G6Pasa.

Metodología

1. Obtención del material biológico

El material biológico fue proporcionado por el laboratorio de Etnofarmacología. *C. integrifolia* fue colectada en octubre de 2016 a orillas de la carretera Hidalgo Otongo - Santa Ana de Allende, cerca de la comunidad de Tamala, con ayuda de un guía local. Las coordenadas del sitio son 21° 0' 34" N (latitud) y 98°47'57" O (longitud). Posteriormente, fue secada en la unidad de ambientes controlados de la Facultad de Ciencias en una cámara caliente a 40 °C.

2. Preparación del extracto acuoso de *C. integrifolia*

El extracto acuoso se obtuvo a partir del material vegetal previamente seco. Se molió la parte aérea de la planta. Se agregaron 20 g de planta molida en 500 ml de agua destilada en ebullición, se mantuvo en agitación por 15 min y se dejó reposar por otros 5 min. Posteriormente, se filtró utilizando 10 cm² de papel filtro marca Whatman® y tierra de diatomeas en un embudo Büchner conectado a un matraz kitasato y a una bomba de vacío. Posteriormente, se ultracongeló a -40 °C en un ultracongelador para finalmente ser liofilizado 24 horas después en una liofilizadora LABCONCO® FreeZone 2.5. Después de este proceso se obtuvo el extracto seco de *C. integrifolia*.

3. Cálculo de dosis

Para el cálculo de la dosis administrada a los animales experimentales, se obtuvo el peso final del extracto seco (equivalente a los 20 g de material vegetal utilizados inicialmente). Tomando en cuenta que en campo se ha establecido que los 20 g de planta se utilizan para una persona de 70 kg, se realizó el cálculo pertinente utilizando la siguiente fórmula para obtener la dosis requerida para 1 kg de peso:

$$\text{Dosis} = \frac{\text{Peso final del extracto (g)}}{70 \text{ kg}} = (\text{g/kg})$$

4. Experimento *in vivo* de la Inhibición de la gluconeogénesis hepática

4.1 Animales experimentales

Se utilizó un total de 36 ratas de la cepa Wistar, de ambos sexos, con un peso aproximado de 250 g, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se mantuvieron con fotoperiodos de 12h/12h de luz/oscuridad con libre acceso a agua y alimento.

4.2 Inducción del modelo STZ-NA

Como se mencionó anteriormente, la inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA se llevó a cabo de acuerdo al modelo desarrollado por Masiello y colaboradores en 1998, con algunas modificaciones. Un día previo a la inducción, se preparó la solución de STZ y se refrigeró a 4°C hasta su utilización; por otro lado las ratas fueron privadas de alimento 12 h antes. La preparación de la NA fue al momento de la inducción, inyectándose una dosis de 150 mg/kg (i.p.) disuelta en 2 ml de solución fisiológica por kg de peso; después de 15 min, se administró STZ a una dosis de 65 mg/kg (i.v.) disuelta en 1 ml de buffer de acetatos a un pH de 4.5 (0.9% de acetato de sodio en 105 mM de ácido acético) por kg de peso. Una semana después de la inducción, se eligieron aquellos organismos con una glucemia mayor a 300 mg/d para que, al ser sometidas a 18 h de ayuno, presentaran valores de glucosa alrededor de 200 mg/dl.

4.3 Pruebas de tolerancia al piruvato

Para llevar a cabo el estudio *in vivo* se utilizaron diferentes grupos experimentales con un **n** de 6 para cada grupo. Estos grupos se muestran en la **Tabla 2**.

La prueba de tolerancia a piruvato consiste en administrar un sustrato como el piruvato, con el fin de iniciar la producción de glucosa por medio de la vía gluconeogénica en ratas STZ-NA y observar un aumento en el pico hiperglucémico, de modo que se pueda observar el efecto del extracto sobre el dicho pico al ser administrado. Para realizar dicha prueba, se midió la glucosa plasmática basal por duplicado con glucómetros y tiras reactivas Accu-Chek® Active en ratas con un ayuno prolongado de 18 h, para asegurar que la glucosa en sangre haya sido producto de gluconeogénesis, y así observar el efecto de los tratamientos sobre el pico hiperglucémico. Posteriormente, se administró vía oral, por medio de una cánula esofágica para rata, solución fisiológica, fármaco o extracto

según fuese el caso. La solución fisiológica o el piruvato de sodio se inyectaron 15 min después de la administración oral, por vía intraperitoneal, y pasados 30 min se midió la glucosa en sangre por duplicado cada media hora durante 2 h.

Tabla 2. Grupos experimentales para las pruebas de tolerancia a piruvato con su respectivo tratamiento y dosis.

Grupo experimental	Tratamiento	Dosis
Control Normoglucémico (N)	-Solución fisiológica (p.o.) -Solución fisiológica (i.p.)	- -
Control Hiperglucémico (H)	-Solución fisiológica (p.o.) -Solución fisiológica (i.p.)	- -
Control Normoglucémico + Piruvato (NP)	-Solución fisiológica (p.o.) -Piruvato de sodio (i.p.)	- 2 g/kg
Control Hiperglucémico + Piruvato (HP)	-Solución fisiológica (p.o.) -Piruvato de sodio (i.p.)	- 2 g/kg
Control Hiperglucémico + Piruvato + Metformina (HPM)	-Metformina (p.o.) -Piruvato de sodio (i.p.)	500 mg/kg 2 g/kg
Grupo Hiperglucémico + Piruvato + <i>C. integrifolia</i> (HPCi)	- Extracto acuoso (p.o.) -Piruvato de sodio (i.p.)	41 mg/kg 2 g/kg

5. Inhibición de la G6Pasa por medio de experimento *in vitro*

Una vez realizada la prueba de tolerancia al piruvato, es necesario confirmar los resultados obtenidos, por lo que se realizó una prueba *in vitro*, la cual involucra la inhibición de la enzima G6Pasa obtenida de microsomas del hígado de rata, midiendo por espectrofotometría la cantidad de fosfato liberado, y de esta manera observar la inhibición de la actividad enzimática (Andrade-Cetto & Vázquez, 2010).

5.1 Obtención de microsomas

Para obtener los microsomas, se sometieron cuatro ratas de la cepa Wistar a un ayuno prolongado de 18 h. Posteriormente, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (10 u/100 g, i.p.) para ser disectadas y extraer el hígado. Se pesó cada hígado y se cortaron fracciones de 2 g aproximadamente, colocados en cajas Petri previamente puestas en hielo. Cada fragmento fue colocado en un homogeneizador DOUNCE y se agregaron 8 ml de buffer de sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM a pH 7.4. El homogenado al 10% se filtró con ayuda de una gasa y se colectó en un vaso de precipitados de 50 ml.

El volumen final de homogenado fue dividido en tubos Falcon® de 15 ml que se calibraron y centrifugaron a 1000 g por 10 minutos a 4°C; posteriormente, el sobrenadante se colectó en varios tubos de policarbonato de 14 ml que fueron calibrados y colocados en un rotor de ángulo fijo enfriado a 4°C para ser centrifugados a 12000 g durante 10 minutos en una centrifuga Beckman. El sobrenadante post-mitocondrial obtenido fue colectado en otros tubos de policarbonato que se centrifugaron a 100000 g durante una hora. Las pastillas obtenidas se lavaron tomando buffer con una pipeta Pasteur y se guardaron a -40°C en un ultracongelador Revco™.

5.2 Ensayo de actividad de glucosa-6fosfatasa de los microsomas

Una vez obtenidos los microsomas, se realizó una prueba de actividad para determinar la concentración adecuada de microsomas en el ensayo, es decir, una concentración que forme parte de la región lineal de la gráfica entre el volumen o mg de proteína de microsomas en el ensayo y la actividad de G6Pasa, para utilizar en el ensayo de

inhibición de la G6Pasa. Se preparó el buffer (imidazol 40 mM, sacarosa 0.5 M a pH 7.0) y la solución para detener la reacción y medir la concentración de fosforo inorgánico liberado por la acción de la G6Pasa (molibdato de amonio al 0.42%, SDS al 10% y ácido ascórbico al 10%). Esta solución, denominada como solución de trabajo, fue preparada unas horas antes del ensayo y se mantuvo en hielo hasta ser utilizada. Se resuspendió una pastilla de microsomas en 1 ml de buffer utilizando un vortex; y se colocó en hielo.

En una gradilla se colocaron nueve tubos de ensayo de 10 ml. En cada tubo se agregó un volumen total de reacción de 100 μ l, donde se añadieron: 5, 10 o 15 μ l de microsomas, 50 μ l buffer; 10 μ l de G6P 20 mM y agua destilada para completar los 100 μ l; la reacción se inició al agregar la G6P a dos de los tres tubos de cada concentración de microsomas. La reacción se realizó a 22°C.

Se incubó por 20 minutos y se detuvo la reacción al añadir 900 μ l de solución de trabajo. Posteriormente, se añadió G6P a los tubos blanco de cada concentración de microsomas. Los tubos se incubaron en baño maría a 45°C por 20 minutos, con la finalidad de determinar el contenido de fosforo inorgánico producido por la actividad de la G6Pasa, midiendo la absorbancia de la coloración azul obtenida a una longitud de onda de 830 nm.

5.3 Ensayo de inhibición de la G6Pasa

Una vez realizada la prueba para seleccionar la concentración de microsomas a utilizar, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la enzima G6Pasa, para el cual se utilizaron 48 tubos de ensayo de 10 ml que fueron colocados en una gradilla. En cada tubo se colocó un volumen total de reacción de 100 μ l, donde se añadieron: 50 μ l de buffer, agua destilada a distintos volúmenes para completar el volumen de reacción; ácido clorogénico (inhibidor) (previamente disuelto en una mezcla metanol-agua 1:9) o el extracto a distintas concentraciones (0, 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 12000 μ g/ml de ensayo); el volumen seleccionado de microsomas; y 10 μ l de G6P 20 mM, que al igual que en el ensayo de actividad de microsomas se agregó al final.

Al añadir los microsomas se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min para que tanto el inhibidor como la enzima entren en contacto. Se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito previamente en el ensayo de actividad de microsomas para

finalizar con la obtención de los valores de densidad óptica por la formación de un color azul dependiente de la concentración de fosforo inorgánico.

6. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos y la elaboración de gráficos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.00, GraphPad Software. Para el caso de las pruebas de tolerancia al piruvato, los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía y, como prueba de comparaciones múltiples, se utilizó Tukey con un valor de significancia de $p < 0.05$. Se hicieron comparaciones intergrupales, es decir entre los valores de glucosa plasmática en los diferentes tiempos de cada grupo; y comparaciones intragrupalas, en donde se compararon los valores de glucemia en los diferentes tiempos respecto a sus tiempo cero. Por otro lado, también se obtuvieron análisis del área bajo la curva (AUC) de todos los grupos; mientras que para la obtención de los valores de IC_{50} de la prueba *in vitro*, se realizaron regresiones no lineales de tres y cuatro parámetros.

Resultados

1. Cálculo de dosis

A partir de los 20 g de material herbal de *C. integrifolia* se obtuvieron 2.87 g de extracto seco, sustituyendo en la fórmula se obtuvo la dosis por cada kg de peso:

$$\text{Dosis: } \frac{2.87 \text{ g}}{70 \text{ g}} \times 0.041 \text{ g/kg} = 41 \text{ mg/kg}$$

2. Prueba de tolerancia al piruvato

Por medio de la prueba de tolerancia al piruvato con duración de 120 min se evaluó el efecto de los tratamientos administrados sobre la gluconeogénesis hepática en ratas. En el grupo control normoglucémico (N) se observó que los niveles de glucosa se mantuvieron durante la prueba, como se muestra en la **Tabla 3**, por lo que no hay diferencias significativas respecto a su tiempo 0; mientras que en el grupo control normoglucémico tratado con el sustrato gluconeogénico piruvato (NP), los niveles de glucosa se ven aumentados significativamente en el T30, 60 y 90 vs. el grupo N, además, se presentaron diferencias significativas en cada uno de los tiempos respecto a su T0 (**Tabla 3**); sin embargo, al ser organismos normoglucémicos, se puede observar cómo los niveles de glucosa tienden a disminuir alcanzando niveles basales (**Fig. 14**), ya que en el T120 no se presentaron diferencias significativas contra el grupo N.

Para el caso del grupo control con hiperglucemia inducida (H) se observa un aumento significativo desde el T0, que se mantiene estable hasta el T120 respecto al grupo N (**Fig.14**). En este grupo se puede determinar la eficacia del modelo STZ-NA, debido a que al haber un daño parcial en las células beta, la secreción de insulina disminuye, por lo que la glucemia de los organismos se ve alterada significativamente. En este caso, se muestran diferencias significativas en los tiempos 30 y 60 respecto a su tiempo 0, sin embargo, estos cambios pueden ser atribuidos al manejo de los organismos (estrés), ya que los niveles se restablecen en el T90, mostrando nuevamente la estabilidad del modelo STZ-NA.

Debido al tratamiento con piruvato, en el grupo control HP, las diferencias significativas respecto al grupo H se observan desde el T30, debido a la inyección de este sustrato, manteniéndose hasta el T120. Este resultado contrasta con el efecto observado en el grupo NP, ya que HP no regresa a niveles basales de glucosa, manteniéndose en un rango de 344 mg/dl (**Tabla 3**), lo que permitió la evaluación del efecto de los tratamientos posteriores.

Al demostrar que la inyección de piruvato generó un aumento significativo en los niveles de glucosa en ratas con un ayuno de 18 hrs, permitiendo la iniciación de la vía gluconeogénica, se procedió a observar el efecto del fármaco metformina sobre la HGP. En este caso el grupo tratado con metformina (HPM) presentó una inhibición del pico hiperglucémico, es decir, no hubo diferencia significativa a partir del T30 hasta el T90 respecto al T0, observándose un comportamiento dual: antihyperglucemiante en el T30 e hipoglucemiante a partir del T60. Los valores del T120 fueron parecidos al grupo NP (**Tabla 3**). Estos resultados mostraron la eficacia de este tratamiento, que se observa al compararlo con el grupo HP, en el que hay diferencia significativa a partir del T30 (**Fig. 14**).

Con la administración de *C. integrifolia* en el grupo HPCi se observaron diferencias significativas a partir del T30 hasta el T120 respecto al T0 del grupo, sin embargo, cabe destacar que el extracto evitó la elevación de los niveles de glucosa, presentando un efecto antihyperglucemiante confirmado por las diferencias significativas que presentó en los tiempos 30, 60 y 90 respecto al grupo HP (**Fig. 14**).

Tabla 3. Valores medios de glucosa plasmática ± error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato. Se muestran los valores medios de glucosa plasmática (mg/dl) ± el error estándar de los diferentes grupos, así como la diferencia significativa ($p < 0.05$). Donde "a" expresa la diferencia significativa respecto al grupo N; "b" representa la diferencia significativa respecto al grupo H; "c" indica diferencia significativa contra el grupo HP. Mientras que * representa la diferencia significativa de los diferentes tiempos respecto a su tiempo 0 de cada grupo.

Glucosa plasmática (mg/dl)					
Grupo (n=6)	T0	T30	T60	T90	T120
N	111 ± 3	118 ± 3	109 ± 2	105 ± 2	110 ± 4
NP	106 ± 4	169 ± 4 ^{a*}	167 ± 7 ^{a*}	151 ± 9 ^{a*}	135 ± 9 [*]
H	185 ± 5 ^a	220 ± 6 ^{a*}	214 ± 11 ^{a*}	209 ± 10 ^a	201 ± 13 ^a
HP	209 ± 9 ^b	338 ± 7 ^{b*}	345 ± 9 ^{b*}	359 ± 14 ^{b*}	344 ± 16 ^{b*}
HPM	211 ± 9	247 ± 16 ^c	193 ± 21 ^c	170 ± 24 ^c	152 ± 26 ^{c*}
HPCi	195 ± 9	283 ± 16 ^{c*}	302 ± 15 ^{c*}	320 ± 13 ^{c*}	320 ± 16 [*]

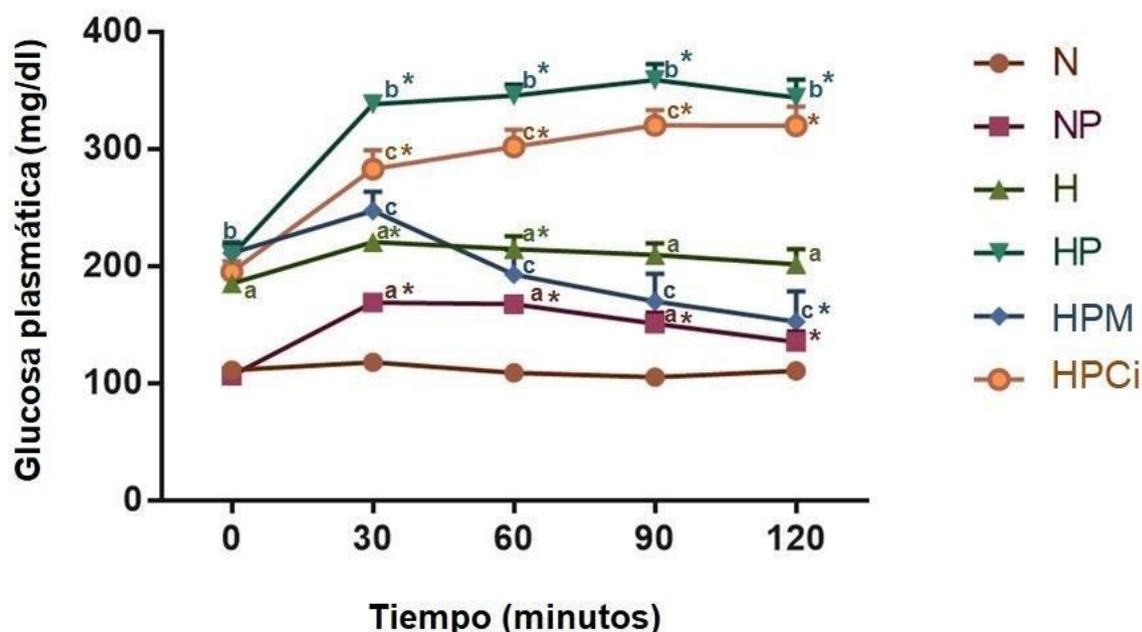


Figura 14. Gráfica de los valores medios de glucosa plasmática ± error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato. Se muestran los valores medios de glucosa plasmática (mg/dl) de los diferentes tiempos de cada grupo experimental, con una diferencia significativa de $p \leq 0.05$. Donde "a" expresa la diferencia significativa respecto al grupo N; "b" representa la diferencia significativa respecto al grupo H; "c" indica diferencia significativa contra el grupo HP. Mientras que * representa la diferencia significativa de los diferentes tiempos respecto al tiempo 0 en cada grupo.

Por otra parte, el análisis de AUC permitió observar un comportamiento global de los niveles de glucosa plasmática de cada uno de los grupos a lo largo del experimento (**Fig. 15**). Al igual que como se muestra en la **Figura 14**, se observa un aumento en los niveles de glucosa plasmática al administrar el piruvato en los grupos NP y HP, que al compararlos con los grupos N y H muestran una diferencia estadísticamente significativa.

En el caso del grupo control positivo (HPM), se confirmó la inhibición de la vía gluconeogénica, ya que muestra una reducción significativa del área al compararse contra el grupo HP. Finalmente, al comparar el grupo experimental (HPCi) respecto al grupo HP también se puede observar una disminución significativa del área, lo que verifica que hay una disminución de glucosa circulante (**Fig.15**).

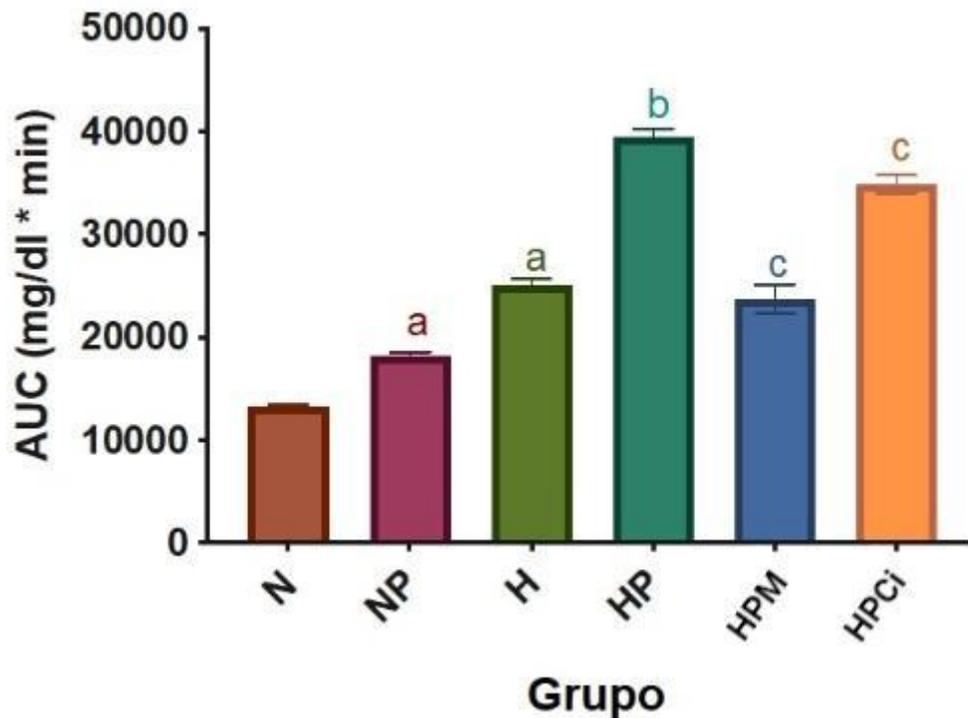


Figura 15. Gráfica de AUC de los valores medios de glucosa plasmática ± error estándar de la prueba de tolerancia al piruvato. "a" representa diferencia significativa vs. N; mientras que "b" representa diferencias significativas vs. H y "c" diferencias significativas vs HP (p<0.05).

3. Cinética enzimática de G6Pasa

La prueba *in vitro* que se llevó a cabo fue una cinética enzimática de inhibición de la G6Pasa, con el fin de evaluar la potencial reducción de la actividad enzimática del extracto acuoso de *C. integrifolia*. Esta prueba permitió conocer la concentración del extracto en la que se disminuye la mitad de la actividad enzimática, es decir, la IC₅₀.

Como control se realizó una curva concentración-respuesta de ácido clorogénico, el cual es un inhibidor natural de G6Pasa T1, de igual manera, es un compuesto identificado en estudios anteriores de *Calea integrifolia*. Como resultado se observó una reducción total de la actividad enzimática, presentando una IC₅₀ de 278 µg/ml; dicha curva se ajustó a una regresión no lineal de cuatro parámetros (**Fig. 16 A**). Por otro lado, la curva del extracto acuoso de *C. integrifolia*, al igual que en la curva de ácido clorogénico, se ajustó a una regresión no lineal de cuatro parámetros, presentando una IC₅₀ de 406 µg/ml (**Fig. 16 B**).

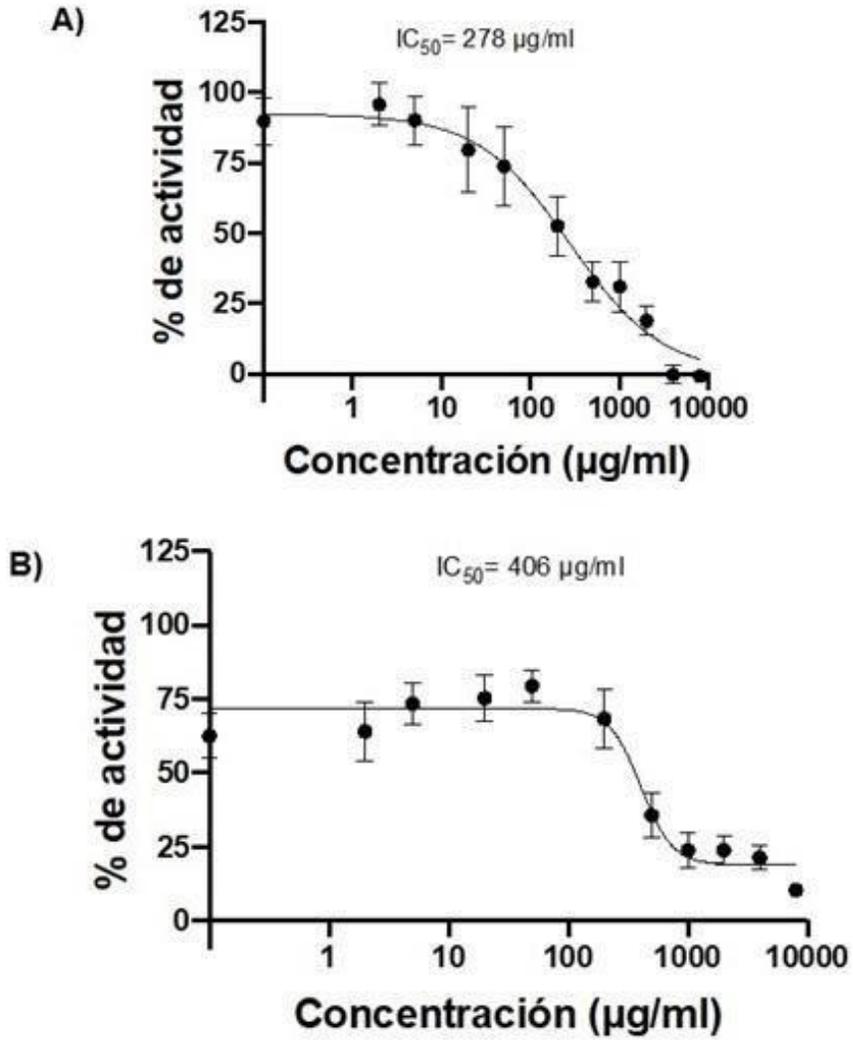


Figura 16. Curvas de inhibición concentración-respuesta de la actividad enzimática de G6Pasa. Se muestran las curvas de inhibición de la enzima G6Pasa de los dos tratamientos: A) ácido clorogénico, IC_{50} de $278 \mu\text{g/ml}$. B) extracto acuoso de *C. integrifolia* con un valor de $IC_{50} = 406 \mu\text{g/ml}$.

Discusión

De acuerdo con los resultados y como se mencionó anteriormente, se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de glucosa entre el grupo N vs. el grupo H; el aumento en los niveles de glucosa del grupo H, confirman la efectividad del modelo STZ-NA para este estudio, ya que al presentar un daño en las células beta, la secreción de insulina se ve comprometida, evidenciando el aumento significativo de glucosa plasmática. En el caso del grupo H, se observó que los niveles de glucosa aumentaron significativamente en los tiempos 30 y 60 respecto a su tiempo 0; sin embargo, esto se atribuye al estrés provocado por el manejo del animal durante la prueba.

En el caso de los grupos en los que se inyectó piruvato se observó un evidente aumento en los niveles de glucosa de las ratas con un ayuno de 18 h. Como se mencionó anteriormente, el piruvato es un sustrato gluconeogénico, por lo que los organismos al encontrarse en un ayuno prolongado, la liberación de glucosa por medio del hígado será producida de *novo*, y al inyectar el piruvato aseguramos que la vía por la que se suministra de glucosa al organismo es la gluconeogénica.

Utilizando el grupo HP es posible comparar y determinar el efecto inhibitorio de los tratamientos a los que se sometieron los organismos. En el caso del grupo HPM, se observó una inhibición sobre el pico hiperglucémico y una disminución significativa de los niveles de glucosa, en los que de acuerdo a la **Fig. 14**, se muestra que en el T120 tienden a alcanzar valores normoglucémicos. Estos resultados nos permiten evidenciar la operatividad de la metformina como control positivo, ya que este fármaco se conoce principalmente por la reducción de la HGP por medio de la inhibición de la gluconeogénesis, sin embargo al control de glucemia en pacientes con DM2 con metformina se le suman otros mecanismos de acción como son la inhibición de la glucogenólisis, el aumento en la captación de glucosa a nivel muscular, así como la disminución en la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal (Vicente et al., 2019). Por lo que la disminución en los valores de glucemia observada en la **Tabla 3** se le puede atribuir al conjunto de estos mecanismos.

Por otra parte, en el grupo experimental (HPCi), se observó una significativa disminución en los niveles de glucosa comparándola con el grupo HP, lo que indica una inhibición sobre la gluconeogénesis; el que no haya significancia en el T120, se debe al aumento en los niveles de glucosa, que podría atribuirse a la biodisponibilidad del extracto. Sin embargo, al observar el comportamiento general de los niveles de glucosa plasmática por medio del análisis del AUC de la prueba nos permitió corroborar la inhibición sobre la gluconeogénesis al presentar diferencias significativas entre ambos grupos.

Al contrario de un fármaco en el que la sustancia activa se encuentra aislada y con una dosis específica, la administración y efecto del extracto de plantas en un organismo es más complejo debido a que el extracto contiene más de un principio activo, permitiendo que haya una variación en el contenido por la elaboración del mismo. En el caso de la administración de extractos es importante tomar en cuenta las interacciones farmacocinéticas que se pueden llegar a producir, como alteraciones en el pH digestivo, aceleración o ralentización del tránsito gastrointestinal, e incluso por la formación de complejos no absorbibles en el proceso de absorción; así como en la distribución, metabolismo o excreción del extracto (López, 2011).

Posterior a la inyección de piruvato y administración a una dosis tradicional del extracto acuoso de *C.integrifolia*, se registró un aumento de forma significativa de los niveles de glucosa en todos los tiempos respecto su tiempo cero, lo que puede atribuirse principalmente a dos factores: el primero es, que como se mencionó anteriormente, puede deberse a cuestiones farmacocinéticas (deficiente absorción); mientras que, el segundo factor, pudo haber sido la dosis tradicional del extracto acuoso, ya que pudo no ser suficiente para que hubiera una mayor inhibición en vía gluconeogénica. Para corroborar este último punto se sugiere la modificación de la dosis del extracto y así, podríamos observar una mayor inhibición del pico hiperglucémico.

Tanto el uso tradicional del extracto acuoso de esta planta como el efecto hipoglucemiante fueron verificados mediante un estudio realizado en el año 2019 por Yacini; mientras que estudios realizados por Ramos-Torres en el año 2018, por medio de pruebas *in vivo* e *in vitro* se descartó que el mecanismo de acción del extracto es por el efecto inhibitorio sobre enzimas alfa-glucosidasa. Sin embargo, a partir de ambos trabajos se delimitaron y observaron metabolitos secundarios como el ácido clorogénico, que

dieron pie a este trabajo, en el que se planteó que el mecanismo de acción podría ser por medio de la inhibición de la gluconeogénesis, contribuyendo así a la disminución en los niveles de glucosa en pacientes con DM que consumen esta planta de manera tradicional.

Dentro de los metabolitos secundarios que se identificaron en estudios anteriores, se reportaron dos compuestos fenólicos conocidos principalmente por su capacidad de inhibición de vías como la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática por medio de la interacción con la enzima G6Pasa. Estos compuestos son el flavonoide rutina, la cual inhibe la expresión transcripcional de dicha enzima, y el ácido clorogénico, que inhibe directamente la actividad de la G6Pasa T1 (Yacini, 2019). Por lo tanto, la presencia de estos compuestos explica la disminución en la actividad de la enzima que se muestra en la curva de concentración respuesta del extracto acuoso (**Fig.15**), exhibiendo que uno de los mecanismos de acción del extracto de *C.integrifolia* es la inhibición de la producción de glucosa hepática.

Sin embargo, a pesar de observar una disminución en la actividad de esta enzima, el valor de la IC₅₀ que es de 406 µg/ml, que es mucho mayor si se compara con la IC₅₀ del ácido clorogénico; tomando en cuenta que el ácido clorogénico es una sustancia activa y aislada, al contrario del extracto de *C.integrifolia*, que como se mencionó anteriormente varía en la absorción y distribución en el cuerpo, dado lo siguiente, se podría pensar que no es el mecanismo de acción principal por el cual la planta presenta un efecto hipoglucemiante. El ácido clorogénico y la rutina, además de inhibir la gluconeogénesis, tienen otras propiedades como la de aumentar la captación de glucosa en los tejidos diana y la estimulación de la secreción de insulina de las células β, por lo que podrían ser otros mecanismos por los cuales actúa *C. integrifolia*.

De acuerdo a lo anterior, se sugiere la realización de pruebas farmacológicas que permitan conocer otros mecanismos de acción del extracto de la planta; por ejemplo, para el caso de la secreción de insulina, se podría cuantificar la concentración plasmática de la insulina de ratas STZ-NA por medio de pruebas de ELISA. Por otro lado, para comprobar la captación de glucosa en los tejidos, se sugiere un estudio en el cual se analice el efecto del extracto sobre la absorción de 2-desoxiglucosa (reconocida por los

transportadores de glucosa de la célula) por los miotubos L6 del músculo, determinando la expresión de GLUT4 del tejido (Wei, Hsu, & Huat, 2012).

Otro de los mecanismo de acción que se pueden asociar al extracto de *C. integrifolia* es la inducción de la diferenciación de adipocitos, ya que en estudios anteriores demostraron que diferentes extractos de especies pertenecientes al género *Calea*, entre ellas *C. integrifolia*, poseían sesquiterpenos con efectos inhibitorios sobre la diferenciación de adipocitos; por lo que, al suprimir la formación de adipocitos, no se formará tejido adiposo, lo que es benéfico para el control de enfermedades relacionadas a la obesidad como es la diabetes (Linuma et al., 2005).

Finalmente, es necesario la realización de estudios fitoquímicos que permitan la identificación de todos los metabolitos secundarios pertenecientes al extracto de *C. integrifolia*, ya que de esa forma será posible dilucidar todos los mecanismos de acción que permiten una disminución en los niveles de glucosa plasmática.

Conclusiones

El uso de *C. integrifolia* para el tratamiento de la DM2 se registró en el año 2005 por medio de estudios etnofarmacológicos. A partir de ello, se han llevado a cabo diferentes estudios fitoquímicos y farmacológicos que han permitido conocer algunos de los metabolitos secundarios como son rutina, lactonas, sesquiterpenos y ácido clorogénico, y sus posibles mecanismos de acción. Particularmente, en este proyecto se evaluó el efecto del extracto acuoso de *C. integrifolia* sobre la gluconeogénesis hepática con pruebas *in vivo* e *in vitro* en ratas STZ-NA y se concluye lo siguiente:

- El extracto acuoso de *C. integrifolia* disminuye la producción de glucosa hepática en el modelo utilizado e inhibe la actividad de la glucosa 6 fosfatasa *in vitro*.

Perspectivas

De acuerdo a los resultados de este proyecto, es importante considerar la realización de estudios posteriores que permitan esclarecer del todo el efecto hipoglucemiante de la planta *C. integrifolia*, por lo que se sugiere llevar a cabo estudios fitoquímicos que posibiliten la identificación de los metabolitos secundarios pertenecientes a la planta, así como la realización de pruebas farmacológicas que permitan identificar otros mecanismos de acción, además de aumentar la dosis tradicional, probar otras vías de administración y determinar el efecto del extracto sobre otras enzimas de la vía gluconeogénica o mecanismos de regulación relacionados.

REFERENCIAS

- Abdel-Barry, J. A., Abdel-Hassan, I. A., & Al-Hakim, M. H. H. (1997). Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 58(3), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00101-3)
- Aguiar, P., Costa, F., Rocha, A., Kautz, J., Citadini-Zanette, V., Lohézic-Le, F., ... DalBó, S. (2017). The genus *Calea* L.: A review of isolated compounds and biological activities. *Journal of Medicinal Plants*, 11(33), 518–537. <https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6412>
- Alpert, P. T. (2016). Screening for Diabetes Mellitus Type 2: Shifting the Focus on Diagnosis. *Home Health Care Management & Practice*, 28(1), 70–72. <https://doi.org/10.1177/1084822314559941>
- American Diabetes Association. (2019). Clasificación y diagnóstico de la diabetes: Estándares para la Atención Médica de la Diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(1), 194. Recuperado de <https://doi.org/10.2337/dc19-S002> American Diabetes Association%0ALos
- Ampudia-Blasco, F. J. (2003). Fallo celular beta y progresión de la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, 50(7), 274–279. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(03\)74538-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(03)74538-0)
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2011). From the Field into the Lab: Useful Approaches to Selecting Species Based on Local Knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00020>
- Andrade-Cetto, A., & Vázquez, R. C. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.016>
- Appleton, A., & Vanbergen, O. (2013). Lo esencial en Metabolismo y nutrición (4a ed.; D. Horton-Szar, Ed.). Barcelona, España: ELSEVIER.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Baginski, E. S., Foà, P. P., & Zak, B. (1974). Glucose-6-phosphatase. En Elsevier (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (2a ed., Vol. 2, pp. 876–880). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50072-4>
- Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2008). Bioquímica (6ta ed.; E. Reverté, Ed.). Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=HRr4MNH2YssC&vq=insulina&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., Aragonès, G., & Auguet, T. (2016). Papel de las lipasas metabólicas y la lipotoxicidad en el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 28(1), 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2015.03.003>
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Martins, G. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2), 76–86. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/559/55926202.pdf>

- Bhandarkar, N. S., Brown, L., & Panchal, S. K. (2019). Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. *Nutrition Research*, *62*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.002>
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1976). C17-Acetylenverbindungen aus *Calea integrifolia*. *Phytochemistry*, *15*(7), 1177. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(76\)85125-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(76)85125-4)
- Brendan, N., Aguirre, V., Navarro, D., Casco, R., Ismael, M., & Espada, T. (2002). INTERRELACIONES METABÓLICAS. Recuperado de <https://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/FaiUnneAr/Pdf/Interrelaciones.pdf>
- Buchanan, T. A., Xiang, A., Kjos, S. L., & Watanabe, R. (2007). What is gestational diabetes? *Diabetes care*, *30* Suppl 2(Supplement 2), S105-11. <https://doi.org/10.2337/dc07-s201>
- Bueno, J. G., Gutierrez, F., Isaza, G., Carmona, W. D., & Perez, J. E. (2001). Estudio etnofarmacológico de plantas usadas empíricamente por posibles efectos inmunoestimulantes. *Rev Med Risaralda*, *7*(1), 8–12.
- Canché-Aguilar, D. L., Zapata-Vázquez, R. E., Rubio-Zapata, H. A., & Cámara-Vallejos, R. M. (2019). Efecto de una intervención educativa sobre el estilo de vida, el control glucémico y el conocimiento de la enfermedad, en personas con diabetes mellitus tipo 2, Bokobá, Yucatán. *Revista Biomédica*, *30*(1). Recuperado de <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v30i1.654>
- Castellanos, C. (2014). Metabolismo de hidratos de carbono. En Elsevier (Ed.), *Las Enfermedades Metabólicas y su Impacto en la Salud* (pp. 13–45). Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/unam/reader.action?docID=1746652&ppg=24>
- Cervantes-Villagrana, R. D., & Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, *21*(3), 98–106. Recuperado de www.medigraphic.org.mx
- Charkoudian, L. K., Farrell, B. P., & Khosla, C. (2012). Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase. *MedChemComm*, *3*(8), 926. <https://doi.org/10.1039/c2md20008b>
- Chaves-Ulate, E., & Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Chlorogenic acids present in coffee: Antioxidant and antimicrobial capacity. *Agronomy Mesoamerican*, *30*(1), 299–311. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32974>
- CONABIO. (2019). Amula (*Calea integrifolia*). Recuperado el 15 de abril de 2020, de Enciclovida website: <http://enciclovida.mx/especies/6061290>
- Contreras-Zúñiga, E., Guillermo-Arango, L., Ximena Zuluaga-Martínez, S., Ocampo, V., Cirujano Angiografía de Occidente Cali, M. S., Cirujano SENA Cali, M., & Resumen, C. (2008). Diabetes y embarazo, Diabetes and pregnancy. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *59*(1), 38–45.
- Couselo-Fernández, I., & Rumbo-Prieto, J. M. (2018). Riesgo de pie diabético y déficit de autocuidado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Enfermería Universitaria*, *15*(1), 17–29. <https://doi.org/10.22201/eneo.23958421e.2018.1.62902>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*(1), 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Delarue, J., & Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *10*(2), 142–148. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328042ba90>

- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2018). Diabetes en población de 20 años y más años. En *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. Recuperado de https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Engelking, L. R. (2015). Gluconeogenesis. En Elsevier (Ed.), *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* (3a ed., pp. 225–230). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50037-2>
- Espinoza-Hernández, F. A. (2017). *Efecto de los extractos de la raíz de Smilax moranensis M. Martens & Galeotti y de la parte aérea de Ageratina petiolaris (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. sobre la gluconeogénesis hepática en ratas STZ-NA (UNAM)*. Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2017/enero/0754794/Index.html>
- Federación Mexicana de Diabetes. (2018). Principales causas de mortalidad en México. Recuperado el 14 de febrero de 2019, de <http://fmdiabetes.org/principales-causas-mortalidad-mexico-2/>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Gallego, C., & Ferreira, F. (2015). Plantas medicinales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2: una revisión. *Farmacéuticos comunitarios Revista trimestral*, 7(4), 27–34. Recuperado de <https://www.raco.cat/index.php/FC/article/view/320982/411463>
- Hinton, G. (s/f). *Calea integrifolia (DC.) Hemsl.* Recuperado el 15 de abril de 2020, de Tropic.org Jardín Botánico de Missouri website: <http://legacy.tropicos.org/Image/100011152>
- Hugués, B., Rodríguez, J., Rodríguez, J., & Marrero, M. (2002). Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Cubana de Endocrinología*, 13(2), 174–177. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532002000200009
- Iinuma, M., Tanaka, T., Ubukata, M., Nobuyasu, M., Yamada, M., & Suzuki, H. (2005). Sesquiterpenoid derivatives having adpocyte differentiation inhibitory effect. En *Patent Application Publication* (Vol. 1). Recuperado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/46/dd/fd/91d379eb7ebc1a/US20050048135A1.pdf>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. En *Atlas de la Diabetes de la FID*. Recuperado de http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
- Jara, A. (2011). *Endocrinología* (2° edición). Recuperado de <https://www.medicapanamericana.com>
- Jimenez-Corona, A., & Mateo-Rivera, I. (2019). Medicinal Plants Used in the Therapeutics of Patients with Hypertension and Type II Diabetes, of the Tepehuana Indigenous Region. *Ciencias Huasteca Boletín Científico de la Escuela Superior de Huejutla*, 13, 30–36. Recuperado de <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/huejutla/article/view/3538/4975>
- Kherra, S., Blouin, J.-L., Santoni, F., & Schwitzgebel, V. (2017). Precision medicine for monogenic diabetes: from a survey to the development of a next-generation diagnostic panel. *Swiss Medical Weekly*, 147(4546). <https://doi.org/10.4414/smw.2017.14535>
- King, M. W. (2015). Reacciones de la Gluconeogénesis. Recuperado el 14 de abril de 2020, de La Pagina de Bioquímica Médica website: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/gluconeogenesis-sp.php>

- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). *Robbins. Patología Humana (9°)*. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/unam/reader.action?docID=1724229&query=homeostasis+de+la+glucosa>
- Llave, F. (2008). Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en Atención Primaria. *Medicina de Familia. Almería. Miembro del Grupo de Diabetes SAMFyC*, 8(2), 42–55. Recuperado de https://www.academia.edu/14886597/Actualización_en_el_manejo_de_los_antidiabéticos_orales_en_Atención Primaria
- López, M. (2011). Plantas medicinales. *Ámbito Farmaceutico Fitoterapia*, 27, 1–2.
- Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D. T., Albright, R. A., Shulman, G. I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510(7506), 542–546. <https://doi.org/10.1038/nature13270>
- Manzanares, W., & Aramendi, I. (2010). Hiperglucemia de estrés y su control con insulina en el paciente crítico: evidencia actual. *Medicina Intensiva*, 34(4), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2009.10.003>
- Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(5–6), 873–893. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.007>
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes*, 47(2), 224–229. <https://doi.org/10.2337/diab.47.2.224>
- Mata-Torres, G., Andrade-Cetto, A., Espinoza-Hernández, F. A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2020). Hepatic Glucose Output Inhibition by Mexican Plants Used in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00215>
- Mckee, T., & Mckee, J. (2009). Metabolismo de los carbohidratos. En S. A. de C. V. McGraw-Hill Interamericana editores (Ed.), *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida* (5a ed., pp. 264–305). Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1960§ionid=148095471>
- Moreno-Cortés, M. L., Gutiérrez-García, A. G., & Contreras, C. M. (2020). ¿Los protocolos experimentales son un símil real de la diabetes humana? *CienciaUAT*, 14(2), 51. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i2.1289>
- Morris, A. (2017). A new hope for insulin-sensitizing drugs. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 687–687. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.150>
- Norman, A. W., & Henry, H. L. (2015). Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon. En ELSEVIER (Ed.), *Hormones* (3a ed., pp. 109–139). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091906-5.00006-9>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Recuperado el 14 de abril de 2020, de Diabetes website: https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/
- Osorio, I., & Salceda, R. (2012). Control hormonal de la homeostásis energética: de la célula al cerebro. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb122b.pdf>
- Pérez-Mendoza, M., Ita-Pérez, D., & Días-Muños, M. (2012). Gluconeogénesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua*. *Reb*, 31(1), 10–20. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb121c.pdf>

- Pérez G, S., Pérez G, R. M., Pérez G, C., Zavala S, M. A., & Vargas S, R. (1997). Coyolosa, a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72(2), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(96\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(96)00019-2)
- Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), 143–156. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Picardi, A., Visalli, N., Lauria, A., Suraci, C., Buzzetti, R., Merola, M., ... Group, null I. (2006). Metabolic Factors Affecting Residual Beta Cell Function Assessed by C-Peptide Secretion in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. *Hormone and Metabolic Research*, 38(10), 668–672. <https://doi.org/10.1055/s-2006-954586>
- PLM®. (2020). Metformina. Recuperado el 15 de abril de 2020, de PLM Restaurando la Salud a través del Conocimiento website: https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/metformina_tabletas/10/101/64757/210
- Polonsky, K. S., & Burant, C. F. (2017). Tratado de Endocrinología. En *Williams. Tratado de endocrinología + ExpertConsult* (13th Editi, Vol. 384, pp. 1386–1450). <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-101-4/00031-5>
- Postic, C., Dentin, R., & Girard, J. (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. En *Diabetes Metab* (Vol. 30). Recuperado de www.e2med.com/dm
- Rajput, R., Garg, K., & Rajput, M. (2019). Prediabetes Risk Evaluation Scoring System [PRESS]: A simplified scoring system for detecting undiagnosed Prediabetes. *Primary Care Diabetes*, 13(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/J.PCD.2018.11.011>
- Ramos-Torres, A. Y. (2018). Evaluación del efecto de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. y *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. sobre la actividad in vivo e in vitro de las alfa-glucosidasas (UNAM). Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2018/febrero/0770329/Index.html>
- Riaño, I., & Suárez, J. I. (2006). Hipoglucemia. *Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias, Cantabria, Catilla y León*, 46(1), 69–75. Recuperado de https://www.sccalp.org/documents/0000/0179/BolPediatr2006_46_supl1_069-075.pdf
- Rodríguez-Rivera, N., Cuautle-Rodríguez, P., & Molina-Guarneros, J. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Rev Hosp Jua Mex*, 84(4), 203–211. Recuperado de www.medigraphic.com/hospitaljuarezwww.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.org.mx
- Rodríguez-Rodríguez, E., Perea, J. M., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria*, 24(4), 415–421. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112009000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Rodríguez, J. (2013). Lípidos y diabetes tipo 2. Desarrollo de nuevas terapias basadas en el metabolismo lipídico. *An Real Acad Farm*, 79(3), 412–433. Recuperado de <http://anales.ranf.com/2013/vol3/1446.htm>
- Ros-Pérez, M., & Medina-Gómez, G. (2011). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición*, 58(7), 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.05.008>

- Ruiz, T. (2000). Ser curandero en Uruapan (E. C. de Michoacán, Ed.). Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=mZjp0T7cfrUC&pg=PA157&lpg=PA157&dq=ser+curandero+en+uruapan+calea+integrifolia&source=bl&ots=ilKi5nIF9S&sig=ACfU3U1NSxrCocPpG0zgbu9XgPaMvtHOUw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwir3eLmjeHnAhWeJDQIHxAnD6cQ6AEwAHoECAoQAQ#v=onepage&q=>
- Salas-Zapata, L., Palacio-Mejía, L. S., Aracena-Genao, B., Hernández-Ávila, J. E., & Nieto-López, E. S. (2018). Costos directos de las hospitalizaciones por diabetes mellitus en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gaceta Sanitaria*, 32(3), 209–215. <https://doi.org/10.1016/J.GACETA.2016.06.015>
- Scarpello, J. H., & Howlett, H. C. (2008). Metformin therapy and clinical uses. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 5(3), 157–167. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.027>
- Serrano, M., Cascales, M., & Larrad, T. (2016). The obesity pandemic. The pathophysiological links: endocrine adipose cell dysfunction, inflammation and insulin resistance. *An Real Acad Farm*, 82(Special Issue), 182–194. Recuperado de <http://analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1756/1746>
- Serrano Ríos, M. (2002). Resistencia a la insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes tipo 2. *Medicina Clínica*, 119(12), 458–463. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)73455-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)73455-6)
- Silverthorn, D. U. (2014). Fisiología Humana. Un enfoque integrado (6°; E. M. Panamericana, Ed.). Recuperado de <https://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9786079356224?token=90378b51-6e21-4de4-a894-cd29d98cbc35#%7B%22Pagina%22:%22Portada%22,%22Vista%22:%22Indice%22,%22Busqueda%22:%22%22%7D>
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haefen, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)
- Sundaram, S. S., & Alonso, E. M. (2011). Abnormalities of Carbohydrate Metabolism and the Liver. En *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease* (4a ed., pp. 795-803.e4). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0774-8.10073-9>
- Surya, S., Salam, A. D., Tomy, D. V., Carla, B., Kumar, R. A., & Sunil, C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(5), 337–347. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60585-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60585-5)
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 481–490. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, 56(7), 2215–2244. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1379-1>
- Thomas, S. S., Zhang, L., & Mitch, W. E. (2015). Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic kidney disease. *Kidney International*, 88, 1233–1239. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.305>
- Van, E., & Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J*, 362, 532. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879177>
- Vibrans, H. (2009). *Alloispermum integrifolium* (DC.) H. Rob. Recuperado el 15 de abril de 2020, de Maleza de México website: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/alloispermum-integrifolium/fichas/ficha.htm>

- Vicente, I., Osejo, M., Rodríguez, L. A., Rodas, S., Ramos, M., & Ávila, D. (2019). Metformina: Uso clínico y actualización. *Rev med hondur*, 87(1), 7–10. Recuperado de <https://www.revistamedicahondurena.hn/assets/Uploads/Revision-bibliografica-Metformina-Uso-clinico-y-actualizacion.pdf>
- Wei, K., Hsu, A., & Huat, B. K. (2012). Chlorogenic Acid Stimulates Glucose Transport in Skeletal Muscle via AMPK Activation: A Contributor to the Beneficial Effects of Coffee on Diabetes. *PLoS ONE*, 7(3), e32718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032718>
- Wolfsdorf, J. I., Holm, I. A., & Weinstein, D. A. (1999). Glycogen storage diseases. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 28(4), 801–823. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70103-1](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70103-1)
- Yacini, O. (2019). Estudio del efecto hipoglucemiante agudo de *Calea integrifolia* (DC.) *Hemsl en ratas STZ-NA* (UNAM). Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2019/marzo/0787117/Index.html>
- Zaccardi, F., Webb, D. R., Yates, T., & Davies, M. J. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate medical journal*, 92(1084), 63–69. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133281>