



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL MECANISMO HIPOGLUCEMIANTE DE *Eryngium cymosum* F.Delaroche

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. FERNANDA ARTEMISA ESPINOZA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL MECANISMO HIPOGLUCEMIANTE DE *Eryngium cymosum* F.Delaroche

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. FERNANDA ARTEMISA ESPINOZA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/0349/2022
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de marzo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ESPINOZA HERNÁNDEZ FERNANDA ARTEMISA** con número de cuenta **306072679** con la tesis titulada: **“Estudio del mecanismo hipoglucemiante de *Eryngium cymosum* F. Delaroché”**, realizada bajo la dirección del **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: **DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ**
Vocal: **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**
Vocal: **DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR**
Vocal: **DRA. MYRIAN VELASCO TORRES**
Secretario: **DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindar el espacio y las herramientas necesarias para la consolidación de mi carrera profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (no. de beca: 481127) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por los apoyos económicos brindados para la realización de esta tesis (no. de proyectos: IN213222 e IN226719).

A mi tutor, el Dr. Adolfo Andrade Cetto, quien tuvo la paciencia y dedicación para guiarme en cada paso, siempre dispuesto a resolver mis dudas y brindarme consejos para mejorar como investigadora.

A la Dra. Rachel Mata Essayag y a la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor, miembros de mi comité tutor, por los consejos y comentarios que me brindaron a lo largo de todos estos años para mejorar este proyecto.

Agradecimientos a título personal

A los miembros que constituyeron mi jurado, por sus ideas y aportaciones académicas para mejorar el escrito y los experimentos de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Etnofarmacología, especialmente a la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera, la Biól. Samantha Martínez Medina, la M. en C. Jazmín Selene Samario Román, el M. en C. Christian Alan Cabello Hernández y la M. en C. Angelina Daniela Moreno Vargas, por brindarme ideas, asesorarme y apoyarme en los experimentos del presente trabajo.

A mi familia, mis padres Ana y Manuel y mi hermano Ulises, los pilares que me alentaron y apoyaron en todo momento para convertirme en la persona que soy actualmente.

A mi compañero de vida y mano derecha, Gerardo, a quien le debo todo. Sin él no hubiera podido llegar hasta donde estoy. Gracias por el apoyo, las experiencias y las ideas que me permitieron continuar a lo largo de toda esta travesía.

Dedicatoria

A mis padres, Ana y Manuel.

Excelentes ejemplos de vida. Espero poder llegar a ser como ellos algún día.

A Gerardo.

Mi compañero de vida, con quien espero poder seguir compartiendo mi vida y mis experiencias académicas. Juntos seguiremos creciendo como personas e investigadores.

*“Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea; la palabra **imposible** no tiene significado.”*

Tabla de contenidos

Índice de figuras	I
Índice de tablas	III
Índice de abreviaturas	IV
Resumen	1
Abstract	3
1 Introducción	5
2 Antecedentes	6
2.1 Regulación metabólica de la glucosa	6
2.2 Diabetes mellitus	8
2.2.1 Definición y diagnóstico	8
2.2.2 Epidemiología en el mundo	9
2.2.3 Epidemiología en México	9
2.2.4 Clasificación	11
2.3 Historia natural de la diabetes mellitus tipo 2	12
2.3.1 Prediabetes	12
2.3.2 Resistencia a la insulina	13
2.3.3 Disfunción de la célula β	14
2.3.4 Complicaciones diabéticas	15
2.4 Mecanismos fisiopatológicos de la diabetes mellitus tipo 2: blancos terapéuticos y fármacos actuales	18
2.4.1 Activación de la vía de señalización PI3K/Akt por insulina	19
2.4.2 Mecanismos de la resistencia a la insulina ligada a la obesidad y a la diabetes tipo 2	19
2.4.3 Blancos terapéuticos de fármacos actuales para el tratamiento de la diabetes tipo 2	21
1.4.3.1 Secreción de insulina y disfunción de incretinas	21
1.4.3.2 Resistencia a la insulina: activación de PPAR γ	24
1.4.3.3 Producción hepática de glucosa: activación de AMPK e inhibición de enzimas gluconeogénicas	26
1.4.3.4 Captación periférica de glucosa: activación de AMPK y translocación de GLUT4	28
1.4.3.5 Degradación de carbohidratos: inhibición de α -glucosidasas	29
1.4.3.6 Reabsorción renal de glucosa: inhibición de SGLT-2	30
2.5 Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de diabetes tipo 2	33
2.5.1 Papel de los productos naturales en el desarrollo de fármacos hipoglucemiantes	33
2.5.2 Uso del enfoque etnofarmacológico para la identificación de plantas hipoglucemiantes	37
2.6 Antecedentes de la especie de estudio	40
2.6.1 Elección y descripción de <i>Eryngium cymosum</i> F.Delaroche	40
2.6.2 Antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos del género <i>Eryngium</i>	43
2.6.2.1 Usos medicinales	43
2.6.2.2 Composición fitoquímica	44
2.6.2.3 Antecedentes farmacológicos relacionados a diabetes	46
3 Planteamiento del problema	50
4 Objetivos	52
5 Hipótesis	53

6	Métodos	54
6.1	Diseño experimental general	54
6.2	Obtención del material biológico	55
6.3	Elaboración de extracto acuoso	56
6.4	Consideraciones bioéticas, animales experimentales y obtención de muestras	56
6.5	Cálculo de dosis para experimentos <i>in vivo</i>	56
6.6	Modelo animal de hiperglucemia inducida STZ-NA para pruebas biológicas	57
6.7	Diseños experimentales <i>in vivo</i>	58
6.7.1	Evaluación de efecto hipoglucemiante agudo	58
6.7.2	Evaluación de la inhibición de gluconeogénesis hepática	59
6.7.3	Evaluación de la inhibición de hiperglucemia posprandial por la hidrólisis de carbohidratos	60
6.7.4	Evaluación de la secreción basal y estimulada de insulina en ayuno y estado posprandial	62
6.7.5	Estimación de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial	65
6.8	Modelos <i>in vitro</i>	66
6.8.1	Evaluación de la inhibición de enzimas reguladoras de la gluconeogénesis	66
4.7.1.1	<i>Obtención de fracciones celulares para ensayos de enzimas gluconeogénicas</i>	66
4.7.1.2	<i>Ensayos enzimáticos de inhibición del complejo glucosa-6-fosfatasa</i>	66
4.7.1.3	<i>Ensayos enzimáticos de inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa</i>	66
6.8.2	Evaluación de la inhibición de enzimas α -glucosidasas	67
6.9	Análisis estadístico	68
7	Resultados	69
7.1	Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de <i>E. cymosum</i>	69
7.2	Inhibición de la gluconeogénesis	70
7.3	Disminución de la hiperglucemia posprandial por inhibición de α -glucosidasas	72
7.4	Reducción de la secreción basal y estimulada de insulina e incremento de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial	74
8	Discusión	79
8.1	Inhibición de la producción hepática de glucosa por <i>E. cymosum</i>	81
8.2	Inhibición de la hidrólisis de carbohidratos por <i>E. cymosum</i>	84
8.1	Disminución de la secreción basal y estimulada de insulina e incremento de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial por <i>E. cymosum</i>	85
9	Conclusiones	88
10	Perspectivas	90
11	Referencias	91
12	Anexos	107
12.1	Carta de aprobación del comité de Bioética de la CEARC	107
12.2	Información nutrimental de Nutricubos Purina®	108
12.3	Tablas de resultados	109
12.4	Artículo requisito para la obtención de grado	112

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de regulación de la homeostasis de la glucosa en ayuno y en estado posprandial.	6
Figura 2. Número de personas con diabetes en el mundo, por regiones de la IDF y en México (20 a 79 años).	10
Figura 3. Curso natural de la diabetes mellitus tipo 2.....	13
Figura 4. Presentación inicial de enfermedad cardiovascular de pacientes con DM2 en comparación con pacientes sin diabetes.	17
Figura 5. Mecanismos de inducción de RI en la obesidad.....	20
Figura 6. Secreción de insulina estimulada por sulfonilureas/meglitinidas y análogos de GLP-1.....	23
Figura 7. Efectos promovidos por PPAR γ tras su activación por tiazolidinedionas en tejido adiposo.	25
Figura 8. Inhibición de la producción hepática de glucosa por metformina y tiazolidinedionas.	27
Figura 9. Captación de glucosa promovida por metformina y tiazolidinedionas en músculo esquelético.	28
Figura 10. Reducción de la hiperglucemia posprandial por inhibidores de α -glucosidasas intestinales.	30
Figura 11. Disminución de la reabsorción renal de glucosa por inhibidores de SGLT-2.....	31
Figura 12. Puesto de plantas medicinales en el mercado de Huejutla.	40
Figura 13. Imágenes de <i>E. cymosum</i>	41
Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto acuoso de la parte aérea de <i>E. cymosum</i>	42
Figura 15. Diversidad de compuestos presentes en especies del género <i>Eryngium</i>	45
Figura 16. Colecta de la parte aérea de <i>E. cymosum</i>	55
Figura 17. Inducción química de hiperglucemia con estreptozotocina y nicotinamida en ratas Wistar.....	57
Figura 18. Diseño experimental para las curvas de glucosa con una duración de 3 h.....	59
Figura 19. Diseño experimental para las pruebas de tolerancia a piruvato.	60
Figura 20. Diseño experimental para las pruebas de tolerancia a maltosa.	61
Figura 21. Diseño experimental para determinar el efecto del extracto de <i>E. cymosum</i> sobre la concentración de insulina plasmática en ayuno.	63
Figura 22. Diseño experimental para determinar el efecto del extracto de <i>E. cymosum</i> sobre la concentración de insulina plasmática en estado posprandial.	64
Figura 23. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de glucosa de 3 h.	69
Figura 24. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a piruvato.	70
Figura 25. Curvas de inhibición concentración-respuesta de enzimas gluconeogénicas.....	71
Figura 26. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a la maltosa.	72
Figura 27. Curvas de inhibición concentración-respuesta de enzimas α -glucosidasas.	73

Figura 28. Concentración de glucosa sanguínea e insulina plasmática en condición de ayuno.	75
Figura 29. Concentración de glucosa sanguínea e insulina plasmática en condición posprandial.	76
Figura 30. Mejoramiento de la sensibilidad a la insulina en la condición de ayuno (QUICKI) y estado posprandial (ISI).	78
Figura 31. Propuesta inicial para la caracterización de los blancos terapéuticos de plantas hipoglucemiantes utilizadas de manera tradicional como "agua de uso".	80
Figura 32. Blancos farmacológicos identificados en la disminución de la producción hepática de glucosa por el extracto acuoso de <i>E. cymosum</i>	83
Figura 33. Mecanismos que participan en la regulación de la glucemia en ayuno y en estado posprandial por el extracto acuoso de <i>E. cymosum</i>	88

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes.....	8
Tabla 2. Resumen de fármacos hipoglucemiantes utilizados en la terapia actual para el tratamiento de DM2.	32
Tabla 3. Ejemplos de productos naturales de origen vegetal con mecanismos hipoglucemiantes.	35
Tabla 4. Antecedentes farmacológicos relacionados a diabetes de distintas especies del género <i>Eryngium</i>	46
Tabla 5. Grupos experimentales y tratamientos para las curvas de glucosa con una duración de 3 h...	58
Tabla 6. Grupos experimentales y tratamientos para las pruebas de tolerancia a piruvato.	59
Tabla 7. Grupos experimentales y tratamientos para las pruebas de tolerancia a maltosa.	61
Tabla 8. Grupos experimentales y tratamientos para determinar el efecto del extracto de <i>E. cymosum</i> sobre la concentración de insulina plasmática en ayuno.....	62
Tabla 9. Grupos experimentales y tratamientos para determinar el efecto del extracto de <i>E. cymosum</i> sobre la concentración de insulina plasmática en estado posprandial.	64
Tabla 11. Niveles de glucosa sanguínea en las curvas de glucosa de 3 h.	109
Tabla 12. Niveles de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a piruvato.	109
Tabla 13. Niveles de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a maltosa.	110
Tabla 14. Niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática en ayuno.	110
Tabla 15. Niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática en estado posprandial.	111

Índice de abreviaturas

Abcg5	miembro 5 de la subfamilia G del casete de unión a ATP
Abcg8	miembro 8 de la subfamilia G del casete de unión a ATP
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGEs	productos finales de glicación avanzada
AGLs	ácidos grasos libres
Akt	proteína cinasa B
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	proteína cinasa activada por AMP
ANOVA	análisis de varianza
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área bajo la curva
C	control negativo
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CEARC	Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica
COVID-19	enfermedad por coronavirus 2019
CPT	carnitina palmitoiltransferasa
DAG	diacilglicerol
DM	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	dipeptidil peptidasa 4
E ⁴⁷⁰	grupo experimental (extracto; 470 mg/kg)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EROs	especies reactivas de oxígeno
FBP	fructosa-1,6-bisfosfato
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
G	control positivo (glibenclamida; 5 mg/kg)
G6P	glucosa-6-fosfato
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GIP	polipéptido insulínico dependiente de glucosa
Glc	glucosa

GLP-1	péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT	glucotransportador
H	control hiperglucémico
HA	control hiperglucémico positivo (acarbose; 3 mg/kg)
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HE ⁴⁷	grupo hiperglucémico experimental (extracto; 47 mg/kg)
HE ⁴⁷⁰	grupo hiperglucémico experimental (extracto; 470 mg/kg)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico
HG	control hiperglucémico positivo (glibenclamida; 5 mg/kg)
HM	control hiperglucémico positivo (metformina; 500 mg/kg)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HOMA- β	modelo homeostático para evaluar la función de las células β pancreáticas
HOMA-IR	modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
IC ₅₀	concentración inhibitoria 50
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IKK	cinasa de los inhibidores del factor nuclear κ B
IL-6	interleucina 6
IL6R	receptor de IL-6
IRS	sustratos del receptor de insulina
ISI	índice de sensibilidad a la insulina o índice Matsuda
JNK	cinasa c-Jun N-terminal
K _{ATP}	canal de K ⁺ sensibles a ATP
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos
mTORC2	complejo diana de rapamicina en mamíferos 2
N	control no hiperglucémico
NA	nicotinamida
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
p38 MAPK	cinasa p38 activadas por mitógenos
PDK1	cinasa dependiente de fosfoinositidos 1
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PGC-1 α	coactivador 1 α de PPAR γ

PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
pNGP	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
PPAR α	receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa
PPAR γ	receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
PTGO	prueba de tolerancia a la glucosa oral
PTP1B	proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPs	proteínas tirosina fosfatasas
QUICKI	índice de control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina.
R	control positivo (repaglinida; 1 mg/kg)
RI	resistencia a la insulina
SDS	dodecilsulfato sódico
SGLT-1	cotransportador sodio-glucosa 1
SGLT-2	cotransportador sodio-glucosa 2
SREBP-1c	proteína 1c de unión a elementos reguladores de esteroides
STZ	estreptozotocina
SUR1	receptor de sulfonilureas 1
Tg	triglicéridos
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	receptor de TNF- α
TZDs	tiazolidinedionas
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

El uso tradicional de plantas medicinales para tratar la diabetes es una práctica común alrededor del mundo debido a razones históricas y culturales. El acelerado aumento de casos de diabetes mellitus tipo 2 en los últimos años ha permitido la adopción de nuevas especies con potencial efecto hipoglucemiante, cuyos mecanismos de acción deben ser esclarecidos para generar nuevos fármacos o fitomedicamentos que mejoren el tratamiento farmacológico y promuevan un mejor control glucémico.

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad compleja caracterizada por niveles altos de glucosa en sangre debido a la presencia de resistencia a la insulina y a una falla en la secreción de esta hormona. En países en vías de desarrollo, como México, los pacientes diabéticos suelen consumir decocciones e infusiones de plantas medicinales a lo largo del día como “agua de uso” con la finalidad de contrarrestar la hiperglucemia, es decir, estas plantas se consumen tanto en ayuno como en estado posprandial. Por lo tanto, los mecanismos que participan en su efecto hipoglucemiante podrían estar relacionados con dicha forma de consumo.

El presente trabajo propone un enfoque novedoso para caracterizar los mecanismos involucrados en el efecto terapéutico de las plantas hipoglucemiantes consumidas como “agua de uso”, considerando los procesos que participan en la generación de hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial. Se tomó como ejemplo a *Eryngium cymosum* F.Delaroche, cuyo uso de la parte aérea fue detectado por nuestro grupo de trabajo desde 1994 por pacientes diabéticos de los municipios de Tlanchinol y Huejutla de Reyes en el estado de Hidalgo.

En primera instancia, se determinó el impacto del extracto tradicional sobre los niveles de glucosa plasmática en un modelo hiperglucémico. Posteriormente, se evaluó sobre dos de los principales mecanismos responsables de la hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial: la **gluconeogénesis**, mediante pruebas de tolerancia al piruvato y ensayos de inhibición enzimática de dos enzimas reguladoras (glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa), y la **hidrólisis intestinal de carbohidratos**, mediante pruebas de tolerancia a la maltosa y ensayos de inhibición de enzimas α -glucosidasas. Finalmente, se cuantificó la insulina en las dos condiciones metabólicas para establecer una relación entre el efecto hipoglucemiante y la liberación/función de esta hormona en ratas sanas.

Los resultados mostraron que el extracto de *E. cymosum* ejerció un efecto hipoglucémico significativo en ratas hiperglucémicas relacionado con la inhibición de la gluconeogénesis, ya que el extracto tuvo un efecto antihiperglucémico significativo en las pruebas de tolerancia al piruvato (reducción del AUC del 38%). Además, inhibió eficazmente la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y la

fructosa-1,6-bisfosfatasa (91% y 96%, respectivamente). Por otro lado, fue capaz de disminuir significativamente la hiperglucemia posprandial en las pruebas de tolerancia a la maltosa (reducción del AUC del 46%) independientemente de una modesta inhibición de la actividad de las enzimas α -glucosidasas (32%). Finalmente, el extracto disminuyó los niveles de insulina en ambos estados metabólicos, reduciendo la secreción basal de insulina e inhibiendo la secreción estimulada de insulina, a pesar de reducir los niveles de glucosa en sangre en ayuno y de disminuir el pico posprandial, lo que indica que podría estar mejorando la sensibilidad a la insulina.

En conclusión, la forma tradicional en que se consume *E. cymosum* reguló los niveles de glucosa en sangre, tanto en ayuno como en estado posprandial, al inhibir la gluconeogénesis, la hidrólisis intestinal de carbohidratos e incrementar la función de la insulina. Sin embargo, es necesario seguir trabajando para evaluar los mecanismos implicados en el aumento de la sensibilidad a la insulina, así como el mantenimiento del efecto hipoglucemiante a largo plazo.

Abstract

The traditional use of medicinal plants to treat diabetes is a common practice around the globe due to historical and cultural reasons. The accelerated increase in type 2 diabetes cases in recent years has allowed the adoption of new species with potential hypoglycemic effect, whose mechanisms of action must be clarified to generate new drugs or phytomedicines for improving pharmacological treatment and promoting better glycemic control.

Type 2 diabetes is a complex disease characterized by high blood glucose levels due to insulin resistance and failure of insulin secretion. In developing countries such as Mexico, diabetic patients drink decoctions and infusions of medicinal plants throughout the day as “agua de uso” to counteract hyperglycemia, namely these plants are consumed both in fasting and postprandial state. Therefore, the mechanisms that participate in their hypoglycemic effect could be related to how they are consumed.

The current work proposes a novel approach to characterize the mechanisms involved in the therapeutic effect of hypoglycemic plants consumed as “agua de uso” considering the processes participating in the generation of hyperglycemia in fasting and postprandial state. *Eryngium cymosum* F.Delaroche was used as an example, whose aerial part usage was detected by our work group since 1994 by diabetic patients of Tlanchinol and Huejutla de Reyes municipalities in the Hidalgo state.

First, the hypoglycemic effect of its traditional extract was assessed and then it was evaluated on two of the main mechanisms responsible for fasting and postprandial hyperglycemia: **gluconeogenesis** by pyruvate tolerance tests and enzyme inhibition assays for two regulatory enzymes (glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase), and **intestinal carbohydrate breakdown** by maltose tolerance tests and α -glucosidase inhibition assays. Afterward, insulin was measured in the two conditions to establish a link between the hypoglycemic effect and the release or functionality of this hormone in healthy rats.

The results showed that the *E. cymosum* extract exerted a significant hypoglycemic effect in hyperglycemic rats related to the inhibition of gluconeogenesis since the extract held a significant anti-hyperglycemic effect in pyruvate tolerance tests (AUC reduction of 38%). Moreover, it powerfully inhibited the activity of glucose-6-phosphatase and fructose 1,6-bisphosphatase (91% and 96%, respectively). On the other hand, it was able to significantly decrease the postprandial hyperglycemia in maltose tolerance tests (AUC reduction of 46%) regardless of a modest inhibition of α -glucosidase activity (32%). Finally, the extract lowered insulin levels in both metabolic states, reducing basal insulin

secretion and inhibiting stimulated insulin secretion, despite lowering fasting blood glucose levels and the postprandial peak, which could be indicating an improvement in insulin sensitivity.

In conclusion, the traditional consumed form of *E. cymosum* regulated both fasting and postprandial blood glucose levels by inhibiting gluconeogenesis and intestinal carbohydrate breakdown and increasing insulin function. However, further work is needed to evaluate the mechanisms involved in the improvement in insulin sensitivity, as well as the maintenance of the long-term hypoglycemic effect.

1 Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica de etiología múltiple que ha ido en aumento en los últimos años (Federación Internacional de Diabetes [IDF, por sus siglas en inglés], 2021). El tipo de mayor relevancia, por representar el 90% de los casos, es la diabetes mellitus tipo 2, la cual es propiciada por el incremento en el sedentarismo y en el consumo de comida energéticamente densa, combinados con el componente genético de ciertas poblaciones (Ahmed et al., 2021; Roden & Shulman, 2019). Hoy en día, cuatro de cada cinco personas que viven en países con ingresos medios y bajos padecen diabetes, es decir, el mayor número de personas diabéticas viven en países en vías de desarrollo. Este hecho representa un problema de salud mundial, debido a los altos costos generados para el tratamiento de las complicaciones que aparecen a largo plazo y que repercuten en la calidad de vida de los pacientes diabéticos (IDF, 2021).

Las personas que padecen esta enfermedad y que viven en países en vías de desarrollo carecen de servicios de salud institucionales, por lo que la mayoría recurre a la utilización de la medicina tradicional y complementaria. Actualmente, se estima que alrededor de un 88% de la población mundial emplea este tipo de medicina como parte de su atención primaria, debido a su bajo costo y a su trasfondo cultural (Organización Mundial de la Salud [WHO, por sus siglas en inglés], 2019b).

La práctica empírica de selección y adopción de plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes por los pacientes en las comunidades brinda la oportunidad de identificar especies con potencial efecto terapéutico para la generación de nuevos fármacos que promuevan un mejor control de la hiperglucemia a largo plazo. En este sentido, el objetivo de la etnofarmacología es documentar estas especies con la finalidad de identificar nuevos compuestos o elaborar fitomedicamentos para el manejo de enfermedades como la diabetes, basándose en un enfoque multidisciplinario que involucra la utilización de herramientas antropológicas, toxicológicas y farmacológicas (Heinrich, 2015).

Se calcula que al menos 800 plantas son empleadas para el tratamiento de diabetes en México (S. M. Escandón-Rivera et al., 2020); sin embargo, aún faltan estudios que apoyen sus efectos farmacológicos relacionados al control de esta enfermedad. Hasta la fecha, no existe una metodología específica para la caracterización de los mecanismos de acción que participan en el efecto hipoglucemiante de una planta medicinal. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo es proponer un enfoque nuevo para la determinación de la participación de los procesos involucrados en la regulación metabólica de la glucosa de una planta utilizada para el tratamiento de la diabetes identificada mediante un enfoque etnofarmacológico, tomando en cuenta su forma de consumo en las comunidades.

2 Antecedentes

2.1 Regulación metabólica de la glucosa

A pesar de que la mayoría de los tejidos de vertebrados superiores tienen la capacidad de utilizar fuentes alternativas de energía (ácidos grasos y aminoácidos), el sistema nervioso y células que carecen de mitocondria, como los glóbulos rojos, utilizan mayoritariamente la glucosa como sustrato para la producción de energía, por lo que es necesario mantener siempre disponible este monosacárido en sangre dentro de un rango específico (80 – 100 mg/dl) (Mcclenaghan & Flatt, 2015; Weber, 2001).

El mantenimiento de la glucemia dentro de los niveles requeridos está orquestado por varios mecanismos que entran en acción bajo distintas circunstancias que naturalmente modifican los niveles de glucosa en sangre, como la entrada de alimento al organismo, el ayuno prolongado, el ejercicio, y las respuestas de supervivencia, promoviendo cambios de un estado catabólico a uno anabólico, o viceversa (Nirmalan & Nirmalan, 2017). La homeostasis de la glucosa está controlada por una red compleja de factores que intervienen en momentos determinados; sin embargo, son las acciones opuestas de dos hormonas pancreáticas que principalmente están involucradas en la regulación de los niveles sanguíneos de este monosacárido: la insulina y el glucagón (**Figura 1**) (Song & Jo, 2019).

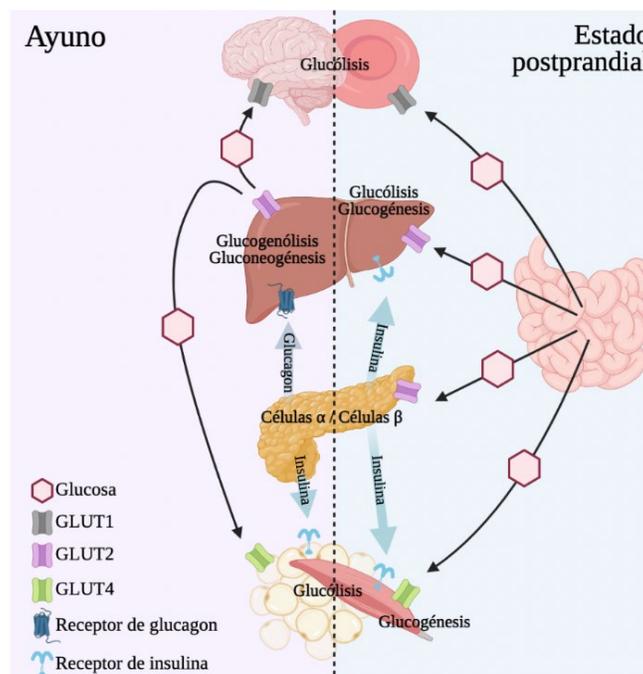


Figura 1. Mecanismos de regulación de la homeostasis de la glucosa en ayuno y en estado postprandial.

Elaboración propia con base en información de Cersosimo et al. (2018); Mcclenaghan & Flatt (2015). Creado en Biorender.com

Justo después de la ingesta de alimento, la principal fuente de glucosa proviene de la absorción intestinal, por lo que es necesario que, para evitar un aumento desmesurado de la glucemia (>140 mg/dl) (Asociación Americana de Diabetes [ADA, por sus siglas en inglés], 2001), se inhiba la producción endógena de este nutriente. La glucosa absorbida por el intestino, que pasa a torrente sanguíneo, es captada por las células β pancreáticas, las cuales liberan consecuentemente a la hormona insulina, quien es la encargada de promover un estado anabólico al provocar la supresión de la producción hepática de glucosa, promover la glucogénesis (síntesis de glucógeno) en el hígado y en el músculo esquelético, y la captación y oxidación de la glucosa por los tejidos dependientes a la insulina: músculo y tejido adiposo (Szablewski, 2011).

Durante las primeras 12 horas de ayuno, después del consumo de alimentos, la glucemia es mantenida por la producción y liberación de glucosa llevada a cabo principalmente por el hígado (aproximadamente 80 – 85%) mediante dos vías principales: la glucogenólisis, o ruptura de los depósitos hepáticos de glucógeno, y la gluconeogénesis, o producción de glucosa *de novo* (Sharabi et al., 2015). Ambas vías de producción se encuentran activas en este periodo y cada una aporta la mitad del total de la glucosa producida (Cersosimo et al., 2018). En este estado metabólico, el control positivo de las vías que participan en la producción hepática de glucosa es ejercido principalmente por el glucagon (aunque existen otras señales hormonales y nutricionales que participan en esta regulación). Ante la disminución de la glucosa en el torrente sanguíneo, debido a la falta de alimento, las células α de los islotes pancreáticos liberan esta hormona al torrente sanguíneo, la cual promueve la producción endógena de glucosa al modificar transcripcional, traduccional o postraduccionalmente a las enzimas que son pasos limitantes y que están involucradas en la regulación de las vías de producción (Wu et al., 2005).

Si los mecanismos de regulación fallan, entonces pueden ocasionar problemas en el control de la glucosa sanguínea, provocando consecuencias graves hasta la muerte (Nirmalan & Nirmalan, 2017). Las bajas concentraciones de este monosacárido (<50 mg/dl) pueden causar convulsiones y pérdida del conocimiento, debido a la súbita privación de energía al cerebro; mientras que, la continua exposición a altas concentraciones de glucosa (>180 mg/dl) puede ocasionar ceguera, insuficiencia renal, enfermedad vascular y neuropatía debido al daño de las terminaciones nerviosas (Forbes & Cooper, 2013; Szablewski, 2011). La hiperglucemia crónica es consecuencia de una secreción o función de la insulina deficientes y es el signo característico de la diabetes mellitus (DM) (Organización Mundial de la Salud [WHO, por sus siglas en inglés], 2020). En el siguiente capítulo se abordarán los conceptos generales de DM para, posteriormente, ahondar en la fisiopatología específica de la DM tipo 2, la cual representa el tipo más importante de diabetes por abarcar casi el 90% de los casos totales de esta enfermedad.

2.2 Diabetes mellitus

2.2.1 Definición y diagnóstico

La DM es un conjunto de trastornos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas que se caracterizan por la presencia de hiperglucemia crónica, cuya etiopatogenia heterogénea incluye defectos en la secreción de la insulina, en su acción, o en ambas (WHO, 2019a). Los pacientes que padecen esta enfermedad metabólica son más propensos a desarrollar otros trastornos como enfermedades cardíacas, arteriales periféricas y cerebrovasculares, disfunción eréctil, cataratas, hígado graso no alcohólico, e incluso enfermedades infecciosas como tuberculosis (WHO, 2020). Por otro lado, también se ha correlacionado recientemente el desarrollo de cuadros de COVID-19 grave en personas con obesidad, síndrome metabólico y DM (Santos et al., 2021).

Ya sea por procesos epigenéticos, resistencia a la insulina (RI), autoinmunidad, enfermedades concurrentes, inflamación o factores ambientales, la disfunción o destrucción de las células β pancreáticas deriva en hiperglucemia debido a la poca o nula secreción de insulina. Las instituciones de salud han definido el umbral de los niveles de glucosa en torrente sanguíneo para diagnosticar la DM, mediante la aplicación de distintas pruebas que determinan la cantidad de este monosacárido presente bajo diferentes condiciones (**Tabla 1**). Adicionalmente, para el diagnóstico se toma en cuenta la presencia de los síntomas característicos de la enfermedad: poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso y visión borrosa (Federación Internacional de Diabetes [IDF, por sus siglas en inglés], 2021).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes.

Prueba	Criterio
Glucosa plasmática en ayunas (al menos 8 h de ayuno)	≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l)
Glucosa plasmática a las dos horas en una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) (al menos 8 h de ayuno; 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua)	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l)
Hemoglobina glicada (HbA1c)	$\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol)
Glucosa plasmática al azar (con los síntomas clásicos o una crisis hiperglucémica)	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l)

Para el diagnóstico de diabetes es necesario que se cumpla uno o más de los criterios.

Fuente: Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2022a); Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2021); Organización Mundial de la Salud (WHO, 2019a).

2.2.2 Epidemiología en el mundo

De acuerdo con cifras presentadas por la IDF, esta enfermedad se ha convertido en una de las emergencias de salud mundial más importantes del siglo 21 debido a su rápido crecimiento. En el año 2021, 537 millones de personas dentro del rango de edad de 20 a 79 años (10.5% de todos los adultos en ese grupo de edad) padecían esta enfermedad y según las proyecciones de esta institución de salud, el número se incrementará en un 46% para el año 2030 (**Figura 2**). Por otro lado, aunque la mayoría de los enfermos con diabetes viven en países de ingresos bajos y medios, los países de ingresos altos presentan la prevalencia más alta (5.5%, 10.8% y 11.1%, respectivamente) (IDF, 2021).

En cuanto a mortalidad, la IDF reporta 6.7 millones de muertes de personas entre 20 a 79 años debido a la diabetes y sus complicaciones en el 2021, siendo casi la tercera parte (32.6%) pertenecientes al grupo de edad laboral, es decir, con una edad menor a los 60 años. Debido a la discapacidad o muerte prematura provocada por este padecimiento, la economía se ve impactada negativamente, ocasionando grandes pérdidas monetarias. El aumento en el gasto sanitario mundial debido a la diabetes ha sido considerable, pasando de 232 mil millones de dólares en 2007 a 966 mil millones de dólares en 2021 para los adultos de 20 a 79 años, representando un incremento del 316% en 15 años. En este contexto, la región de América del Norte y el Caribe tuvo el gasto sanitario relacionado con diabetes más alto de todas las regiones de la IDF con 415 mil millones de dólares, que correspondió al 42.9% del gasto sanitario total relacionado con esta enfermedad en 2021.

2.2.3 Epidemiología en México

Desde el año 2000, la DM ocupa el tercer lugar de causas de muerte en general en México debido al aumento en la esperanza de vida, el cambio en el estilo de vida, la alimentación y la actividad física (Shamah-Levy et al., 2020). En los últimos años, esta enfermedad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud de nuestro país debido a su rápido crecimiento, ya que en sólo nueve años se duplicó la cantidad de diabéticos (de 6.4 millones de personas en 2012 a 14.1 millones en 2021), y se espera que para el año 2045 haya un incremento del 50% (IDF, 2021) (**Figura 2**).

México ocupa el séptimo lugar de países en el mundo con mayor número de personas con diabetes, y el octavo con mayor gasto sanitario relacionado a dicha enfermedad, con 19.9 mil millones de dólares en 2021 (IDF, 2021); además, ocupó el primer lugar en ingresos hospitalarios por diabetes de los países que forman parte de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) en el 2019 (OECD, 2019).

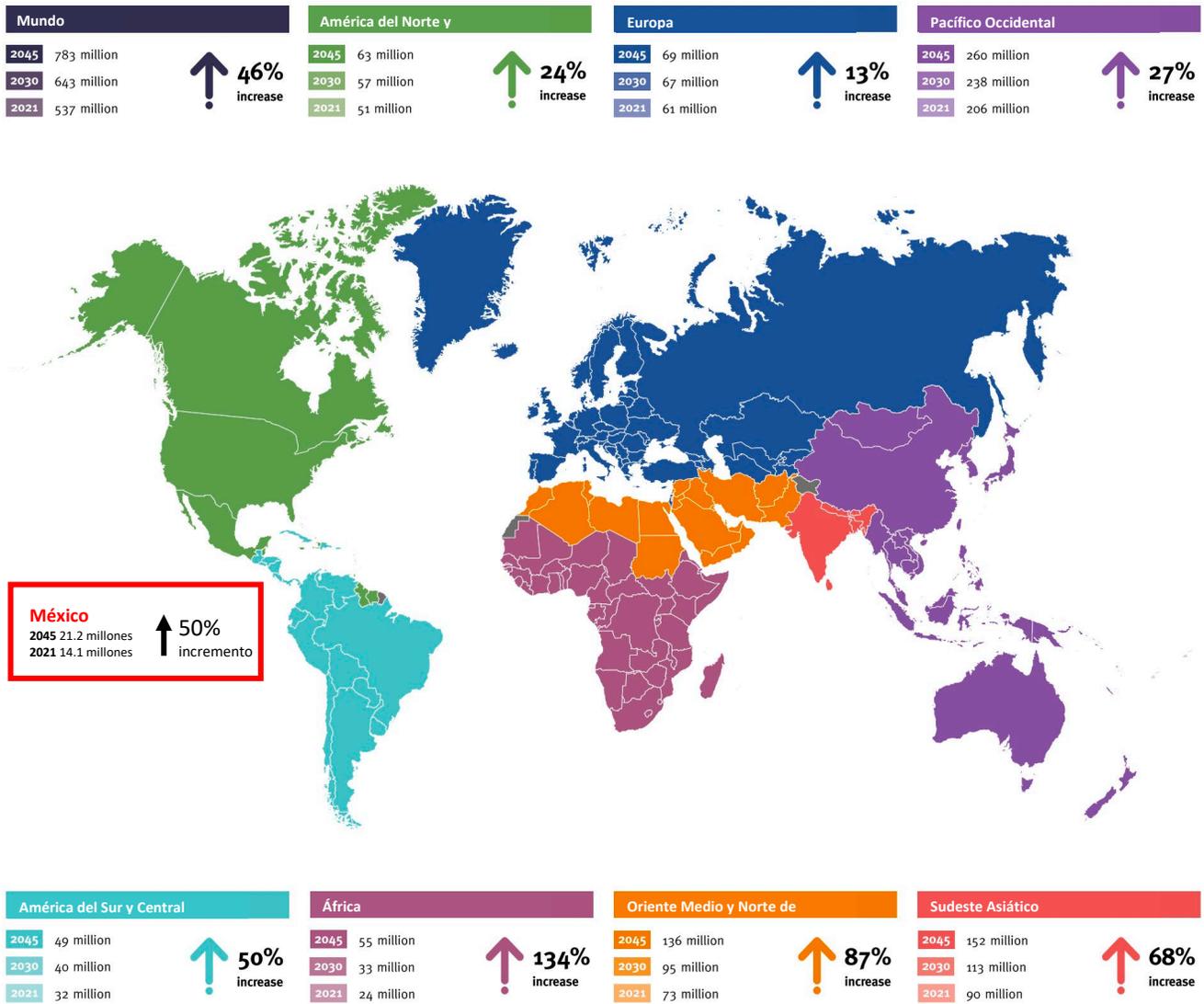


Figura 2. Número de personas con diabetes en el mundo, por regiones de la IDF y en México (20 a 79 años). Tomado y adaptado de IDF (2021).

2.2.4 Clasificación

De acuerdo con su etiopatogenia, la ADA (2022a) clasifica a la DM en cuatro categorías principales:

- Diabetes tipo 1. Esta forma de diabetes es originada por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, la cual varía de individuo a individuo, siendo rápida principalmente en niños y lenta en adultos. Este tipo abarca del 5 al 10% de los casos totales de diabetes en el mundo.
- Diabetes tipo 2. Se define por la presencia de una condición patológica conocida como “resistencia a la insulina” (RI), la cual impide que esta hormona funcione correctamente en sus órganos blanco, y por una deficiencia en la secreción de insulina. Los principales factores de riesgo para presentar este tipo de diabetes, la cual representa del 90 al 95% de los casos totales, son: sobrepeso u obesidad, inactividad física, edad, tener familiares de primer grado con diabetes, historial de diabetes gestacional, enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo y la etnia.
- Diabetes gestacional. Este tipo de diabetes es diagnosticado durante el embarazo, y se caracteriza por hiperglucemia e intolerancia a la glucosa que se presentan generalmente durante el segundo trimestre del embarazo. Esta forma de diabetes puede ser un factor de riesgo para desarrollar diabetes tipo 2 a largo plazo.
- Otros tipos específicos de diabetes. En esta categoría se encuentran aquellas formas de diabetes que se deben a otras causas como síndromes de diabetes monogénica, enfermedades del páncreas exócrino y diabetes inducida por químicos o fármacos.

2.3 Historia natural de la diabetes mellitus tipo 2

El creciente aumento de DM en el mundo se debe principalmente al incremento en los casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Este tipo se caracteriza por un mal funcionamiento de la insulina en sus órganos blanco, dado por la RI, y por una disfunción de las células β pancreáticas, trayendo como consecuencia alteraciones en el metabolismo energético que, en pacientes no controlados, desencadenan hiperglucemia crónica. A pesar de la identificación de más de 400 variantes genéticas asociadas a la DM2 (la mayoría relacionadas a la función de los islotes pancreáticos), la función de los genes individuales sólo explica el 20% del riesgo de presentar la enfermedad, por lo que su desarrollo ha sido atribuido a factores ambientales (Roden & Shulman, 2019).

El incremento de casos de DM2 ha sido directamente asociado al aumento en la prevalencia de obesidad, la cual se ha acrecentado debido a la occidentalización del estilo de vida que conlleva a un aumento en el sedentarismo y en el consumo de comida rápida energéticamente densa y bebidas con alto contenido de azúcares. Estos factores, particularmente el alto consumo de azúcares, grasas y carne animal, juegan un papel importante en la generación de los mecanismos que promueven la RI ligada a la obesidad y a la DM2 (Ahmed et al., 2021; Hu & Malik, 2010; Mazidi et al., 2021).

2.3.1 Prediabetes

Se ha descrito que las personas que desarrollan DM2 progresan paulatinamente hacia la enfermedad con un declive en la sensibilidad a la insulina, la cual depende de varios factores como la edad, el sexo y la ganancia de peso, mostrando un aumento continuo de la glucemia tanto en ayuno como en estado posprandial (**Figura 3**). Esta condición, conocida como prediabetes, es un factor de riesgo que puede preceder a la aparición de DM2 y enfermedad cardiovascular, y está caracterizada por la presencia de niveles alterados de glucosa en ayuno (100 a 125 mg/dl), intolerancia a la glucosa (140 a 199 mg/dl a las dos horas de haber realizado una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) con una carga de 75 g de glucosa anhidra) o niveles incrementados de HbA1c (5.7 a 6.4%). La prediabetes está fuertemente asociada a la obesidad (en particular a la obesidad abdominal o visceral), a la dislipidemia con niveles elevados de triglicéridos o bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (colesterol HDL) y a la hipertensión (ADA, 2022a; DeFronzo et al., 2015).

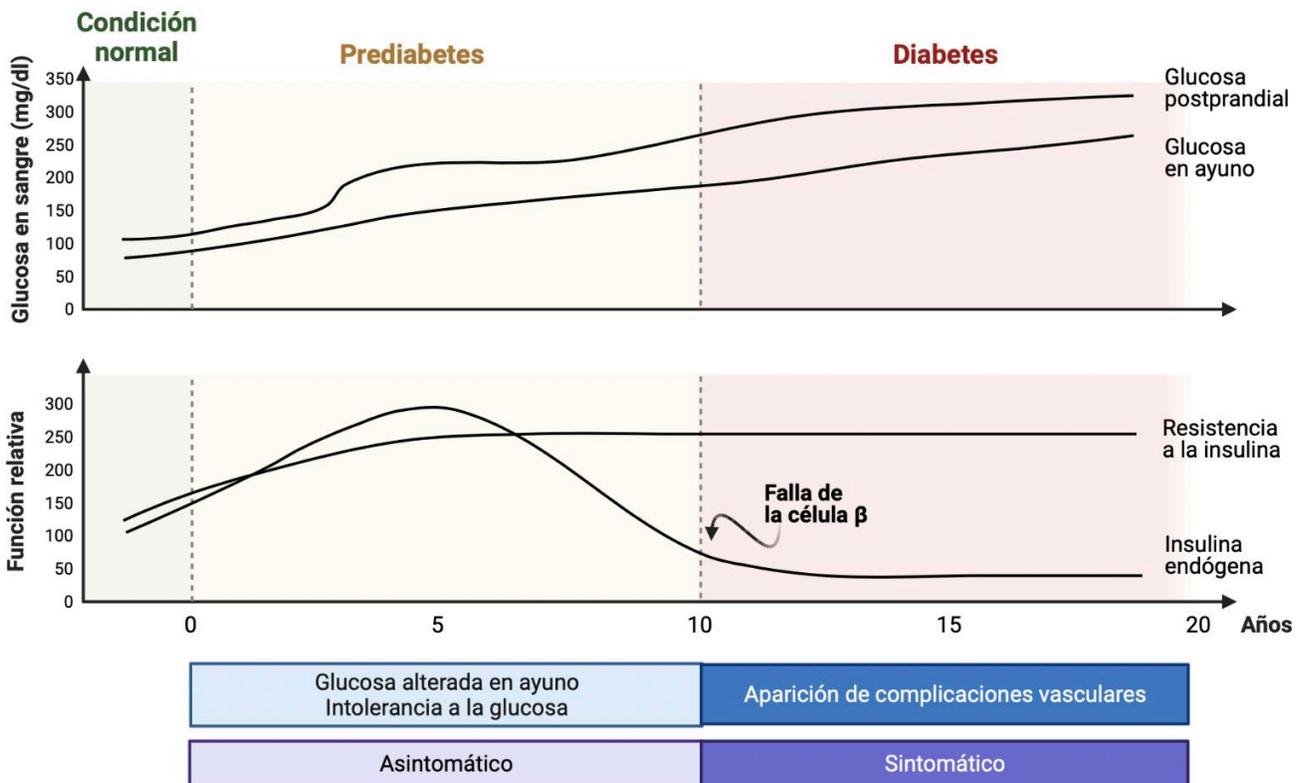


Figura 3. Curso natural de la diabetes mellitus tipo 2.

En el panel superior se representan las **concentraciones de glucosa sanguínea** en ayuno y en estado posprandial a lo largo de las diferentes fases del desarrollo de la DM2, mientras que en el panel inferior se indica la **función relativa** de las células β pancreáticas en presencia de la RI. Durante los primeros diez años, aproximadamente, se presenta un estado de prediabetes que va acompañado de un incremento en las concentraciones de glucosa, tanto en ayuno (glucosa alterada en ayuno) como en estado posprandial (intolerancia a la glucosa), así como del aumento en la concentración de insulina endógena (hiperinsulinemia), con la finalidad de compensar la RI. En este tiempo, los pacientes son asintomáticos. Posteriormente, ocurre un declive en la función de las células β , el cual desemboca en una falla incapaz de seguir compensando la RI y, por lo tanto, de controlar los niveles de glucosa sanguínea en ambos estados metabólicos. En este punto, la DM2 es diagnosticada debido a la aparición de los síntomas que acompañan a la hiperglucemia y, también, por la manifestación clínica de las complicaciones vasculares. Adaptado de Ramlo-Halsted & Edelman (2000); Schmeltz & Metzger (2007). Creado en Biorender.com

2.3.2 Resistencia a la insulina

Los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de la DM2 comienzan años antes de la aparición de los síntomas clásicos de la enfermedad (**Figura 3**). La primera condición que se desarrolla es la RI, la cual se caracteriza por la presencia de una hiperinsulinemia compensatoria por parte de las células β pancreáticas para mantener la glucemia dentro de niveles adecuados (Mlinar et al., 2007). Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar la RI, entre los que se incluyen: obesidad, inflamación, disfunción mitocondrial, lipotoxicidad/hiperlipidemia, factores genéticos, estrés del retículo endoplásmico, edad, estrés oxidativo, hígado graso, hipoxia, lipodistrofia y embarazo. Sin embargo, la obesidad es el principal factor que juega un papel esencial para la aparición de esta condición (Ye, 2013).

La obesidad y el sobrepeso están definidos como una acumulación excesiva o anormal de grasa que representa un riesgo para la salud (WHO, 2021). Debido al incremento del tejido adiposo, se presenta una inflamación crónica de bajo grado que comienza con una elevada infiltración de macrófagos y expresión de citocinas proinflamatorias, las cuales son secretadas al torrente sanguíneo provocando inflamación sistémica (Calle & Fernandez, 2012). La inflamación inhibe la señalización de la insulina en adipocitos de distintas maneras: a través de la inhibición directa de varios componentes de la vía de señalización de la insulina; de la inhibición de la proteína 1c de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1c) y al receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ), los cuales juegan un papel importante en la sensibilidad a la insulina, ya que inducen la expresión de proteínas implicadas en la adipogénesis y en el almacenamiento de ácidos grasos; y mediante el incremento en la lipólisis y el bloqueo de la síntesis de triglicéridos (Ferré & Foufelle, 2007; Petersen & Shulman, 2018; Ye, 2013).

La desregulación de la lipólisis promueve un aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres (AGLs) que, aunado a la secreción de citocinas proinflamatorias del tejido adiposo (adipocinas), como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), reprimen la expresión de genes implicados en el metabolismo de glucosa y lípidos, o producen fosforilaciones en residuos de serina y treonina de componentes de la vía de señalización de la insulina que bloquean la señal (Petersen & Shulman, 2006). En hígado, los AGLs funcionan como sustrato para la síntesis de triglicéridos, de lipoproteínas de muy baja densidad (colesterol VLDL) y de la gluconeogénesis; mientras que en el músculo esquelético se inhibe la captación y oxidación de glucosa, además de la glucogénesis, contribuyendo en gran medida a la hiperglucemia debido a que este órgano capta del 80 al 90% de la glucosa circulante (Mlinar et al., 2007).

2.3.3 Disfunción de la célula β

La DM2 se caracteriza por un declive y subsecuente falla de la función de las células β pancreáticas en un trasfondo de RI (**Figura 3**). Comúnmente, se reconoce que la disfunción de este tipo celular es resultado de una sobrecompensación crónica para mantener la normoglucemia como consecuencia del mal funcionamiento de la insulina en sus órganos blanco. Sin embargo, también se ha propuesto que la hiperinsulinemia es necesaria para la aparición de RI debido a que se ha reportado que los continuos niveles elevados de insulina provocan esta condición patológica porque promueven la acumulación de lípidos en los tejidos periféricos y la regulación a la baja de su propio receptor (Corkey, 2012; Ning et al., 2011; Shanik et al., 2008).

La hiperinsulinemia está estrechamente relacionada a la obesidad, y se produce como consecuencia de una hipersecreción de insulina que se presenta tanto en ayuno como en estado posprandial por un excesivo consumo de nutrientes, aumentando la sensibilidad a la glucosa de la célula β durante las etapas tempranas de la DM2 (Corbin et al., 2016). La sobrenutrición prolongada desgasta a las células β y, además, conlleva a fenómenos de glucolipotoxicidad (niveles elevados de glucosa y lípidos). Estos procesos, así como la inflamación asociada a la obesidad, causan daños en la respuesta secretora de insulina e incrementan la tasa de apoptosis de las células β debido a que causan estrés oxidante, el cual produce daños en organelos (particularmente en la mitocondria), y en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; también se induce estrés del retículo endoplásmico y autofagia (Cerf, 2013). Por otro lado, el exceso crónico de lípidos, particularmente de grasas saturadas y ácidos grasos de cadena larga, agota las reservas de insulina ya que promueven su secreción y al mismo tiempo inhiben su síntesis (Erion et al., 2015).

En las etapas iniciales de la DM2, la función de las células β pancreáticas ya se encuentra reducida en un 80% y, conforme va progresando la enfermedad, la masa celular se va reduciendo hasta alcanzar una disminución del 60%. En este contexto, además de la apoptosis, se han implicado fenómenos de desdiferenciación o transdiferenciación, y envejecimiento acelerado que repercuten en la pérdida de células β en DM2. La disfunción temprana de la célula β se ha asociado a diferentes variantes genéticas que, acompañadas con los factores de riesgo ambientales, pueden desencadenar la enfermedad. Algunos de los genes relacionados a la función de la célula β involucrados en el riesgo de desarrollar DM2 son *ABO*, *IGF2BP2*, *MTNR1B*, *TCF7L2*, *HNFI1A*, *HNFI1B*, *ADCY5*, *SLC30A8*, *CCND2*, *PAM* y *WFS1* (Eizirik et al., 2020).

2.3.4 Complicaciones diabéticas

Los niveles de glucosa elevados están relacionados con procesos patológicos importantes que se pueden presentar en momentos determinados del progreso de la enfermedad, ocasionando la muerte prematura o una disminución en la calidad de vida de los pacientes diabéticos. La disminución súbita en la función de la insulina (ya sea como consecuencia de la RI o de una secreción pancreática pobre) y el concomitante aumento de sus hormonas contrareguladoras, como el glucagón, pueden ocasionar el incremento en la producción hepática de glucosa y la disminución en su utilización por los tejidos periféricos, promoviendo así niveles altos de glucosa sanguínea y cambios en la osmolaridad en el espacio extracelular. El estado hiperosmolar hiperglucémico y la cetoacidosis diabética son complicaciones

agudas que se producen como resultado de estos procesos; sin embargo, la presencia de cetonas, generadas por una lipólisis incrementada, se produce con mayor frecuencia en ausencia de insulina, es decir, en pacientes con diabetes tipo 1 (Rewers, 2018).

A largo plazo, la hiperglucemia puede ocasionar complicaciones vasculares, ya que daña la estructura y el funcionamiento adecuado del endotelio y no vasculares. Los niveles altos de glucosa persistentes o intermitentes promovidos por un control glucémico deficiente provocan disfunción endotelial, la cual puede evolucionar a aterosclerosis, por la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y a la activación de vías no canónicas como la de los polioles que, primeramente, causan estrés osmótico para finalmente dañar las células por el estrés oxidativo y por la estimulación anormal de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Cruz et al., 2011; Toma et al., 2021).

Entre las alteraciones estructurales y funcionales del endotelio se encuentran la promoción de la vasoconstricción e hipoxia tisular, el aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis, el engrosamiento de la membrana basal microvascular provocado por la acumulación de fibronectina y colágeno tipo IV, el incremento en la expresión de moléculas de adhesión, y la inducción de la RI. Dependiendo de la localización de estas anomalías, las complicaciones vasculares son clasificadas en microvasculares (daño en vasos sanguíneos pequeños) y macrovasculares (daño en arterias). Las complicaciones microvasculares incluyen la enfermedad ocular o retinopatía, la enfermedad renal o nefropatía, y el daño neural o neuropatía; mientras que las complicaciones macrovasculares incluyen la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica (Costo-Muriel et al., 2020; Forbes & Cooper, 2013). De manera general, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM2, y padecer esta enfermedad aumenta el riesgo de presentar algún evento cardiovascular en comparación con pacientes no diabéticos (**Figura 4**) (Costo-Muriel et al., 2020). Por otro lado, las complicaciones no vasculares pueden incluir infecciones, cambios en la piel y pérdida de la audición (Powers et al., 2018).

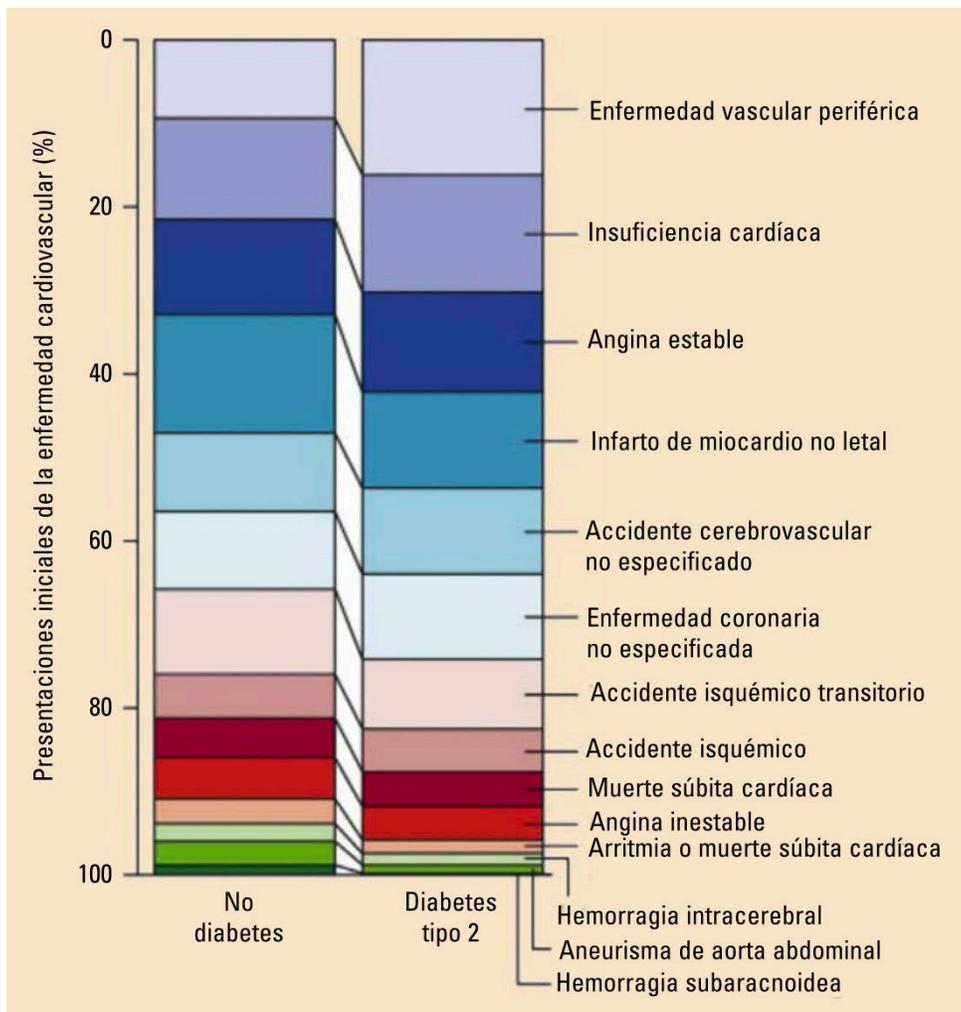


Figura 4. Presentación inicial de enfermedad cardiovascular de pacientes con DM2 en comparación con pacientes sin diabetes.

Tomado de Costo-Muriel et al. (2020).

2.4 Mecanismos fisiopatológicos de la diabetes mellitus tipo 2: blancos terapéuticos y fármacos actuales

Gracias a la continua investigación que se lleva a cabo sobre la fisiopatología de la DM2, a lo largo de los años, se han podido identificar blancos terapéuticos prometedores para disminuir o controlar los niveles de glucosa sanguínea. El tratamiento farmacológico actual se centra en mejorar el perfil glucémico con la finalidad de que a largo plazo se retrase la aparición de las complicaciones vasculares y, por lo tanto, aumentar la calidad de vida del paciente por más tiempo. El estándar de oro para evaluar el control glucémico de un paciente con DM2 en la práctica clínica es la HbA1c, la cual provee una medida del promedio de glucosa sanguínea de los últimos tres meses (Fonseca, 2003; WHO, 2020). En este contexto, tanto la investigación preclínica como la clínica utilizan como marcador de eficacia la modificación de este parámetro sanguíneo para la evaluación del efecto terapéutico de nuevos compuestos o mezclas de compuestos (Digenio et al., 2018; Pan et al., 2020; Subramoniam, 2016).

Además de la reducción de HbA1c, los nuevos tratamientos apuntan a disminuir alguna de las anomalías patológicas que se presentan en la enfermedad, utilizando moléculas variadas que corrijan los múltiples defectos de la homeostasis de la glucosa (o una sola que tenga múltiples blancos farmacológicos), además de aplicarlos tempranamente para prevenir o disminuir el fallo progresivo de las células β (DeFronzo, 2009). Hasta la fecha, son reconocidas al menos 10 anomalías fisiopatológicas que contribuyen al desarrollo de hiperglucemia crónica y que representan algunos de los presuntos blancos terapéuticos para el tratamiento de la DM2: 1) incremento en la gluconeogénesis, 2) disminución de la captación periférica de glucosa, 3) secreción disminuida de insulina, 4) secreción aumentada de glucagón, 5) lipólisis incrementada, 6) disfunción de incretinas, 7) incremento en la reabsorción renal de glucosa, 8) disfunción de neurotransmisores, 9) disfunción en la vasodilatación mediada por insulina, y 10) activación de vías inflamatorias (DeFronzo et al., 2015).

La mayoría de estas anomalías fisiopatológicas se encuentran interrelacionadas y su aparición depende de la presencia de RI en distintos tejidos: músculo, hígado, tejido adiposo, riñón, tracto gastrointestinal, endotelio vascular, cerebro y células β pancreáticas. Cada tejido presenta particularidades anormales que contribuyen a la hiperglucemia; sin embargo, los mecanismos subyacentes que dan origen a la RI en todos ellos convergen en la deficiente señalización de la insulina que limita la activación de los factores involucrados en el metabolismo energético que ejercen una respuesta tejido-específica. La RI que se presenta en la obesidad y la DM2 ha sido ligada principalmente a defectos en la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa y la proteína cinasa B (PI3K/Akt), particularmente a la isoforma Akt2 (Cusi et al., 2000; Krook et al., 2000).

2.4.1 Activación de la vía de señalización PI3K/Akt por insulina

La activación de la vía PI3K/Akt inicia cuando la insulina, secretada por las células β pancreáticas, se une a su receptor en el órgano blanco activando su función de tirosina cinasa, lo que promueve su autofosforilación y la subsecuente fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS), principalmente IRS1 y IRS2, en residuos de tirosina. Posteriormente, la enzima P13K es reclutada y activada por los IRS, convirtiendo el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) de la membrana plasmática a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual facilita la fosforilación y activación de Akt en dos sitios importantes. La fosforilación de activación de Akt es llevada a cabo por la cinasa dependiente de fosfoinositidos 1 (PDK1) en el residuo Thr308 del dominio catalítico, y por el complejo diana de rapamicina en mamíferos 2 (mTORC2) en el residuo Ser473 del dominio regulatorio. La enzima Akt activada es la encargada de fosforilar a distintos factores que controlan el metabolismo celular y que están involucrados en la regulación de vías y procesos como la glucogénesis, la gluconeogénesis, la captación de glucosa, la biogénesis mitocondrial, la inhibición de la autofagia, la síntesis de proteínas, y la lipogénesis *de novo* (Schultze et al., 2012).

2.4.2 Mecanismos de la resistencia a la insulina ligada a la obesidad y a la diabetes tipo 2

La inflamación crónica de bajo grado que se presenta en la obesidad y que precede al desarrollo de DM2 se ha asociado con la aparición de RI, afectando principalmente la cascada de señalización de la vía PI3K/Akt activada por la insulina (**Figura 5**). Los mecanismos moleculares frecuentemente asociados a la RI en estos estados patológicos son: el incremento en la fosforilación en residuos de serina del receptor de insulina y de los IRS, lo cual inhibe la fosforilación en residuos de tirosina y puede llegar a promover la degradación de los mismos, así como, la regulación a la alta de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), en particular la fosfatasa citoplasmática 1B (PTP1B), la cual atenúa la señal de la insulina al catalizar la defosforilación del receptor de insulina y los IRS. Estos mecanismos funcionan naturalmente como regulación negativa de esta vía de señalización; sin embargo, se ha reportado que se encuentran incrementados en la obesidad y la DM2 (Saltiel & Kahn, 2001).

La sobrenutrición prolongada promueve tanto la acumulación ectópica de lípidos tóxicos, como de ceramidas y diacilglicerol (DAG), debido al exceso de AGLs; también, produce especies reactivas de oxígeno (EROs), inflamación sistémica, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico. Estos factores se han descrito como las causas del aumento en la fosforilación de serinas en el receptor de insulina y los IRS y, por lo tanto, de la generación de RI (DeFronzo et al., 2015).

El incremento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia), causado por la ganancia de peso, ocasiona la muerte de este tipo celular debido a una falta en el suministro de oxígeno. Los adipocitos hipertroficados presentes en el tejido adiposo disfuncional liberan AGLs, EROs y citocinas proinflamatorias al torrente sanguíneo, los cuales promueven la actividad de distintas cinasas en los órganos blanco de la insulina, como la cinasa de los inhibidores del factor nuclear κ B (IKK), la cinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la proteína PKC que, a su vez, fosforila a los IRS en residuos de serinas, alterando su fosforilación en tirosinas. Por otro lado, $\text{TNF-}\alpha$ activa la actividad de PTP1B, la cual defosforila los residuos de tirosina en el receptor de insulina y los IRS, mientras que IL-6 puede regular a la baja la función del receptor de insulina impidiendo alostéricamente su interacción con los IRS (Ahmed et al., 2021).

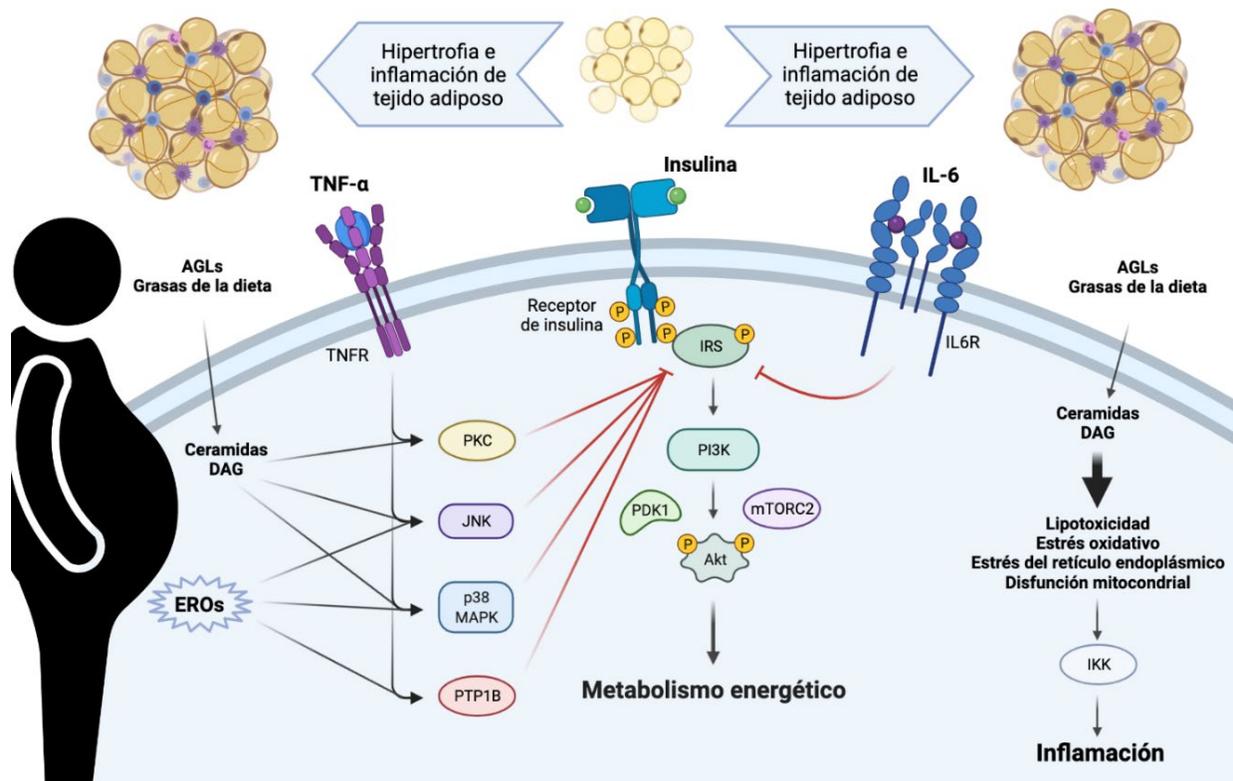


Figura 5. Mecanismos de inducción de RI en la obesidad.

AGLs: ácidos grasos libres; DAG: diacilglicerol; EROs: especies reactivas de oxígeno; $\text{TNF-}\alpha$: factor de necrosis tumoral alfa; TNFR: receptor de $\text{TNF-}\alpha$; IL-6: interleucina 6; IL6R: receptor de IL-6; IRS: sustrato del receptor de insulina; PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa; PDK1: cinasa dependiente de fosfoinositidos 1; mTORC2: complejo diana de rapamicina en mamíferos 2; Akt: proteína cinasa B; IKK: cinasa de los inhibidores del factor nuclear κ B; PKC: proteína cinasa C; p38 MAPK: cinasa p38 activada por mitógenos; JNK: cinasa c-Jun N-terminal; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B. Adaptado de Ahmed et al. (2021). Creado en Biorender.com

2.4.3 Blancos terapéuticos de fármacos actuales para el tratamiento de la diabetes tipo 2

Para lograr el objetivo de disminuir los niveles de glucosa y retrasar la aparición de las complicaciones a largo plazo, se recomienda mejorar la alimentación y realizar ejercicio físico. Adicionalmente, es necesaria la intervención de fármacos que coadyuven el control de la hiperglucemia (Gökçay Canpolat & Şahin, 2020). De acuerdo a la ADA (2022c), la metformina es el medicamento de primera línea para el tratamiento de la DM2; sin embargo, conforme va progresando la enfermedad, es necesaria la aplicación de terapias combinadas para el mantenimiento de los objetivos glucémicos recomendados por dicha organización de salud (ADA, 2022b). Si los niveles de HbA1c se elevan más allá de 7.5% durante el tratamiento farmacológico, o si los valores iniciales son $\geq 9\%$, se recomienda la intervención de una terapia combinada con dos agentes hipoglucemiantes o con insulina (Chaudhury et al., 2017).

Los fármacos que son utilizados actualmente para el tratamiento de la DM2, conocidos como agentes hipoglucemiantes, exhiben una gran variedad de mecanismos de acción y actúan sobre blancos específicos en los distintos órganos involucrados en alguna o varias de las anormalidades fisiopatológicas reconocidas por DeFronzo y colaboradores (2015). A continuación, se presenta una descripción de los blancos terapéuticos identificados para aminorar las anormalidades fisiopatológicas, así como el mecanismo de acción de los medicamentos empleados para el tratamiento de la DM2 utilizados en la actualidad. Posteriormente, se presenta una tabla que resume los principales fármacos hipoglucemiantes con sus respectivos blancos farmacológicos (**Tabla 2**).

1.4.3.1 Secreción de insulina y disfunción de incretinas

La secreción de insulina estimulada por glucosa es un proceso complejo modulado por varios factores, entre los que se incluyen nutrientes, hormonas y estímulos neuronales. Ante un incremento de la concentración plasmática de glucosa, ésta entra a la célula β mediante el glucotransportador (GLUT1 en humanos; GLUT2 en roedores), siendo fosforilada por la glucocinasa y metabolizada para la generación de ATP. El aumento en la concentración de ATP trae como consecuencia el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), causando la despolarización de la membrana de la célula β y la subsecuente apertura de los canales de Ca^{2+} y Na^+ dependientes de voltaje. La elevación de la concentración de Ca^{2+} , debido a la apertura de estos canales, favorece la fusión de los gránulos preformados de insulina con la membrana plasmática para promover su exocitosis. Como consecuencia, se presentan dos fases de secreción: una primera fase que dura alrededor de 5 min, en donde se liberan los gránulos preformados

de insulina, y una segunda fase que involucra un incremento gradual de insulina debido a la síntesis y liberación de esta hormona que se prolonga por 60 min (Komatsu et al., 2013).

La respuesta de la insulina, ante el abrupto aumento de los niveles de glucosa, depende de la vía de administración, ya que se ha observado que dicha respuesta es dos veces mayor tras una carga de glucosa oral que a la promovida por la glucosa intravenosa, a pesar del incremento equivalente de la concentración de glucosa plasmática por ambas rutas de administración. Este efecto potenciador, conocido como “efecto incretina”, está relacionado a la liberación dependiente de glucosa de las hormonas intestinales péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP), también conocidas como incretinas (DeFronzo, 2004). Ambas hormonas se unen a receptores acoplados a proteínas G en las células β , lo que activa a la proteína cinasa A (PKA) debido al incremento en la concentración de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), trayendo como consecuencia una secreción de insulina estimulada por glucosa aumentada (Komatsu et al., 2013).

Los efectos de las incretinas no están limitados a exacerbar la respuesta de la insulina dependiente de glucosa. Se ha reportado que GIP promueve la síntesis de triglicéridos mediada por insulina, estimula la actividad de la lipoproteína lipasa y modula la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo, además de promover la proliferación y la supervivencia de las células β . Por otro lado, GLP-1 inhibe el vaciado gástrico, disminuye la ingesta de alimento, inhibe la secreción de glucagón, ralentiza la tasa de gluconeogénesis y estimula la proliferación de las células β . Ambas hormonas son degradadas rápidamente por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), por lo que su vida media es corta (1.5 – 2 min en roedores y 5 – 7 min en humanos) (Kim & Egan, 2008).

En un paciente con DM2, tanto la masa como la función de las células β se encuentran reducidas, lo cual empeora conforme va progresando la enfermedad debido a la alta demanda de insulina que se presenta por la RI. Durante este estado patogénico, la secreción de insulina estimulada por glucosa se encuentra dañada, en parte, como consecuencia de fenómenos de lipotoxicidad y glucotoxicidad que son causados por la sobrenutrición prolongada (DeFronzo, 2009; Zhang et al., 2017). Inicialmente, la respuesta secretora de insulina es capaz de compensar la RI; sin embargo, eventualmente la primera fase de secreción de insulina se pierde, y la segunda fase se daña, causando hiperglucemia posprandial (Fonseca, 2003). En este contexto, los fármacos secretagogos de insulina (sulfonilureas y meglitinidas) cumplen la función de promover la secreción de insulina y son recomendados como agentes de segunda línea para el tratamiento de la DM2. Estos hipoglucemiantes son normalmente utilizados junto con la metformina como terapia combinada para alcanzar las metas glicémicas, conduciendo a una reducción de HbA1c de 0.7% a 1.5% (Grant & Graven, 2016). Sin embargo, se debe considerar que ambos tipos de

fármacos pierden su efectividad a medida que la función de las células β disminuye con el tiempo, por lo que las terapias actuales deben incluir estrategias farmacológicas que preserven su función y, adicionalmente, que prevengan o retrasen la apoptosis celular (DeFronzo et al., 2014).

Tanto las sulfonilureas como las meglitinidas estimulan la secreción de insulina debido a que promueven directamente el cierre de los canales de K_{ATP} , al unirse al receptor de sulfonilureas (SUR1) (**Figura 6**). Sin embargo, se unen a diferentes sitios del SUR1, por lo que su efecto sobre la secreción de insulina es distinto. Por un lado, las sulfonilureas, como la glibenclamida, son capaces de secretar insulina sin depender de la presencia de glucosa, ya que inducen la secreción en ausencia de ésta y en hasta concentraciones elevadas de 15 mmol/l, mientras que las meglitinidas, como la repaglinida, necesitan una concentración intermedia de glucosa (3 – 10 mmol/l) para llevar a cabo su función secretora (Ding et al., 2019; Fuhendorff et al., 1998; Seino et al., 2012). Las meglitinidas son utilizadas como secretagogos de insulina de acción corta para reducir el pico posprandial de glucosa y, a diferencia de las sulfonilureas, están asociadas a menos eventos hipoglucémicos (Ferrannini & DeFronzo, 2015).

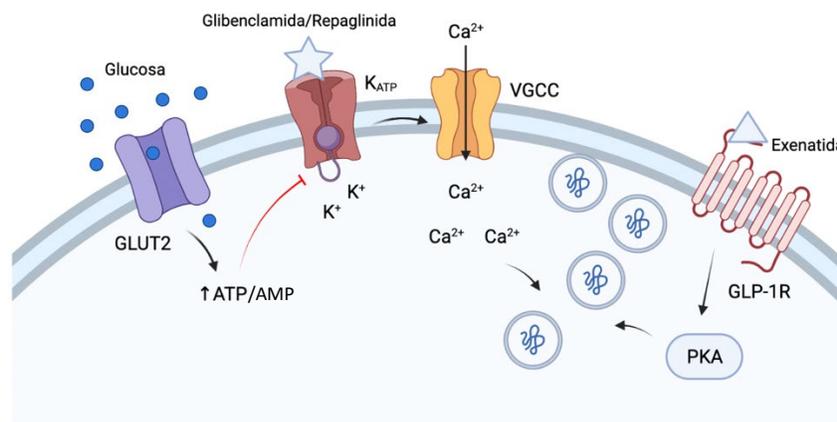


Figura 6. Secreción de insulina estimulada por sulfonilureas/meglitinidas y análogos de GLP-1.

GLUT1/2: glucotransportador 1/2; TZDs: tiazolidinedionas; AdipoR1: receptor de adiponectina 1; OCT1: transportador de cationes orgánico 1; K_{ATP} : canal de K^+ sensible a ATP; VGCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; GLP-1R: receptor de GLP-1; PKA: proteína cinasa A. Elaboración propia con base en información de Komatsu et al. (2013); Seino et al. (2012). Creado en Biorender.com

Por otro lado, en pacientes con DM2, la función de las incretinas se encuentra dañada como resultado de defectos en la secreción de GLP-1 y resistencia a GIP (DeFronzo et al., 2014). Para afrontar esta deficiencia, se han desarrollado agonistas del receptor de GLP-1 que son resistentes a la degradación de DPP-4 e inhibidores de DPP-4 que prolongan la vida media de estas hormonas. Se ha reportado que la exenatida, un análogo de GLP-1, estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa (**Figura 6**), suprime la secreción de glucagón, retarda el vaciamiento gástrico y promueve la reducción de ingesta de

alimento, además de reducir los niveles de HbA1c en un 0.4 – 0.9%, el peso corporal de 0.9 a 3.1 kg, la presión sistólica (3.4 – 3.7 mm Hg) y la presión diastólica (0.2 – 3.2 mm Hg) (Lorenzati et al., 2010).

1.4.3.2 Resistencia a la insulina: activación de PPAR γ

Además de la disfunción de las células β pancreáticas (que se traduce en una pobre respuesta secretora de insulina dependiente de glucosa), la DM2 se caracteriza por presentar una deficiente actividad de esta hormona sobre sus órganos blanco. Esta condición fisiopatológica, conocida como RI, ha resultado ser una diana terapéutica de mayor interés ya que, aunque promover la secreción de insulina es un buen blanco terapéutico para el tratamiento de la DM2, el uso continuo de los secretagogos de insulina tiende a desgastar la función pancreática a largo plazo. La generación de fármacos sensibilizadores a la insulina podría ayudar a preservar la masa y función de las células β al mejorar la actividad de la insulina ya presente en el sistema, evitando una mayor demanda por parte de los tejidos sensibles a esta hormona.

De manera general, la RI es un fenómeno fisiopatológico que afecta a los órganos diana de la insulina. Su aparición ha sido asociada a la acumulación ectópica de lípidos que afectan la señalización de esta hormona debido a la disfunción que se presenta en el tejido adiposo hipertrófico, promoviendo la liberación de AGL a torrente sanguíneo. Como consecuencia, este tejido disfuncional es uno de los blancos farmacológicos de mayor importancia para el tratamiento de la DM2, ya que, al mejorar su funcionalidad, se disminuye la liberación de AGL y subsecuentemente sus efectos inhibitorios sobre la señalización de la insulina en los distintos tejidos afectados. Adicionalmente, la disminución de la RI se asocia a la reducción de los eventos cardiovasculares y al retraso del proceso aterosclerótico en pacientes de alto riesgo con DM2, debido a que uno de los roles de la insulina es la activación del óxido nítrico, el cual es un potente vasodilatador y agente antiaterogénico (Di Pino & DeFronzo, 2019).

Se ha reportado que las tiazolidinedionas (TZDs) disminuyen la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y aumentan la sensibilidad a la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Debido a que son agonistas de PPAR γ , sus principales efectos se encuentran asociados al tejido adiposo, ya que este receptor nuclear se encuentra predominantemente expresado en este tipo celular. Al ser activado por las TZDs, PPAR γ promueve la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y el balance de energía, desencadenando la diferenciación de adipocitos (adipogénesis), la disminución de la lipólisis y citocinas proinflamatorias, la expresión génica de la citocina antiinflamatoria adiponectina, el transporte y almacenamiento de ácidos grasos, y el transporte y la utilización de glucosa (**Figura 7**) (Hauer, 2002).

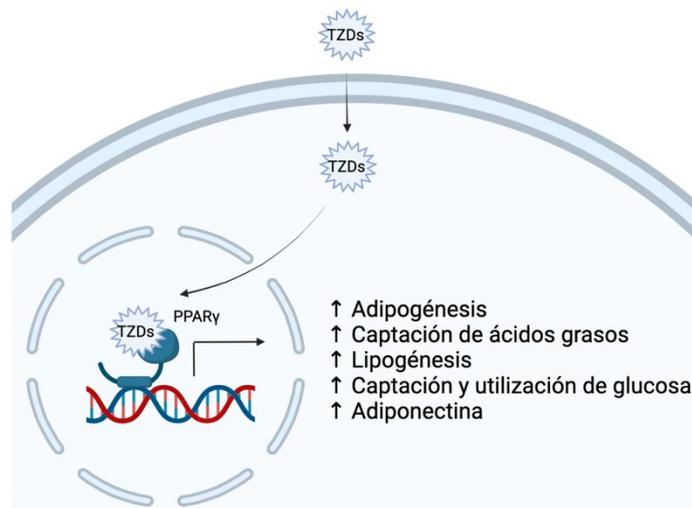


Figura 7. Efectos promovidos por PPAR γ tras su activación por tiazolidinedionas en tejido adiposo.

TZDs: tiazolidinedionas; PPAR γ : receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma. Elaboración propia con base en información de Hauner (2002). Creado en Biorender.com

La movilización y transporte de lípidos a los nuevos adipocitos tendrían un efecto directo sobre la RI en los distintos tejidos que presentan una acumulación ectópica de AGL, lo que ayudaría a mejorar el funcionamiento de la insulina. Sin embargo, las TZDs también pueden mejorar la sensibilidad a la insulina a través de la activación indirecta de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), un sensor metabólico ubicuo que se activa en estados de baja energía. Al activar a PPAR γ , las TZDs promueven la expresión y secreción de adiponectina, una hormona que ejerce efectos protectores contra la inflamación e incrementa la sensibilidad a la insulina a través de la activación de AMPK, aumentando la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en otros tejidos (Khoramipour et al., 2021; Viollet et al., 2009).

La utilización de TZDs en estudios clínicos ha demostrado tener la misma eficacia en reducir la concentración de HbA1c que la metformina y las sulfonilureas. Además, se ha observado que presenta efectos beneficiosos más allá del control glucémico, como la reducción en la excreción urinaria de albúmina, el incremento en los niveles de colesterol HDL, la disminución de la presión sanguínea, y el mejoramiento en marcadores sustitutos de aterosclerosis; sin embargo, como efectos secundarios se han presentado la ganancia de peso, edema, anemia e insuficiencia cardíaca congestiva, por lo que su uso es limitado y restringido (Cheng & Fantus, 2005).

1.4.3.3 Producción hepática de glucosa: activación de AMPK e inhibición de enzimas gluconeogénicas

Como se ha mencionado anteriormente, la principal fuente de glucosa en estado de ayuno es la producida por el hígado, la cual es principalmente promovida por la acción del glucagón y mantenida dentro de un rango relativamente constante para satisfacer la demanda de energía de los órganos que dependen exclusivamente de este monosacárido. Esta producción es fuertemente inhibida por la insulina después de la ingesta de alimentos, cambiando el estado de degradación de nutrientes por uno de almacenamiento de energía. No obstante, en un paciente diabético, la gluconeogénesis es la anomalía fisiopatológica que más contribuye al estado hiperglucémico en ayuno y en estado posprandial como consecuencia de la RI presente en el hígado (Sharabi et al., 2015).

Durante el ayuno de una noche, el hígado de una persona sana produce glucosa a una tasa de aproximadamente 1.8 – 2 mg/kg.min; sin embargo, esta tasa aumenta alrededor de 0.5 mg/kg.min en un paciente con DM2, promoviendo un incremento importante en el estado basal de producción de glucosa (Cersosimo et al., 2018). Tras la ingesta de alimentos y el subsecuente aumento de los niveles de insulina, la supresión de la producción hepática de glucosa es más lenta en un paciente diabético, por lo que se produce una evidente hiperglucemia posprandial debido al exceso de glucosa producida en adición a la proveniente de la fuente exógena (intestino) (Rizza, 2010).

Se ha reportado que, de las dos vías productoras de glucosa, la gluconeogénesis es la vía que se encuentra alterada. Las tasas incrementadas de la gluconeogénesis observadas en pacientes diabéticos suelen ser atribuidas a diversos factores: disponibilidad aumentada de sustratos gluconeogénicos, RI hepática, e hiperactivación de la vía debido a niveles altos de glucagón (Sharabi et al., 2015). Por otro lado, también se ha documentado que la hiperglucemia en ayuno, debido al incremento de la tasa gluconeogénica, está más relacionada a una elevada actividad de las enzimas reguladoras que participan en la vía, particularmente de la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) y de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que a un aumento en su expresión transcripcional (Cersosimo et al., 2018; Samuel et al., 2009).

Debido a lo anterior, la gluconeogénesis representa uno de los principales blancos farmacológicos para disminuir la hiperglucemia tanto en ayuno como en estado posprandial. En este contexto, uno de los principales mecanismos de acción de las biguanidas, es el de inhibir la gluconeogénesis a través de la reducción de su flujo de manera aguda o bien, de la regulación a la baja de la transcripción de genes involucrados en esta vía a largo plazo (Agius et al., 2020). Se ha descrito que la inhibición de la gluconeogénesis por este tipo de fármacos hipoglucemiantes ocurre debido a que promueven el aumento de la concentración de adenosina monofosfato (AMP) en relación con la concentración de adenosina

trifosfato (ATP) al inhibir el complejo I de la cadena transportadora de electrones. El incremento de este nucleótido activa a AMPK, la cual disminuye la transcripción de PEPCK y G6Pasa en el hepatocito (Rena et al., 2017). Por otro lado, al aumentar las concentraciones de AMP, se promueve la inhibición alostérica de otra enzima reguladora de la gluconeogénesis: la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) (**Figura 8**) (Hunter et al., 2018).

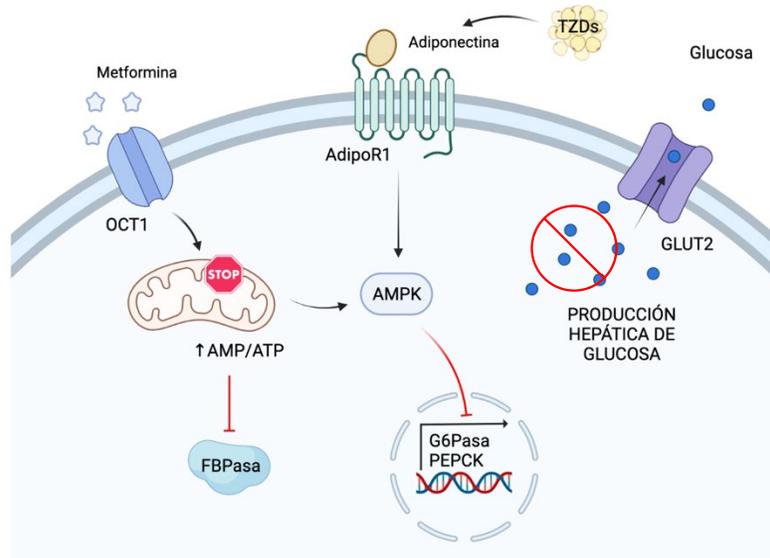


Figura 8. Inhibición de la producción hepática de glucosa por metformina y tiazolidinedionas.

TZDs: tiazolidinedionas; AdipoR1: receptor de adiponectina 1; OCT1: transportador de cationes orgánico 1; GLUT2: glucotransportador tipo 2; AMPK: cinasa dependiente de AMP; G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Elaboración propia con base en información de Khoramipour et al. (2021); Viollet et al. (2009). Creado en Biorender.com

La metformina, la única biguanida presente en el mercado actual, ha demostrado tener buenos resultados en pacientes diabéticos desde su introducción en Estados Unidos en los 90's. En diversos estudios clínicos se ha observado que, al igual que las sulfonilureas (principales fármacos utilizados para el tratamiento de la DM2 antes que la metformina) y la insulina, la metformina logra un control glucémico similar al reducir los niveles de glucosa en ayuno y la HbA1c en un 1.2%. Sin embargo, a diferencia de las sulfonilureas y la insulina, esta biguanida disminuye los niveles de insulina en ayuno, no está tan fuertemente asociada a episodios de hipoglucemia, y no produce ganancia de peso (Andújar-Plata et al., 2012). Debido a estos efectos y a su seguridad, la ADA (2022c) recomienda su uso como primera terapia en combinación con ejercicio y dieta.

Por otro lado, se ha reportado que las TZDs también disminuyen la gluconeogénesis hepática y mejoran la función de la insulina en hígado (Natali & Ferrannini, 2006). En tejido adiposo, las TZDs promueven la expresión y secreción de adiponectina, una citocina antiinflamatoria que activa a AMPK

en hígado, y que conlleva a la inhibición de la lipogénesis, a la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y a la inhibición de las enzimas gluconeogénicas (**Figura 8**) (Hardie, 2007).

1.4.3.4 Captación periférica de glucosa: activación de AMPK y translocación de GLUT4

En conjunto, el músculo esquelético y el tejido adiposo captan el 25% de la glucosa circulante durante el ayuno, y alrededor del 33% tras una carga de glucosa oral; sin embargo, la mayoría de la captación periférica de glucosa ocurre por el músculo esquelético (alrededor del 80% al 85%), mientras que sólo el 5% es utilizada por el tejido adiposo (DeFronzo, 2004). La captación de glucosa en estos tejidos ocurre de manera insulina dependiente, es decir, la insulina es necesaria para inducir la translocación del glucotransportador tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática a través de la activación de la vía PI3K/Akt, principalmente; de este modo, la glucosa es internalizada a la célula para que pueda ser metabolizada (Carnagarin et al., 2015). En un paciente con DM2, debido a la RI que se presenta en el músculo, la captación periférica de glucosa en respuesta a la acción de la insulina se ve retrasada hasta por 40 min, promoviendo una tasa de captación reducida hasta en un 50% (Cersosimo et al., 2018; Rizza, 2010).

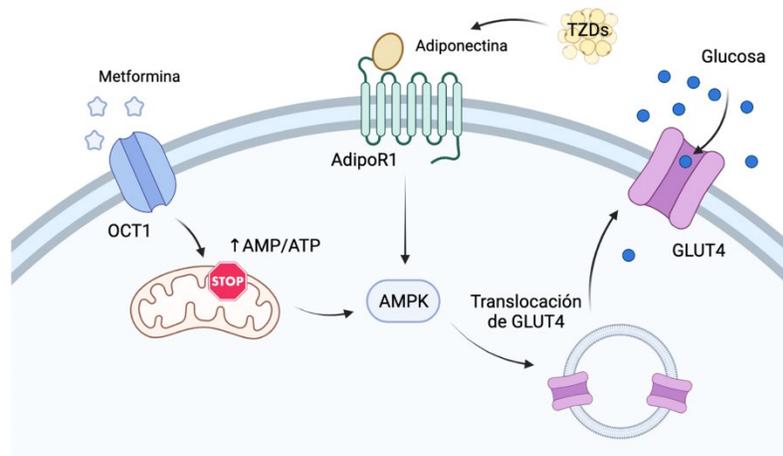


Figura 9. Captación de glucosa promovida por metformina y tiazolidinedionas en músculo esquelético.

TZDs: tiazolidinedionas; AdipoR1: receptor de adiponectina 1; OCT1: transportador de cationes orgánico 1; GLUT4: glucotransportador tipo 4; AMPK: cinasa dependiente de AMP. Elaboración propia con base en información de Khoramipour et al. (2021); Viollet et al. (2009). Creado en Biorender.com

Dentro del arsenal de fármacos que son utilizados en la terapia para disminuir la hiperglucemia, las TZDs son los hipoglucemiantes orales que aumentan la captación periférica de glucosa (**Figura 9**). Como se mencionó anteriormente, las TZDs aumentan la expresión y secreción de la adiponectina en tejido adiposo, lo que trae como consecuencia la activación de AMPK en músculo esquelético. Este

sensor metabólico es capaz de promover la translocación de GLUT4 y la oxidación de ácidos grasos en este tipo celular, sensibilizando al tejido muscular a la función de la insulina (Viollet et al., 2009). Por otro lado, existe evidencia de que, por ser un activador de AMPK, la metformina también es capaz de promover la captación periférica de glucosa (Cheng & Fantus, 2005; DeFronzo et al., 2014; Natali & Ferrannini, 2006).

1.4.3.5. Degradación de carbohidratos: inhibición de α -glucosidasas

La hiperglucemia posprandial, definida como un incremento en los niveles de glucosa superior a 140 mg/dl después del consumo de alimentos, contribuye en gran medida a la elevación de HbA1c a largo plazo y ha sido reportada como un mejor indicador del control glucémico que los niveles de glucosa que se presentan en la hiperglucemia en ayuno (Fonseca, 2003). El desarrollo de hiperglucemia posprandial coincide con el daño o la ausencia de la primera fase de secreción de insulina, la disminución de la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y la pobre supresión de la producción endógena de glucosa después de la ingesta de alimento, por lo que está determinada por la absorción de carbohidratos y los efectos coordinados de la insulina y el glucagón sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado y los tejidos periféricos (Maffettone et al., 2018).

En pacientes con DM2, el pico insulinémico tras la ingesta de alimento está retrasado, además de ser insuficiente para suprimir la producción endógena de glucosa, por lo que la ingesta de carbohidratos de absorción lenta y dietas ricas en fibra pueden mitigar las excursiones posprandiales de glucosa e insulina. En este contexto, los inhibidores de α -glucosidasas, aunque no corrigen alguna anormalidad fisiopatológica de la DM2, son utilizados para retrasar la digestión de carbohidratos complejos y disminuir la demanda de insulina requerida ante el aumento posprandial de glucosa, simulando el consumo de carbohidratos de bajo índice glucémico y dietas ricas en fibra (Leroux-stewart et al., 2015).

Las enzimas α -glucosidasas se localizan en los bordes en cepillo del intestino delgado y se encargan de hidrolizar los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de la dieta en monosacáridos para facilitar su absorción. Gracias a la acción de inhibición competitiva de estos fármacos, la absorción de carbohidratos ocurre de manera más lenta, trayendo como consecuencia la disminución del pico posprandial de glucosa (**Figura 10**) (Ghani, 2015). Los inhibidores de α -glucosidasas presentan una modesta disminución de los niveles de HbA1c (0.5 – 0.8%) y un bajo riesgo de hipoglucemia; sin embargo, se ha observado que cuando son utilizados en terapias combinadas con metformina, la reducción de los niveles de HbA1c es más eficaz (Gökçay Canpolat & Şahin, 2020).

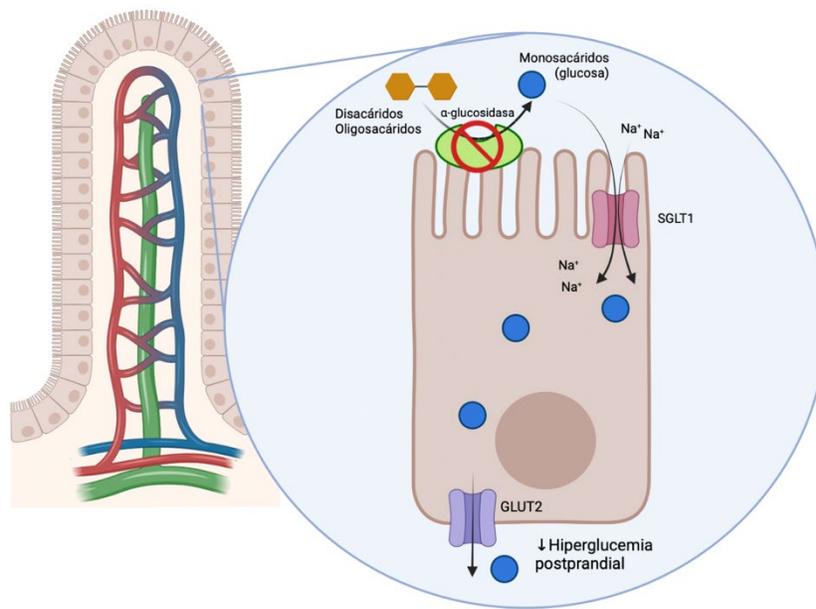


Figura 10. Reducción de la hiperglucemia posprandial por inhibidores de α -glucosidasas intestinales.

SGLT-1: cotransportador sodio-glucosa tipo 1; GLUT2: glucotransportador tipo 2. Adaptado de Krentz & Bailey (2005); Patil et al. (2015). Creado en Biorender.com

1.4.3.6. Reabsorción renal de glucosa: inhibición de SGLT-2

El riñón juega un papel relevante en el mantenimiento de la hiperglucemia en pacientes con DM2. En respuesta a niveles elevados de glucosa presentados en el lumen tubular proximal, el sistema de cotransporte sodio-glucosa incrementa su capacidad de reabsorción al regular a la alta la expresión y cinética del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT-2), lo que resulta en el incremento del umbral de transporte de glucosa tubular y en el reciclamiento de una cantidad significativa de glucosa que regresa al torrente sanguíneo (Cersosimo et al., 2018). Para contrarrestar este aumento en el umbral de transporte de glucosa, se desarrollaron inhibidores del SGLT-2 que disminuyen la reabsorción renal de glucosa y aumentan su excreción urinaria (**Figura 11**). Estos fármacos disminuyen el riesgo de presentar eventos de hipoglucemia y han demostrado presentar una reducción de los valores de HbA1c en un 0.5 – 1%, una disminución de peso de 1.5 a 3.5 kg, y un descenso de la presión sistólica de 3 a 5 mm Hg, además de reducir los trastornos cardiovasculares, la hospitalización por insuficiencia cardíaca y la aparición de daños renales en comparación con inhibidores de DDP-4. Sin embargo, los efectos adversos que se han presentado son el riesgo aumentado de presentar infecciones genitourinarias, y un ligero incremento en los niveles de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL, 3 – 8%) (Gökçay Canpolat & Şahin, 2020; Toma et al., 2021).

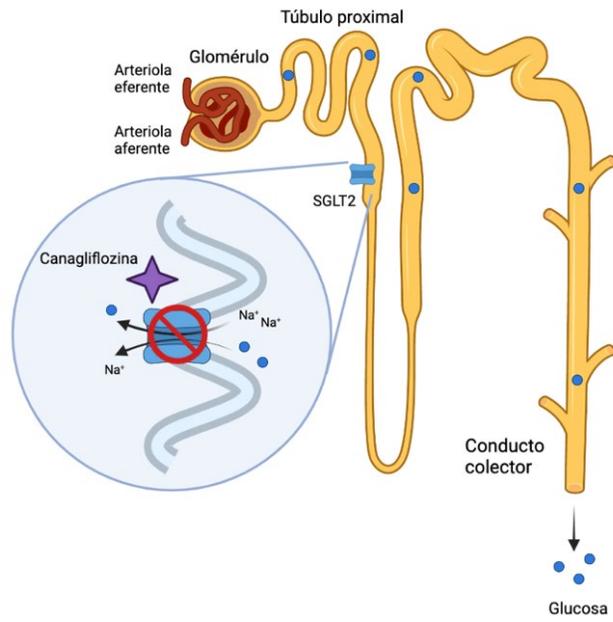


Figura 11. Disminución de la reabsorción renal de glucosa por inhibidores de SGLT-2.

SGLT-2: cotransportador sodio-glucosa tipo 2. Elaboración propia con base en información de Cowie & Fisher, (2020). Creado en Biorender.com

Tabla 2. Resumen de fármacos hipoglucemiantes utilizados en la terapia actual para el tratamiento de DM2.

Fármaco	Órgano blanco / Blanco farmacológico	Efectos terapéuticos	Reducción de HbA1c
Sulfonilureas	Páncreas (células β) Canales K_{ATP}	\uparrow secreción de insulina	1 – 2%
Meglitinidas	Páncreas (células β) Canales K_{ATP}	\uparrow secreción de insulina	0.5 – 1.5%
Agonistas del receptor de GLP-1*	Receptor de GLP-1	\uparrow secreción de insulina \downarrow secreción de glucagón Retraso del vaciamiento gástrico \downarrow ingesta de alimento	0.5 – 1.5%
Inhibidores de DPP-4	DPP-4	Inhibición de degradación de incretinas	0.5 – 0.8%
TZDs	Tejido adiposo PPAR γ (\uparrow adiponectina) Hígado, músculo esquelético AMPK (indirecto)	\uparrow sensibilidad a la insulina (sistémico) \downarrow lipólisis \uparrow captación periférica de glucosa \downarrow gluconeogénesis	0.5 – 1.4%
Biguanidas	Hígado AMPK FBPasa Músculo esquelético AMPK	\downarrow gluconeogénesis \uparrow captación periférica de glucosa	1 – 2%
Inhibidores de α -glucosidasas	Tracto gastrointestinal α -glucosidasas	Inhibición de pico posprandial de glucosa	0.5 – 0.8%
Inhibidores de SGLT-2	Riñón SGLT-2	\downarrow reabsorción renal de glucosa	0.5 – 1%
Insulina exógena*	Órganos blanco de la insulina Receptor de insulina	Activación de receptores de insulina y su cascada de señalización en múltiples tejidos sensibles	1 – 2.5%

*Vía de administración parenteral. HbA1c: hemoglobina glicada; AMPK: proteína cinasa activada por AMP; FBPasa: fructosa-1,6-bisphosphatasa; TZDs: tiazolidinedionas; PPAR γ : receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; K_{ATP} : canales de K^+ sensibles a ATP; GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; DPP-4: dipeptidil peptidasa 4; SGLT-2: cotransportador sodio-glucosa tipo 2. Elaboración propia con base en la información del texto y en información obtenida de Chaudhury et al. (2017); Mazzola (2012).

2.5 Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de diabetes tipo 2

Debido a la idiosincrasia popular y al fácil acceso y preparación de remedios herbolarios, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades es una práctica común tanto en México como en el mundo que se ha mantenido desde la antigüedad. Debido a la alta prevalencia de DM2 en nuestro país, los pacientes buscan nuevas plantas medicinales con el objetivo de contrarrestar los altos niveles de glucosa en sangre que caracterizan la enfermedad y, de esta manera, tener un mejor control glucémico (Andrade-Cetto et al., 2021). Mediante la documentación del uso tradicional de plantas medicinales, es decir, utilizando un enfoque etnofarmacológico, nuevas moléculas con potencial efecto hipoglucemiante pueden ser identificadas para, posteriormente, ser usadas como punto de inicio para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de DM2.

Actualmente, se estima que alrededor de 800 plantas medicinales son utilizadas para el tratamiento de diabetes en México (Escandón-Rivera et al., 2020); sin embargo, la mayoría de ellas carecen de estudios científicos que respalden sus efectos farmacológicos, su composición química y sus efectos toxicológicos. Debido a esto, se siguen realizando continuos esfuerzos para la caracterización de los mecanismos de acción y la evaluación de la eficacia de estas plantas medicinales.

2.5.1 Papel de los productos naturales en el desarrollo de fármacos hipoglucemiantes

Los productos naturales han jugado un papel clave en el descubrimiento de fármacos a lo largo de la historia. Estos compuestos derivados de fuentes naturales exhiben una gran variedad de andamios y complejidad estructural que les confieren propiedades especiales que han sido aprovechadas para desarrollar nuevos medicamentos para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas, así como para enfermedades cardiovasculares y esclerosis múltiple (Atanasov et al., 2021). Muchos de los medicamentos creados a partir de productos naturales son usados directamente como se encuentran en la naturaleza, algunos son derivados mediante semisíntesis y otros son creados utilizando a los productos naturales como modelo (Singh, 2012).

Específicamente para DM2, se han identificado distintos compuestos de fuentes naturales, como bacterias, animales y plantas, que son usados actualmente en el esquema de tratamiento para esta enfermedad. Por ejemplo, los fármacos utilizados como inhibidores de α -glucosidasas son productos derivados de la semisíntesis de metabolitos secundarios identificados a través de tamizajes químicos realizados en bacterias como *Actinoplanes* sp. SE50 (acarbosa), cepas de *Bacillus* y *Streptomyces* (miglitol), y *S. hydroscopicus* subsp. *limoneus* (voglibosa) (Naik & Kokil, 2013). Por otro lado, la

exenatida, un agonista del receptor de GLP-1, es un derivado sintético de la exendina-4, la cual es un péptido producido naturalmente por las glándulas salivales del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) (Kim & Egan, 2008). Otro ejemplo es el caso de la metformina, la cual es utilizada como fármaco de primera línea para el tratamiento de la DM2. Este medicamento es un derivado sintético de la guanidina identificada y aislada de *Galega officinalis* L. [Fabaceae], comúnmente conocida como “ruda de cabra” o “lila francesa”, la cual era originalmente utilizada contra lombrices, epilepsia, fiebre y pestilencia, así como para tratar las condiciones de sed y micción frecuente en la Europa medieval (Bailey, 2017).

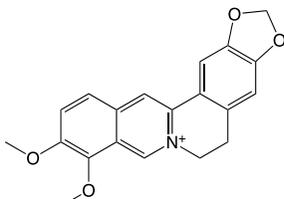
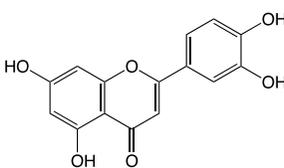
Tomando en cuenta estos antecedentes, los productos naturales pueden ser descritos como puntos de partida promisorios para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden a la regulación del metabolismo de la glucosa, corrigiendo o limitando las anormalidades fisiopatológicas que se desarrollan en la DM2. En este contexto, la búsqueda clásica de nuevas moléculas a partir de productos naturales comienza con la selección biológica de extractos "crudos" para identificar el extracto con la mejor bioactividad para, posteriormente, ser fraccionado con la finalidad de aislar los principios activos (Atanasov et al., 2021).

Dado que la DM2 es una enfermedad multifactorial, es decir, que son reconocidas varias dianas involucradas en el desarrollo de su fisiopatología, la modulación de varios blancos farmacológicos podría representar un control metabólico superior en comparación con el efecto terapéutico brindado por la regulación de un sólo blanco. Debido a esto, el enfoque terapéutico actual engloba el uso de varios agentes con dianas específicas para lograr un control glucémico adecuado. Sin embargo, la respuesta a los fármacos hipoglucemiantes actuales se pierde en algunos pacientes con DM2 a largo plazo, lo que conduce a un control inadecuado de la hiperglucemia. Por otro lado, estos medicamentos están asociados a varios efectos secundarios como hipoglucemia severa, acidosis láctica, lesión idiosincrásica de las células hepáticas, déficit neurológico permanente, malestar digestivo, dolor de cabeza, mareos e incluso la muerte (El-Abhar & Schaalán, 2014).

En respuesta a los problemas que presentan los medicamentos utilizados en la terapia actual, el desarrollo de fármacos está enfocado en el descubrimiento de nuevas moléculas que sean más seguras y efectivas, y que tengan un efecto terapéutico basado en varios blancos farmacológicos o bien, usar una combinación de compuestos activos en un solo fármaco. A diferencia del paradigma clásico de la farmacología “on-target”, es decir, un fármaco con un blanco específico, el enfoque de la polifarmacología, o la unión de un fármaco a más de una diana, podría ser más efectivo contra una enfermedad tan compleja como la DM2 debido a las múltiples anormalidades fisiopatológicas que se presentan (Reddy & Zhang, 2013).

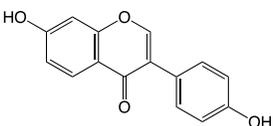
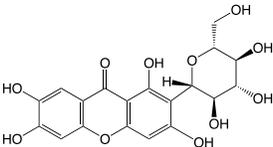
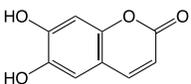
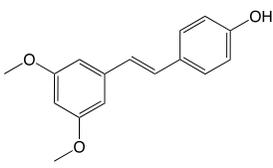
En este sentido, las moléculas derivadas de productos naturales o nutraceuticos han cobrado relevancia debido a que cumplen con estos criterios. Particularmente, las plantas contienen una gran diversidad de moléculas, producto de su metabolismo secundario, que exhiben diferentes mecanismos de acción sobre distintas vías metabólicas que repercuten directa o indirectamente en el metabolismo de la glucosa. En los últimos años, se han identificado y aislado una gran cantidad de compuestos de fuentes vegetales con potentes efectos hipoglucemiantes, como alcaloides, fenoles, terpenoides, glucósidos, flavonoides, saponinas, xantonas, fibras dietéticas, polisacáridos, glucolípidos, peptidoglicanos y aminoácidos (Gaikwad et al., 2014; Sharma et al., 2018), los cuales pueden ejercer su efecto terapéutico través de distintos mecanismos como la estimulación de la secreción de insulina, la regeneración y protección de las células β pancreáticas, la reducción de RI e inflamación, la estimulación de la glucogénesis y la glucólisis hepática, la inhibición de la gluconeogénesis, y la inhibición de la absorción de carbohidratos y grasas (**Tabla 3**) (Duarte et al., 2020; Oyagbemi et al., 2014).

Tabla 3. Ejemplos de productos naturales de origen vegetal con mecanismos hipoglucemiantes.

Compuesto	Fuente	Mecanismo de acción
<p>Berberina</p>  <p>PubChem CID: 2353</p>	<p>Raíces y corteza del tallo de especies del género <i>Berberis</i> L. [Berberidaceae]</p> <p><i>Coptis teeta</i> Wall., <i>C. chinensis</i> Franch. y <i>Hydrastis canadensis</i> L. [Ranunculaceae]</p> <p>Corteza de <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. [Rutaceae]</p> <p>Tallos y raíces de <i>Tinospora sinensis</i> (Lour.) Merr. [Menispermaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aumenta la secreción de GLP-1 e inhibe a DPP-4. - Activa AMPK (regula captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos). - Incrementa la expresión de receptores de insulina. - Inhibe a PTP1B.
<p>Luteolina</p>  <p>PubChem CID: 5280445</p>	<p>Hojas de <i>Satureja hortensis</i> L. [Lamiaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe a maltasas en intestino delgado. - Aumenta la fosforilación de Akt a través de la activación de PPARγ. - Disminuye las complicaciones vasculares debido a la reducción de los niveles de óxido nítrico y EROs. - Aumenta la concentración de adiponectina y reduce los niveles de MCP-1 y resistina.

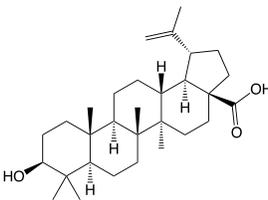
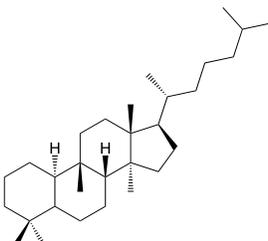
GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; DPP-4: dipeptidil peptidasa 4; AMPK: proteína cinasa activada por AMP; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; Akt: proteína cinasa B; PPAR γ : receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma; EROs: especies reactivas de oxígeno; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos. Elaboración propia con base en información obtenida de Gaikwad et al. (2014); Sharma et al. (2018); Vinayagam et al. (2017).

Tabla 3. (cont.)

Compuesto	Fuente	Mecanismo de acción
<p>Formononetina</p>  <p>PubChem CID: 5280378</p>	<p><i>Trifolium pratense</i> L. [Fabaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mejora el perfil lipídico mediante la activación de PPARα y la regulación a la baja de la expresión hepática de apolipoproteína C-III, componente de las VLDL. - Inhibe la apoptosis de las células β pancreáticas y promueve su regeneración. - Aumenta la secreción de insulina y la síntesis de glucógeno hepático.
<p>Mangiferina</p>  <p>PubChem CID: 5281647</p>	<p>Corteza de <i>Mangifera indica</i> L. [Anacardiaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Incrementa la sensibilidad a la insulina. - Disminuye los niveles de glucosa en ayuno, colesterol total, triglicéridos, LDL y VLDL. - Aumenta los niveles de HDL. - Inhibe las enzimas intestinales α-amilasas y α-glucosidasas.
<p>Esculetina</p>  <p>PubChem CID: 5281416</p>	<p><i>Artemisia scoparia</i> Waldst. & Kitam. y <i>A. capillaris</i> Thunb. [Compositae] <i>Ceratostigma willmottianum</i> Stapf (Plumbaginaceae) <i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck [Rutaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce los niveles de G6Pasa y FBPasa. - Disminuye los niveles de mRNA de G6Pasa. - Aumenta la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos en hígado (PGC-1α, PPARα y CPT). - Incrementa los niveles de mRNA de GLUT2 y glucocinasa en hígado.
<p>Pterostilbeno</p>  <p>PubChem CID: 5281727</p>	<p>Duramen de <i>Pterocarpus marsupium</i> Roxb. [Fabaceae]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Incrementa la captación de glucosa a través de la fosforilación de Akt y la expresión de GLUT4. - Aumenta la actividad de la glucocinasa.

PPAR α : receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa; PGC-1 α : coactivador 1 α de PPAR γ ; CPT: carnitina palmitoiltransferasa; GLUT2: glucotransportador tipo 2; Akt: proteína cinasa B; GLUT4: glucotransportador tipo 4. Elaboración propia con base en información obtenida de Gaikwad et al. (2014); Sharma et al. (2018); Vinayagam et al. (2017).

Tabla 3. (cont.)

Compuesto	Fuente	Mecanismo de acción
<p>Ácido betulínico</p>  <p>Pubchem CID: 64971</p>	<p><i>Viscum coloratum</i> (Kom.) Nakai [Santalaceae]</p> <p><i>Tecomella undulata</i> (Sm.) Seem. [Bignoniaceae]</p>	<p>- Inhibe a PTP1B.</p> <p>- Activa a AMPK:</p> <p>1) Inhibe la gluconeogénesis y la expresión génica de PGC-1α, PEPCK y G6Pasa.</p> <p>2) Aumenta la oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación de ACC.</p>
<p>Cucurbitano</p>  <p>PubChem CID: 71306378</p>	<p><i>Momordica charantia</i> L. [Cucurbitaceae]</p>	<p>- Incrementa la translocación de GLUT4 y la fosforilación de AMPK y ACC.</p>

PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; AMPK: proteína cinasa activada por AMP; PGC-1 α : coactivador 1 α de PPAR γ ; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinas; G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; ACC: acetil-CoA carboxilasa; GLUT4: glucotransportador tipo 4. Elaboración propia con base en información obtenida de Gaikwad et al. (2014); Sharma et al. (2018); Vinayagam et al. (2017).

2.5.2 Uso del enfoque etnofarmacológico para la identificación de plantas hipoglucemiantes

Desde el origen de la humanidad, los productos de la naturaleza han sido utilizados como medicina para el tratamiento de diversas enfermedades. Las civilizaciones humanas han adquirido, a través de los años, el conocimiento empírico sobre los usos de estos productos como curas para aliviar sus padecimientos mediante un enfoque holístico, integrando los aspectos psicológicos, sociales y espirituales del paciente con la terapia medicinal derivada de productos provenientes del ambiente (Jäger, 2015).

La medicina tradicional se define como los conocimientos, las habilidades y las prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias autóctonas de diferentes culturas utilizadas en el mantenimiento de la salud, la prevención, el diagnóstico, el mejoramiento o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (WHO, 2021b). Actualmente, se estima que alrededor de un 88% de la población mundial sigue utilizando la medicina tradicional y complementaria como parte de su atención primaria debido, en parte, a su bajo costo en comparación con los fármacos ya desarrollados (Gaikwad et al., 2014; WHO, 2019b).

A pesar de que la medicina tradicional engloba el uso de animales, plantas y minerales, las plantas constituyen la mayor parte de esta práctica humana. Las plantas utilizadas con fines medicinales contienen ingredientes activos que poseen alguna actividad biológica (Abubakar & Haque, 2020). Estos compuestos son sintetizados a partir del metabolismo secundario en respuesta a estímulos ambientales específicos tales como el daño inducido por herbívoros, ataques de patógenos o deprivación de nutrientes (Makheswari & Sudarsanam, 2011). Las preparaciones tradicionales que se elaboran a base de plantas medicinales son mezclas de estos componentes, por lo que suelen existir interacciones entre ellos que producen efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos que posiblemente afectan la biodisponibilidad de los principios farmacológicamente activos (Holmstedt & Bruhn, 1983).

La identificación de estos principios bioactivos a partir de las preparaciones tradicionales a base de plantas es objeto de estudio de la etnofarmacología, la cual puede definirse como el estudio de los productos naturales biológicamente activos de uso tradicional, con el objetivo de entender sus propiedades terapéuticas (Andrade-Cetto & Heinrich, 2011). La etnofarmacología incorpora métodos y conceptos socioculturales, enfocándose en la evaluación científica empírica de los usos terapéuticos de plantas utilizadas en cualquier sistema de medicina tradicional, es decir, es un campo de investigación multidisciplinario que ocupa herramientas de otras áreas como la antropología, la farmacología y la toxicología (Heinrich, 2015) y que, a su vez, contribuye al estudio de plantas medicinales y productos naturales de otras áreas como la farmacognosia, la fitoterapia y la fitomedicina.

El abordaje inicial para la realización de estudios etnofarmacológicos consiste en la recopilación de datos sobre el uso tradicional de las plantas medicinales de interés sobre cierta patología. La información obtenida en campo es crucial para el posterior desarrollo de experimentos que permitan la descripción de su contenido fitoquímico y la evaluación de sus efectos farmacológicos. Por ejemplo, es importante documentar qué parte y cuánto de la planta es utilizada, así como su forma de preparación y cómo es consumida tradicionalmente. De esta manera, la información obtenida se integra y se traslada al laboratorio con el objetivo de simular las condiciones de preparación y consumo por parte de los pacientes en las comunidades (Andrade-Cetto, 1999). Por otro lado, tener un conocimiento amplio de la fisiopatología de la enfermedad de interés, permite la elección de modelos *in vivo* o *in vitro* que presenten las características deseadas de la patología para evaluar el posible efecto terapéutico de la planta medicinal.

El tratamiento de enfermedades con plantas medicinales ha prevalecido desde tiempos pre-hispánicos. Debido a este arrastre cultural, que promueve el cuidado y el mejoramiento de la salud con productos naturales, los pacientes diabéticos buscan tratamientos alternativos a través del uso de plantas

(Andrade-Cetto, 2010; Chang et al., 2013). Tras el diagnóstico médico, el paciente es orientado a utilizar medicamentos hipoglucemiantes convencionales, sin embargo, se ha reportado que una gran mayoría de ellos opta por utilizar plantas como coadyuvantes para el tratamiento de dicha patología (Cruz & Andrade-Cetto, 2015).

La selección de plantas medicinales por los pacientes diabéticos en las comunidades suele ser a través de un enfoque de “ensayo y error”, en donde son adoptadas como parte de la medicina tradicional aquellas que muestran poseer mejores efectos terapéuticos desde una perspectiva empírica. El objetivo de la etnofarmacología es reconocer y documentar estas especies de gran valor cultural con la finalidad de identificar nuevos compuestos o elaborar fitomedicamentos para el manejo de enfermedades metabólicas como la DM2 (Andrade-Cetto, 2015).

2.6 Antecedentes de la especie de estudio

2.6.1 Elección y descripción de *Eryngium cymosum* F.Delaroche

En países como México, los pacientes diabéticos utilizan plantas medicinales para tratar esta enfermedad, ya sea consumiéndolas de manera paralela a fármacos hipoglucemiantes o en lugar de éstos. Debido a la riqueza de flora asociada al conocimiento del uso tradicional de plantas medicinales en ciertas regiones, es de interés farmacológico conocer y documentar dichas especies para su posterior evaluación científica. En este sentido, en el municipio de Tlanchinol, Hidalgo, se han identificado al menos 96 especies de plantas relacionadas a 286 menciones de uso para alguna enfermedad (Andrade-Cetto, 2009). En este trabajo también se mencionó que las principales fuentes de donde las personas obtienen estas plantas son de sus propios jardines, de la vegetación circundante y del mercado municipal de Huejutla de Reyes.

El mercado de Huejutla representa un punto importante para la venta y compra de plantas medicinales (**Figura 12**) entre personas que provienen de municipios colindantes como Tlanchinol y San Felipe Orizatlán. Desde 1994, nuestro grupo de trabajo detectó el uso de *Eryngium cymosum* F.Delaroche [Apiaceae] para el tratamiento de DM2 por parte de curanderos y pacientes diabéticos de Tlanchinol y Huejutla, quienes compran la planta seca en el mercado o bien, la colectan en el río cercano a la cabecera municipal de Huejutla.



Figura 12. Puesto de plantas medicinales en el mercado de Huejutla.

Fotografía tomada por Espinoza-Hernández, F. A. (junio, 2017).

Tras realizar un estudio de mercado entre los años 2016 y 2020, se reportó que esta especie, localmente conocida como “piñuela”, goza de un alto volumen de venta a lo largo del año. Los curanderos y vendedores recomiendan su consumo a lo largo del día como “agua de uso” para el tratamiento exclusivo de diabetes. Su forma de preparación consiste en hervir un puño (20 g) de la parte aérea de la planta en aproximadamente medio litro de agua (Espinoza-Hernández et al., 2021).

E. cymosum es una especie nativa de México y Guatemala (Plants of the World Online [POWO], 2021). Es descrita como una hierba perenne, glabra, robusta, caulescente; con raíces fasciculadas, fibrosas y blandas; tallos solitarios y erectos; hojas basales numerosas, linear-lanceoladas, láminas con la base dilatada, ápice agudo, espinoso-serradas con dientes extendidos; e inflorescencia en forma de cima ramificada con numerosas cabezuelas, pedunculadas, de globosas a hemisféricas (**Figura 13**). Crece en laderas y sotobosque de bosques de coníferas, entre los 2000 – 3200 m de altitud, floreciendo de julio a octubre y fructificando de octubre a enero (García-Ruiz, 2013). En nuestro país se ha reportado en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca, Querétaro y Zacatecas (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2021).

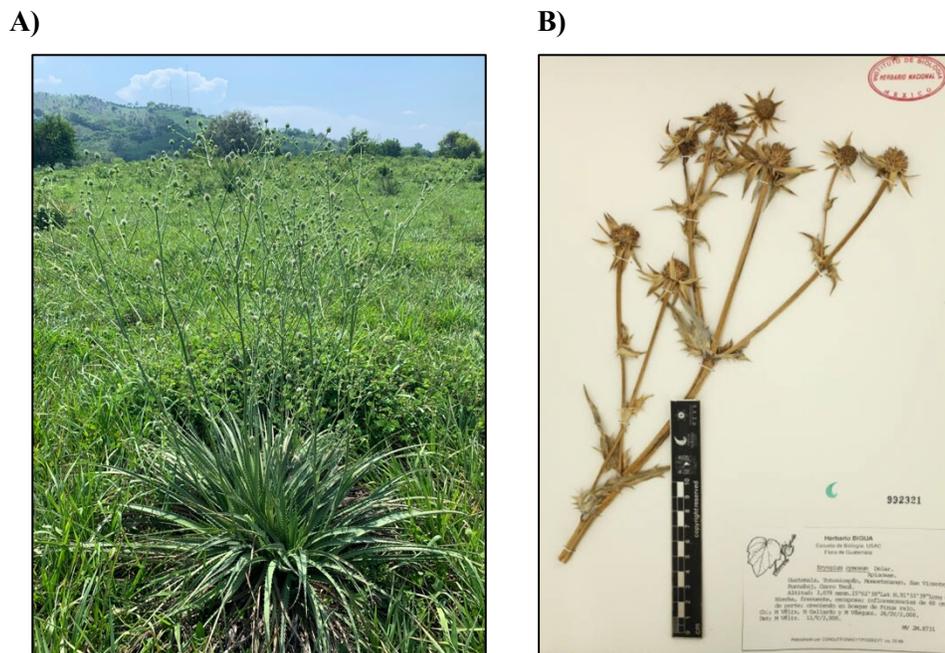


Figura 13. Imágenes de *E. cymosum*.

A) Fotografía de parte aérea. Tomada por Espinoza-Hernández, F. A. (junio, 2019). **B)** Herborizado de tallo con inflorescencias. Imagen tomada de Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM) (2014).

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo colectó la parte aérea de la especie para elaborar un perfil cromatográfico del extracto tradicional (acuoso). A través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), se detectó la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos. Los compuestos mayoritarios identificados fueron el ácido clorogénico, el ácido rosmarínico y el ácido cafeico (**Figura 14**) (Espinoza-Hernández et al., 2021).

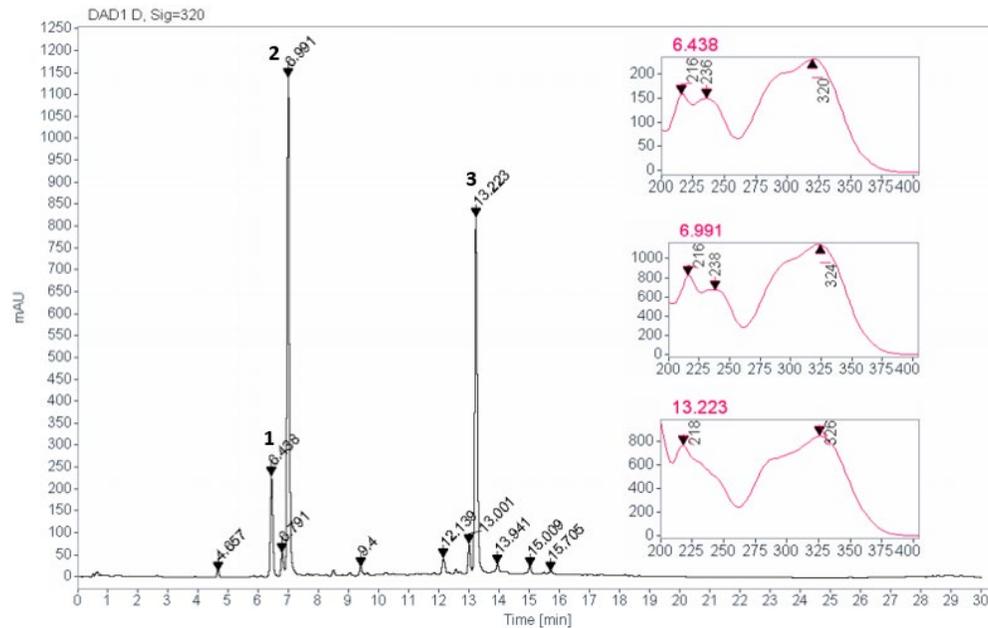


Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto acuoso de la parte aérea de *E. cymosum*.

Se coinyectó el extracto acuoso con los estándares **1** (ácido cafeico), **2** (ácido clorogénico) y **3** (ácido rosmarínico). Tomado de Espinoza-Hernández et al. (2021).

Como se ha mencionado anteriormente, esta especie ha sido utilizada durante varias décadas por pacientes diabéticos de comunidades localizadas tanto en el municipio de Tlanchinol como de Huejutla para tratar los niveles elevados de glucosa en sangre; sin embargo, no existen reportes en la literatura que respalden científicamente su uso para el tratamiento de DM2. Debido al valor brindado por los pacientes que la utilizan, es de interés evaluar su efecto hipoglucemiante y caracterizar el mecanismo de acción por el cual ejerce dicho efecto.

A pesar de que *E. cymosum* no cuenta con antecedentes farmacológicos, se ha documentado que distintas especies del género *Eryngium* Tourn. ex L., utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, son capaces de modular distintos mecanismos involucrados en la regulación de la hiperglucemia, como la inhibición de α -glucosidasas, la reducción de la gluconeogénesis, la secreción de insulina, la proliferación de células β pancreáticas y la posible disminución de RI (Andrade-Cetto et al., 2021; Dalar et al., 2014; Kasabri et al., 2012).

2.6.2 Antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos del género *Eryngium*

2.6.2.1 Usos medicinales

El género *Eryngium* comprende alrededor de 250 especies que se distribuyen en las regiones tropicales y templadas de cada continente (Calviño et al., 2008), y muchas de ellas tienen usos ornamentales, culinarios y medicinales. De manera particular, las especies pertenecientes a este género han sido utilizadas alrededor del mundo para el tratamiento de diversas enfermedades desde tiempos antiguos, por ejemplo, en Grecia, Dioscorides prescribía “*erungion*” para tratar las hinchazones. En el Viejo Mundo, las especies de *Eryngium* eran consumidas como alimento, como medicina y como afrodisiaco; uno de los usos medicinales más comunes era para neutralizar venenos (alexitérico). Los indígenas y colonos de Estados Unidos utilizaban las raíces de especies americanas como *E. yuccifolium* Michx. para tratar problemas hepáticos, como diurético y emético, para aliviar dolores musculares, para tratar reumatismos, padecimientos respiratorios, problemas del riñón y de la vejiga (Austin, 2004).

Los usos medicinales que se le han atribuido a las especies de este género en todo el mundo son como emético, diaforético, expectorante, afrodisiaco, antihemorróico, digestivo, diurético, emenagogo y alexitérico (Choudhury et al., 2014; Clement et al., 2007; Flamini et al., 2008; Jarić et al., 2015; Palá-Paúl, 2002; Paul et al., 2011; Polat & Satil, 2012). En México, se ha reportado que la infusión de las hojas de *E. monocephalum* Cav. es utilizada contra el dolor estomacal y el “mal de orín”, mientras que la infusión de las flores es utilizada para combatir la tos; por otro lado, la parte aérea de *E. carlinae* F. Delaroché es utilizada para combatir padecimientos del riñón, contra la congestión de pecho, dolor de espalda y de huesos, lavados vaginales, punzadas de oído, enfermedades venéreas, fiebre, purito, trastornos gastrointestinales, inflamación, para la bilis y contra la mordedura de serpientes venenosas (Guízar-González, 2007). También se ha documentado que las infusiones tanto de la parte aérea como de la raíz de *E. columnare* Hemsl. son utilizadas para tratar enfermedades del aparato digestivo, respiratorio, urinario, circulatorio y padecimientos de la piel (Bello-González et al., 2015).

El primer reporte de uso tradicional para diabetes del género *Eryngium* fue en un estudio realizado por Yaniv y colaboradores (1987) en Israel, en donde se mencionó que las hojas de *E. creticum* Lam. se preparaban en decocción y la infusión resultante se tomaba conforme se fuera necesitando. Esta especie, conocida comúnmente como “eringio”, forma parte de la medicina tradicional greco-árabe y presenta un amplio rango de actividades biológicas (Jarald et al., 2008). Otras especies reportadas como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de esta enfermedad son *E. foetidum* L. (Andrade et al., 2020; Paul et al., 2011), *E. ilicifolium* Lam. (Barkaoui et al., 2017) y *E. thyrsoides* Boiss. (Mahmoudi et al.,

2020). En México, se documentó que las especies *E. heterophyllum* Engel. y *E. carlinae*, ambas conocidas como “hierba del sapo”, son utilizadas tradicionalmente para tratar diabetes y dislipidemias (Carreón-Sánchez et al., 2013; Esquivel-Gutiérrez et al., 2012); mientras que Andrade-Cetto (2009) reportó que entre las especies utilizadas en el municipio de Tlanchinol, Hidalgo para el tratamiento de la diabetes se encuentra *E. longifolium* Cav.

2.6.2.2 Composición fitoquímica

En cuanto a antecedentes fitoquímicos del género, se ha reportado la presencia de terpenoides, saponinas triterpenoides, flavonoides, cumarinas, poliacetilenos, esteroides y aceites esenciales. Particularmente, se han identificado al menos 127 compuestos, entre los que destacan compuestos fenólicos y terpenoides (**Figura 15**) (Wang et al., 2012). Por ejemplo, los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de *E. creticum* presentan diferentes compuestos bioactivos como terpenoides, aldehídos, cumarinas, sitoesteroles, taninos, resinas y azúcares (Kikowska et al., 2016). A partir de los extractos radiculares de esta especie, se identificaron y aislaron los compuestos deltona, marmesina, quercetol, 3-(β -D-glucopiranosiloximetil)-2,4,4-trimetil-2,5-ciclohexadien-1-ona, 1- β -D-glucopiranosiloxi-3-metoxi-5-hidroxibenceno, β -sitosterol, 3- β -D-glucopiranosil del β -sitosterol, manitol y dulcitol (Al-Khalil, 1994). Mientras que de la parte aérea se aislaron dos compuestos: eryng-9-en-15-al, el cual posee un esqueleto sesquiterpenoide inusual, y la metilcetona eicos-8,11-dien-18-ol-2-ona (Ayoub et al., 2003).

Por otro lado, a partir de los aceites esenciales de diferentes partes de la especie española *E. bourgatii* Gouan se han identificado distintos terpenoides como filocladeno, biciclogermacreno, γ -muroleno, y (*E*)-cariofileno (Palá-Paúl et al., 2005). Mientras que los aceites esenciales obtenidos de la parte aérea, inflorescencias y frutos de la especie italiana *E. amethystinum* L. se caracterizaron por presentar derivados metilo de benzaldehído, fenilpropanoides como eugenol y (*E*)-metil isoeugenol, monoterpenoides como α -pineno y sesquiterpenoides como germacreno D (Flamini et al., 2008). En los aceites esenciales de la especie colombiana *E. foetidum* predominaron compuestos aldehídos alifáticos y aromáticos como 2-dodecen-1-al, 5-dodeceno, tetradecanal, tetradecenal, 3,4,5-trimetilfenol y aldehído 2,4,6-trimetilbenzoico (Jaramillo et al., 2011).

Algunos ácidos fenólicos, como ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico han sido identificados en especies del género, particularmente en cultivos *in vitro* de *E. planum* L. (Kikowska et al., 2012), mientras que distintos compuestos fenólicos y flavonoides glucosilados han sido reportados en extractos etanólicos, acetónicos y acuosos de *E. bornmuelleri* Nábělek, como rutina,

kaempferol/luteolina glucósido, quercetina/hesperitina glucósido, kaempferol/luteolina rutinósido, ácido caftárico, ácido hidroxibenzoico-*O*-hexósido y ácido felúrico (Dalar et al., 2014). Por otro lado, dentro de la composición fitoquímica de *E. campestre* L. se ha reportado la presencia de quercetina 3-*O*- β -glucósido, quercetina 3-*O*- β -glucurónido-4'-metil éter, isoramnetina 3-*O*- β -glucósido, isoramnetina 3-*O*- β -galactósido, isoramnetina 3-*O*- α -ramnósido, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido felúrico, ácido rosmarínico, benzoato de aegelinol y agasilina (Soumia, 2018).

Finalmente, del extracto orgánico de la especie mexicana *E. carlinae* se han identificado compuestos como β -sitosterol, estigmasterol, ácido rosmarínico, 3- β -*O*-D-glucósido de 3'-*O*-metil-miricetina y distintos ácidos grasos como deca-2,4-dienal, ácido docosanoico y ácido hexacosanoico (Toro-Rivera, 2017).

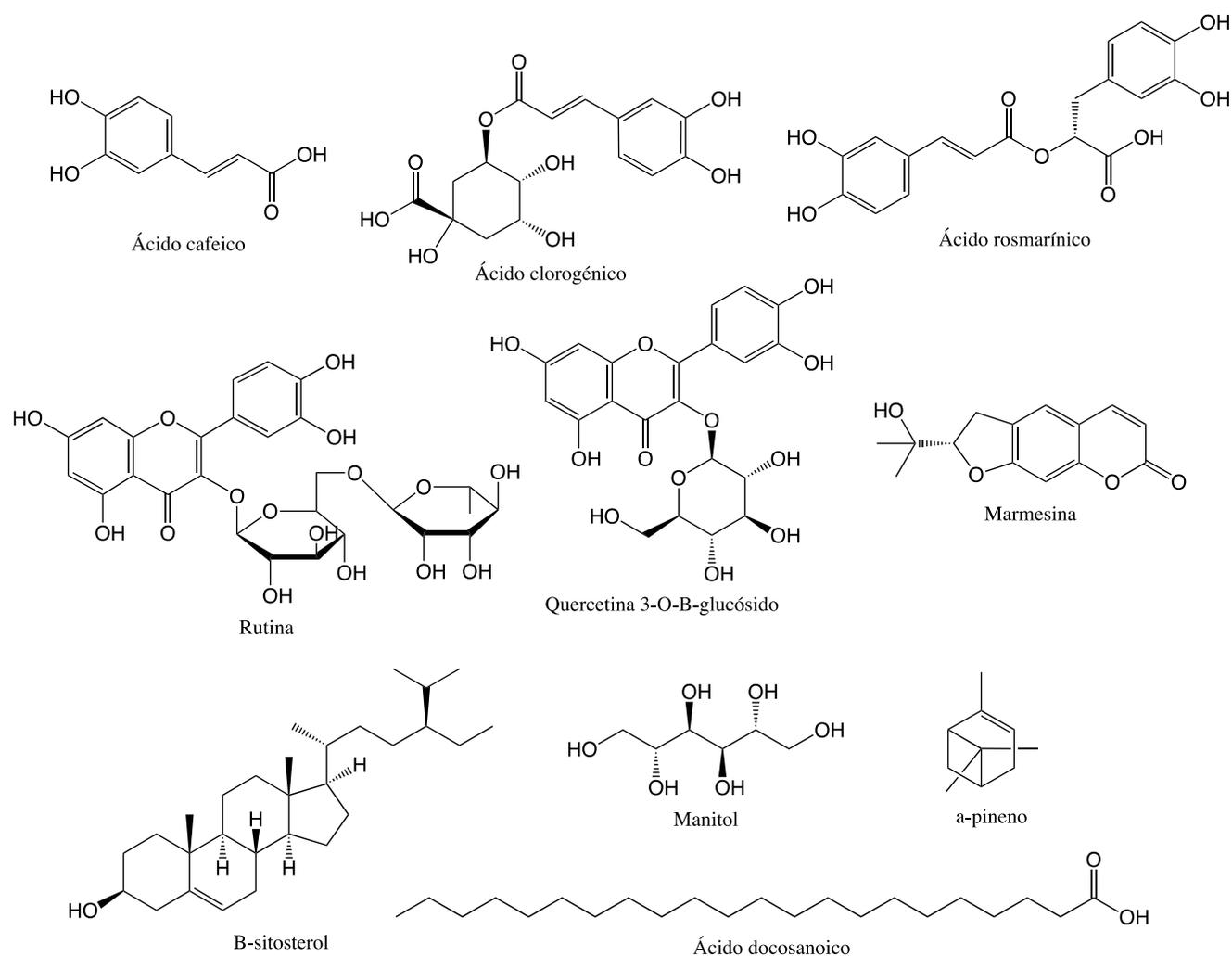


Figura 15. Diversidad de compuestos presentes en especies del género *Eryngium*.

Estructuras elaboradas en ChemDraw.

2.6.2.3 Antecedentes farmacológicos relacionados a diabetes

Distintas especies del género *Eryngium* utilizadas alrededor del mundo para tratar diabetes y padecimientos relacionados, como dislipidemias, han sido probadas para evaluar su efecto farmacológico agudo o crónico sobre diferentes parámetros metabólicos, proteínas y enzimas relacionadas a la generación de hiperglucemia en DM2 (Tabla 4). Los extractos evaluados de estas especies han sido capaces de disminuir los niveles de glucosa sanguínea y de mejorar el perfil lipídico *in vivo* en modelos murinos de hiperglucemia inducida por estreptozotocina (STZ) o aloxano, así como en modelos hipercolesterolémicos y de RI inducida por dieta alta en grasa y fructosa.

Algunas especies, como *E. bornmuelleri*, *E. caeruleum*, *E. foetidum*, *E. maritimum* y *E. planum*, poseen un efecto inhibitorio sobre la actividad de enzimas involucradas en la hidrólisis de carbohidratos de la dieta, como α -glucosidasas, mientras que la especie mexicana *E. longifolium* tiene la capacidad de disminuir la producción endógena de glucosa, ya que inhibe a las enzimas gluconeogénicas G6Pasa y FBPasa. Por otro lado, se ha reportado que *E. creticum* es capaz de incrementar la secreción de insulina y de promover la proliferación de células β *in vitro*.

Tabla 4. Antecedentes farmacológicos relacionados a diabetes de distintas especies del género *Eryngium*.

Especie (región donde se utiliza)	Tipo de extracto (parte usada)	Compuestos identificados	Experimento/Resultado	Referencia
<i>E. billardieri</i> Delile (Irán)	Etanólico (raíces)	-	In vivo: ratas hiperglucémicas (100, 200 y 400 mg/kg de peso p.o. por 28 días)/↓glucosa sanguínea, ↑insulina sérica, ↑HOMA- β , ↓colesterol total, ↑HDL, ↓LDL, ↓VLDL, ↓triglicéridos, ↓índice aterogénico, ↓depósitos de grasa en hígado, ↓células necróticas y degenerativas en páncreas	Khani et al., 2021
<i>E. bornmuelleri</i> Nábëlek (Turquía)	Acuoso, acetónico, etanólico (hojas)	Ácido hidroxibenzóico- <i>O</i> - hexósido Ácido clorogénico Kaempferol/luteolina rutinósido Rutina	In vitro: ensayo enzimático/↓actividad de α -glucosidasas (IC ₅₀ = 19.12, 10.4, 8.47 μ g/ml), ↓actividad de α -amilasas (IC ₅₀ = 19.4, 9.6, 8.3 μ g/ml), ↓actividad de lipasa pancreática (IC ₅₀ = 6.48, 5.01, 5.92 μ g/ml)	Dalar et al., 2014

HOMA- β : modelo homeostático para evaluar la función de las células β pancreáticas; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Tabla 4. (cont.)

Especie (región donde se utiliza)	Tipo de extracto (parte usada)	Compuestos identificados	Experimento/Resultado	Referencia
<i>E. caeruleum</i> M.Bieb. (Medio Oriente)	Hexánico, acetato de etilo, metanólico (parte aérea)	-	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α-amilasas (IC ₅₀ = 9.6, 11.9, 15.9 µg/ml)	Dehghan et al., 2016
	Etanólico (hojas)	-	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (100, 200 y 300 mg/kg de peso p.o. por 30 días)/↓glucosa sanguínea, ↑insulina sérica, ↓HOMA-IR, ↓colesterol total, ↓LDL, ↓triglicéridos	Afshari et al., 2019
	Metanólico: fracción extraída con cloroformo (parte aérea)	Triacantano Tocoferol 2,5-Pirrolidiona N-[2-(tienil)acetiloxil] Palmitato de metilo Ciclohexeno 3- (1,5-dimetil-4-hexenil)-6-metileno Fitol Neofitadieno Timol Falcarinol Ácido linolénico	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α-glucosidasas (IC ₅₀ = 437 µg/ml) <i>In vivo</i> : ratones hiperglucémicos (31.25, 62.5 y 125 µg/kg de peso i.p.)/↓glucosa sanguínea después de 24 h	Sadiq et al., 2020
<i>E. carlinae</i> F.Delaroche (México)	Acuoso (flores)	Ácido protocatecuico Ácido cafeico Ácido elágico Procianidina B1 Catequina Rutina Epicatequina β-Sitoesterol Δ ⁷ -Estigmasterol Campesteril β-D-glucopiranosido Sitosteril β-D-glucopiranosido	<i>In vivo</i> : ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa (extracto disuelto en agua de bebida por 6 meses)/↓peso corporal, ↓glucosa sanguínea, ↓insulina sérica, ↓AGL, ↓triglicéridos, ↓proteínas relacionadas a inflamación	Pérez-Ramírez et al., 2016
	Etanólico (parte aérea)	-	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (30 mg/kg de peso p.o. por 40 días)/↓colesterol total, ↓triglicéridos	Noriega-Cisneros et al., 2012
		Hexa- <i>O</i> -acetil-D-manitol D-manitol	<i>In vivo</i> : ratones hipercolesterolémicos (extracto: 100 y 500 mg/kg de peso p.o.; compuestos: 10 mg/kg de peso p.o. por 4 semanas)/↓colesterol total, ↑HDL, ↓no HDL, ↑expresión de Abcg5 y Abcg8	Castro-Torres et al., 2017

HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina. AGL: ácidos grasos libres; HDL: lipoproteínas de alta densidad; Abcg5: miembro 5 de la subfamilia G del casete de unión a ATP; Abcg8: miembro 8 de la subfamilia G del casete de unión a ATP.

Tabla 4. (cont.)

Especie (región donde se utiliza)	Tipo de extracto (parte usada)	Compuestos identificados	Experimento/Resultado	Referencia
<i>E. carlinae</i> F.Delaroche (México)	Etanólico (parte aérea)	β -Selineno α -Selineno Ácido palmítico Ácido esteárico	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (30 mg/kg de peso p.o. por 40 días)/↓consumo de alimento, ↓colesterol total, ↓triglicéridos, ↑HDL, ↓no HDL, ↓índice aterogénico	Noriega-Cisneros et al., 2020
	Hexánico (inflorescencias)	-	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (30 mg/kg de peso p.o. por 7 semanas)/↓glucosa sanguínea, ↓triglicéridos	García-Cerrillo et al., 2018
		β -Pinenos (Z)- β -Farneseno α -Farneseno Calameneno	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (30 mg/kg de peso p.o. por 7 semanas)/↓glucosa sanguínea	Peña-Montes et al., 2019
<i>E. creticum</i> Lam. (Mediterráneo Oriental)	Acuoso (raíces)	-	<i>In vivo</i> : ratas normoglucémicas e hiperglucémicas (extracto disuelto en agua de bebida)/↓glucosa sanguínea después de 24 h	Jaghabir, 1991
	Acuoso (parte aérea)	-	<i>In vivo</i> : ratas normoglucémicas (500 mg/kg de peso p.o.)/efecto antihiperglucémico en pruebas de tolerancia a almidón oral	Kasabri et al., 2011
		-	<i>In vitro</i> : línea celular MIN6/↑secreción de insulina estimulada por glucosa, ↑proliferación de células β	Kasabri et al., 2012
<i>E. foetidum</i> L. (América Tropical Asia del sur África Tropical Partes cálidas de Europa)	Metanólico, etanólico y acuoso (hojas)	-	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α -amilasas (46.02%, 52.2%, 30.12% de inhibición)	Malik et al., 2016
	Metanólico (hojas)	-	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α -glucosidasas (IC ₅₀ = 312.4 μ g/ml), ↓actividad de α -amilasas (IC ₅₀ = 88.64 μ g/ml)	Manjunatha et al., 2019
<i>E. heterophyllum</i> Engelm. (México)	Acuoso (parte aérea)	-	<i>In vitro</i> : línea celular Vero/inhibición de HMG-CoA reductasa <i>In vivo</i> : ratones hipercolesterolémicos (100 mg/kg de peso por 5 días)/↓colesterol	Miranda-Velásquez, 2010
	Etanólico (planta entera)	-	<i>In vivo</i> : ratones hipercolesterolémicos (100 mg/kg de peso p.o.)/↓colesterol total, ↓triglicéridos	Almonte-Flores, 2015

HDL: lipoproteínas de alta densidad; HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A.

Tabla 4. (cont.)

Especie (región donde se utiliza)	Tipo de extracto (parte usada)	Compuestos identificados	Experimento/Resultado	Referencia
<i>E. longifolium</i> Cav. (México)	Etanólico (parte aérea)	-	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de G6Pasa (IC ₅₀ = 780 µg/ml), ↓actividad de FBPasa (IC ₅₀ = 93 µg/ml) <i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (32 y 318 mg/kg de peso p.o.)/↓glucosa sanguínea	Andrade-Cetto et al., 2021
<i>E. maritimum</i> L. (Mediterráneo)	Etanólicos (raíces, tallos, hojas y flores)	Ácido gálico Ácido vanílico Ácido clorogénico Ácido <i>trans</i> -felúrico Ácido <i>o</i> -cumárico Ácido <i>trans</i> -cinámico Catequina Epicatequina Rutina Naringenina Ácido 2,3-dimetoxibenzóico Carvacrol	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α-glucosidasas (IC ₅₀ = 29, 52.1, 50.8, 55 µg/ml), ↓actividad de α-amilasas (IC ₅₀ = 23.9, 66.8, 58.2, 66.5 µg/ml)	Pereira et al., 2019
<i>E. planum</i> L. (Europa y Asia)	Etanólico sometido a microfiltración y nanofiltración (parte aérea)	Rutina Isoquercetina Ácido rosmarínico Ácido clorogénico	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático/↓actividad de α-glucosidasas (IC ₅₀ = 24.99, 5.94 µg/ml), ↓actividad de α-amilasas (IC ₅₀ = 10.72, 8.27 µg/ml)	Paun et al., 2019
<i>E. thyrsoideum</i> Boiss. (Irán)	Acuoso en nanopartículas (parte aérea)	-	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (2.5 mg/kg de peso i.p. por 14 días)/↓glucosa sanguínea, ↓peso corporal	Mahmoudi et al., 2020
		-	<i>In vivo</i> : ratas hiperglucémicas (2.5 mg/kg de peso i.p. por 14 días)/↓glucosa sanguínea, ↑insulina sérica, ↓expresión de IL-6 y TNF-α en tejido adiposo blanco	Mahmoudi et al., 2021

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa; IL-6: interleucina 6; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa.

3 Planteamiento del problema

En la actualidad, la DM2 representa un problema de salud mundial debido al alarmante crecimiento en su prevalencia como consecuencia del incremento en el consumo de comida energéticamente densa y al estilo de vida sedentario. Debido a sus creencias y costumbres, los pacientes diabéticos de las comunidades en países en vías de desarrollo suelen consumir plantas para tratar los niveles elevados de glucosa que caracterizan la enfermedad de manera exclusiva o paralela a los fármacos hipoglucemiantes.

Tomando en consideración la continua búsqueda de moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos con mayor capacidad para controlar la hiperglucemia a largo plazo y con menor número de efectos adversos, los productos naturales provenientes de plantas medicinales resultan ser una fuente promisoría de compuestos hipoglucemiantes debido a sus características fisicoquímicas únicas. Por otro lado, los fitoquímicos presentes en los extractos de plantas medicinales pueden presentar mejores efectos terapéuticos en enfermedades metabólicas de etiología compleja como la DM2, ya que la mezcla de compuestos puede conducir a efectos sinérgicos que promuevan la activación o inhibición de distintos blancos farmacológicos y, de esta manera, se contrarreste la hiperglucemia a través de diferentes vías.

El presente trabajo propone un nuevo enfoque para la caracterización del mecanismo hipoglucemiante de plantas medicinales tomando en cuenta los aspectos etnofarmacológicos relacionados a su consumo y preparación en las comunidades. Se toma como ejemplo a *E. cymosum*, la cual se ha identificado como remedio recurrente para el tratamiento de DM2 desde 1994 por pacientes diabéticos de los municipios Tlanchinol y Huejutla del estado de Hidalgo. Dicha especie es preparada como decocción para su consumo a lo largo del día como “agua de uso”, es decir, es consumida tanto en ayuno como en estado posprandial, por lo que su efecto terapéutico podría estar relacionado con alguno de los mecanismos que participan en la generación de hiperglucemia en ambos estados metabólicos.

Se ha reportado que la producción de glucosa *de novo* por parte del hígado se encuentra dañada en pacientes con DM2, incrementando la concentración de este monosacárido en sangre principalmente en estado de ayuno. Tras la ingesta de alimentos, esta vía no es completamente inhibida a causa de la RI que presenta el hígado, por lo que los niveles de glucosa se elevan más allá del umbral fisiológico debido a la suma de ambas fuentes de glucosa: la interna, producto de la liberación hepática, y la externa, proveniente de la hidrólisis de carbohidratos complejos con alto índice glucémico de la dieta, los cuales son absorbidos en sus formas más simples en el intestino, generando hiperglucemia posprandial.

Tanto la gluconeogénesis, como la hidrólisis intestinal de carbohidratos representan excelentes blancos terapéuticos para el tratamiento de DM2 ya que son las principales fuentes de hiperglucemia en

ayuno y en estado posprandial. Debido a esto y a que la decocción de *E. cymosum* es consumida en ambos estados, la pregunta de investigación que surge es si el extracto tradicional de esta especie mexicana es capaz de controlar la hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial a través de la inhibición de la gluconeogénesis, específicamente disminuyendo la actividad de dos de las enzimas paso-limitantes que participan en la gluconeogénesis, y de la inhibición de hidrólisis de carbohidratos por las enzimas intestinales α -glucosidasas. Además de estos mecanismos, es importante determinar el efecto del extracto tradicional de *E. cymosum* sobre la insulina, ya que esta hormona juega un papel crucial en la homeostasis de la glucosa, controlando la producción y el almacenamiento de este monosacárido.

Se espera que los resultados obtenidos en este trabajo constituyan la base para la elucidación de los mecanismos que participan en el efecto hipoglucemiante de *E. cymosum*, estableciendo los cimientos para la caracterización del mecanismo hipoglucemiante de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de DM2 consumidas como “agua de uso”.

4 Objetivos

General:

Determinar la contribución del mecanismo hipoglucemiante de *Eryngium cymosum* en distintas vías relacionadas a la generación de hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial.

Particulares:

1. Comprobar el efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de la parte aérea de *E. cymosum* en ratas hiperglucémicas STZ-NA.
2. Evaluar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la gluconeogénesis hepática *in vivo* por medio de pruebas de tolerancia a piruvato en ratas hiperglucémicas STZ-NA, e *in vitro* en ensayos de inhibición de las enzimas gluconeogénicas G6Pasa y FBPasa.
3. Caracterizar el impacto del extracto de *E. cymosum* sobre la hiperglucemia posprandial y la hidrólisis de carbohidratos *in vivo* por medio de pruebas de tolerancia a la maltosa en ratas hiperglucémicas STZ-NA, e *in vitro* en ensayos de inhibición de enzimas α -glucosidasas.
4. Estudiar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la secreción basal y estimulada de insulina en ayuno y en estado posprandial, respectivamente, en ratas normoglucémicas.

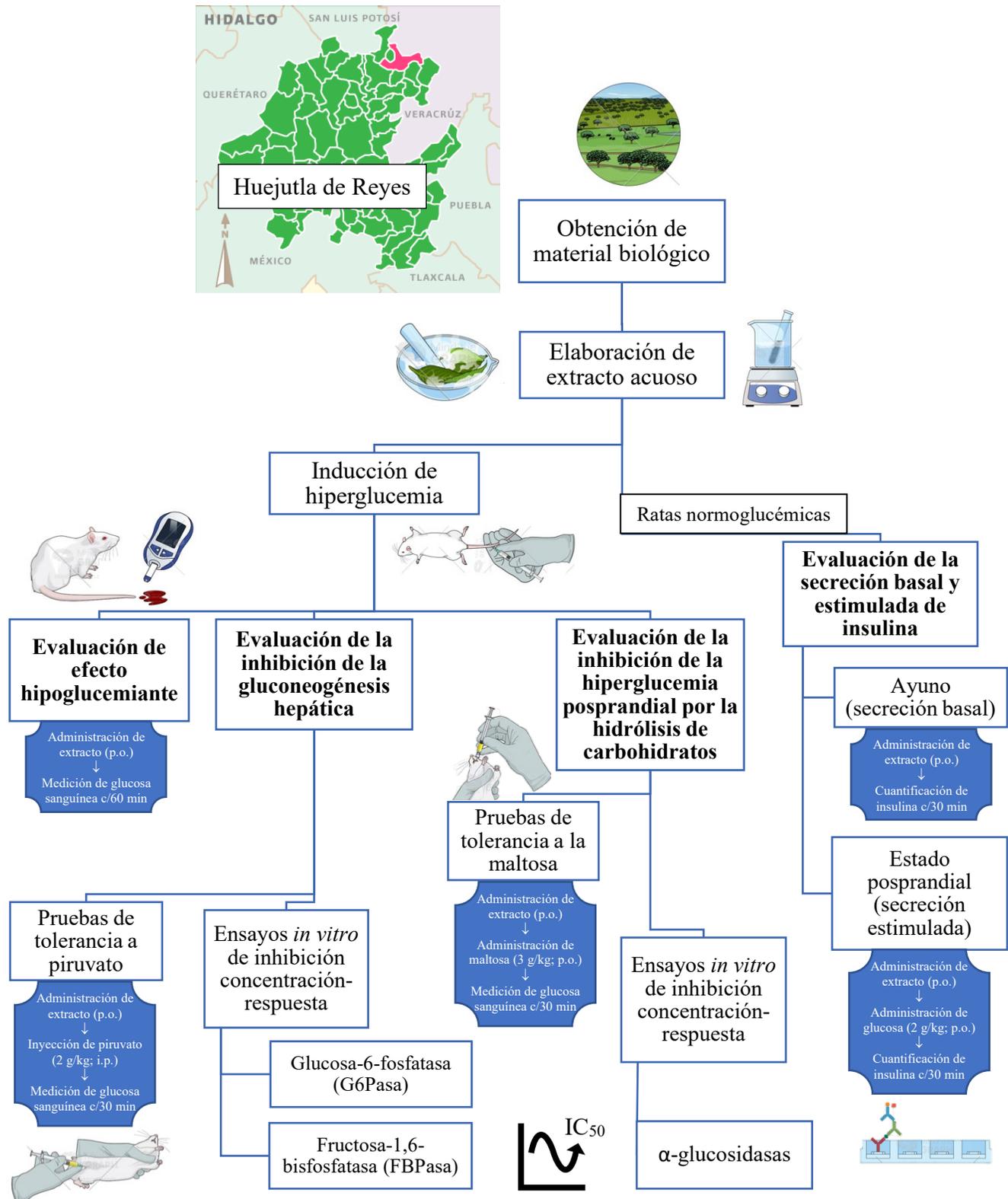
5 Hipótesis

El extracto acuoso de *E. cymosum*:

1. Disminuye la glucosa sanguínea de una manera dosis-dependiente en una curva de glucosa 3 horas.
2. Disminuye el pico hiperglucémico en las pruebas de tolerancia a piruvato manteniendo un efecto antihiperglucémico sostenido, e inhibe a las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis G6Pasa y FBPasa en los ensayos *in vitro*.
3. Evita el pico posprandial en las pruebas de tolerancia a la maltosa e inhibe las enzimas α -glucosidasas en los ensayos *in vitro*.
4. Disminuye los niveles de glucosa sanguínea, tanto en ayuno como en estado posprandial, aumentando la concentración de insulina.

6 Métodos

6.1 Diseño experimental general



6.2 Obtención del material biológico

Se entrevistó a comerciantes del mercado de Huejutla con la finalidad de localizar la zona de donde se colecta normalmente la “piñuela” para su posterior venta. El área se ubicó en el límite de la zona urbana de la cabecera municipal de Huejutla, en el sendero del río Tecacalax ubicado en un potrero junto a la Colonia 1ero de Mayo (21°07'35" Lat N, 98°26'53" Long O). Estando presentes, se realizó la colecta de la parte aérea de la “piñuela” por un poblador de la zona, José Humberto Flores Flores, en el mes de junio de los años 2017 y 2019 (**Figura 16**). La identificación taxonómica fue realizada posteriormente en la Facultad de Ciencias, UNAM por el Dr. Jaime Jiménez Ramírez. Finalmente, el material colectado se colocó en una cámara de secado a 40°C durante una semana y, posteriormente, se cortó y molió.

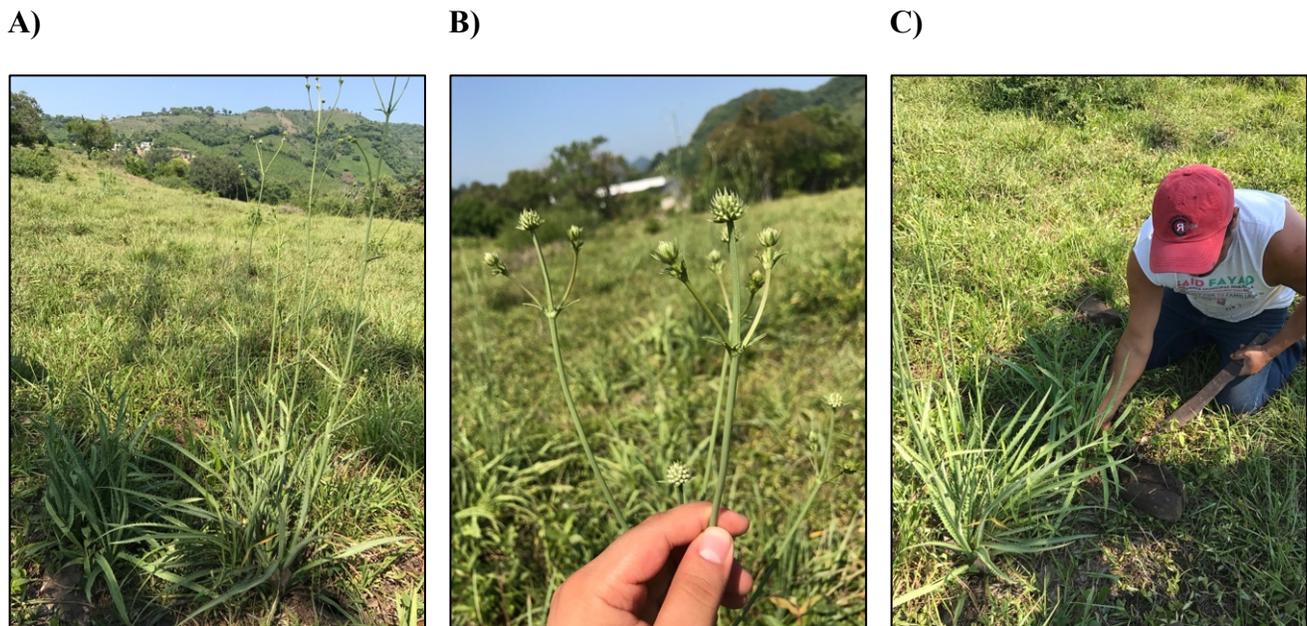


Figura 16. Colecta de la parte aérea de *E. cymosum*.

A) Ejemplar *in situ*. **B)** Inflorescencias. **C)** Proceso de colecta. Fotografías tomadas por Espinoza-Hernández, F. A. en el sitio de colecta (junio, 2017).

6.3 Elaboración de extracto acuoso

Se pesaron 20 g de la parte aérea molida de la planta (equivalente a un puño de planta utilizado para elaborar la decocción de manera tradicional) y se colocaron en 500 ml de agua destilada en ebullición. La mezcla fue retirada de la parrilla y se mantuvo en agitación durante 15 min; posteriormente, se filtró a vacío. El filtrado se pasó en un cristizador y se envolvió con una película de plástico para refrigerarlo a una temperatura de -40°C por 24 horas en un ultracongelador Revco™. El extracto seco se obtuvo eliminando el agua en la liofilizadora FreeZone®, el cual se pesó para calcular el rendimiento a partir de los 20 g iniciales de planta.

6.4 Consideraciones bioéticas, animales experimentales y obtención de muestras

Todos los procedimientos sobre el uso y manejo de animales de laboratorio del presente proyecto se apegaron a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo de bioética fue aprobado por el subcomité de Bioética de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica (CEARC) de la Facultad de Ciencias, UNAM con el número de folio T_2019_09_005 (ver *Anexo 11.1*).

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de dos meses de edad (peso aproximado de 250 g) proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Todos los organismos se mantuvieron con fotoperiodos de 12h/12h de luz/oscuridad, teniendo libre acceso a agua y alimento de mantenimiento Nutricubos de Purina® (ver *Anexo 11.2*). Las muestras de sangre utilizadas para la medición de parámetros metabólicos fueron obtenidas de la vena caudal de los animales. Por otro lado, los niveles de glucosa fueron analizados con tiras y medidores Accu-Chek® Active.

6.5 Cálculo de dosis para experimentos *in vivo*

Se obtuvieron 3299 mg de extracto seco a partir de los 20 g iniciales de planta. La dosis de uso tradicional fue calculada a partir de este rendimiento obtenido, partiendo del hecho de que una persona con un peso corporal promedio de 70 kg utiliza un puñado (20 g) de la parte aérea de la planta para preparar la decocción en medio litro de agua y que toma como “agua de uso”:

$$Dosis\ tradicional = \frac{mg\ de\ extracto}{kg\ de\ peso\ corporal} = \frac{3299\ mg}{70\ kg} = 47\ mg/kg$$

6.6 Modelo animal de hiperglucemia inducida STZ-NA para pruebas biológicas

Se utilizó el modelo de hiperglucemia inducida por estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA) desarrollado por Masiello y colaboradores (1998), el cual, si bien no tiene RI, presenta una hiperglucemia estable y moderada, una reducción moderada de células β y reservas de insulina, intolerancia a la glucosa, secreción de insulina estimulada por glucosa disminuida, capacidad de respuesta a secretagogos de insulina y los síntomas clásicos de la diabetes (polifagia, poliuria y polidipsia) (Ghasemi et al., 2014). Debido a su capacidad de respuesta a fármacos hipoglucemiantes, la hiperglucemia generada en los modelos con STZ es abatida ligera o completamente por la administración de extractos de plantas o productos naturales, lo cual permite la evaluación de su potencial efecto hipoglucemiante (Eddouks et al., 2012).

La inducción de hiperglucemia se llevó a cabo en ratas con un ayuno previo de 12 h (**Figura 17**). Las ratas fueron inyectadas con NA (Sigma-Aldrich N0636) a 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 (Sigma-Aldrich S0130) a una dosis de 65 mg/kg (i.v.), disuelta en 1 ml de buffer de acetatos a pH 4.5 (0.9% de acetato de sodio en 105 mM de ácido acético) por kg de peso.

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante y la hiperglucemia posprandial, se eligieron aquellos organismos que presentaron valores en un rango de 180 a 200 mg/dl de glucemia, con 2 h de ayuno, transcurrida una semana de la inducción, mientras que para las pruebas de tolerancia a piruvato se seleccionaron organismos con una glucemia mayor a 300 mg/dl, con 2 h de ayuno, para que, en un ayuno prolongado de 18 h, presentaran valores de 180 a 200 mg/dl.

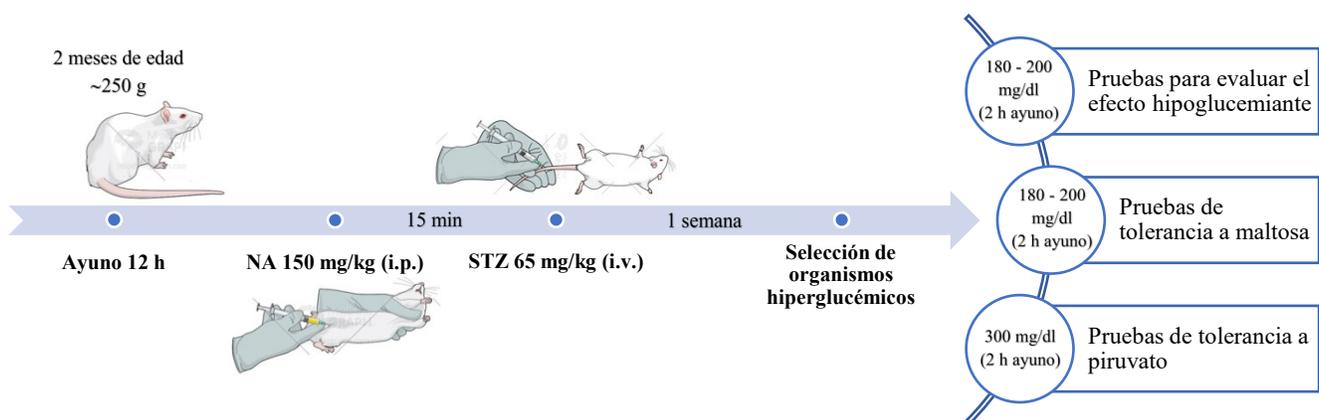


Figura 17. Inducción química de hiperglucemia con estreptozotocina y nicotinamida en ratas Wistar.

NA: nicotinamida; STZ: estreptozotocina.

6.7 Diseños experimentales *in vivo*

6.7.1 Evaluación de efecto hipoglucemiante agudo

Con la finalidad de evaluar la capacidad de disminuir los niveles de glucosa del extracto acuoso de *E. cymosum* y una posible relación de dosis dependencia, se realizó el seguimiento de este parámetro en curvas de glucosa de 3 h (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013). Para alcanzar este objetivo, se utilizaron 30 ratas Wistar que se dividieron en cinco grupos experimentales ($n = 6$): un control normoglucémico (el cual se utilizó como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia); un control hiperglucémico negativo, al cual se le administró solución fisiológica; un grupo hiperglucémico positivo, al que se le administró el fármaco glibenclamida (Euglucon®); un grupo experimental hiperglucémico, al cual se le dio el extracto acuoso de *E. cymosum* a dosis tradicional; y otro grupo experimental hiperglucémico, al cual se le administró el extracto a una dosis tradicional elevada que simula el consumo acumulado de la infusión en un día (**Tabla 5**).

Tabla 5. Grupos experimentales y tratamientos para las curvas de glucosa con una duración de 3 h.

Grupo ($n = 6$)	Tratamiento
	Administración vía oral
Control normoglucémico (N)*	Solución fisiológica
Control hiperglucémico negativo (H)	
Control hiperglucémico positivo (HG)	Glibenclamida (5 mg/kg)
Grupo experimental hiperglucémico 1 (HE ⁴⁷)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (47 mg/kg)
Grupo experimental hiperglucémico 2 (HE ⁴⁷⁰)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (470 mg/kg)

*Se empleó un grupo normoglucémico que sirvió como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia.

En primer lugar, se midió la glucosa sanguínea basal por duplicado. Inmediatamente después, se administró por vía oral la solución fisiológica, la glibenclamida o el extracto. Las mediciones de glucosa sanguínea se realizaron por duplicado a los 60, 120 y 180 min tras la administración de los tratamientos (**Figura 18**). De acuerdo con los resultados obtenidos (ver **sección 7.1**), para los siguientes experimentos *in vivo*, se utilizó la dosis tradicional elevada (470 mg/kg) para simular el efecto total de varias tomas de la infusión a lo largo del día, es decir, como es consumida tradicionalmente (agua de uso).

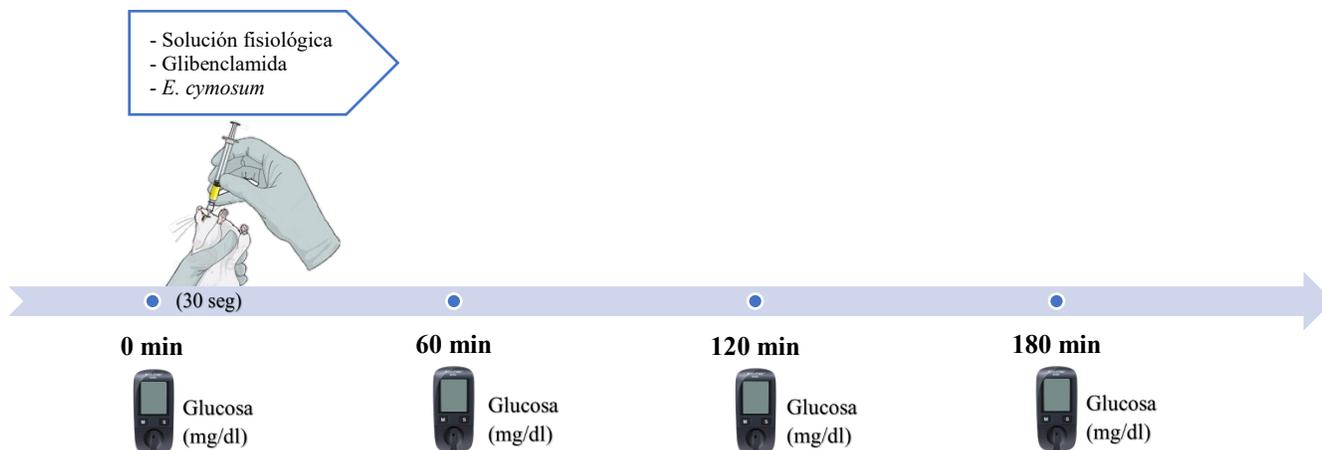


Figura 18. Diseño experimental para las curvas de glucosa con una duración de 3 h.

6.7.2 Evaluación de la inhibición de gluconeogénesis hepática

Dado que la gluconeogénesis es la fuente principal de hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial en pacientes con DM2, se evaluó el efecto del extracto sobre dicha vía realizando pruebas de tolerancia a piruvato (Mata-Torres et al., 2020). Para este objetivo se emplearon 24 ratas Wistar que fueron divididas en cuatro grupos experimentales ($n = 6$): un control normoglucémico (el cual se utilizó como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia y para determinar el efecto del piruvato sobre la glucosa sanguínea en un estado sano); un control hiperglucémico negativo, al cual se le administró solución fisiológica; un grupo hiperglucémico positivo, al que se le administró el fármaco metformina (Aurax®); y el grupo experimental hiperglucémico, al cual se le dio el extracto acuoso de *E. cymosum* a la dosis tradicional elevada (Tabla 6).

Tabla 6. Grupos experimentales y tratamientos para las pruebas de tolerancia a piruvato.

Grupo ($n = 6$)	Tratamiento	
	Administración vía oral	Administración i.p.
Control normoglucémico (N)*	Solución fisiológica	
Control hiperglucémico negativo (H)	Piruvato (2 g/kg)	
Control hiperglucémico positivo (HM)	Metformina (500 mg/kg)	
Grupo experimental hiperglucémico (HE ⁴⁷⁰)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (470 mg/kg)	

*Se empleó un grupo normoglucémico que sirvió como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia.

El procedimiento que se realizó fue el siguiente: primero, se midió la glucosa sanguínea basal por duplicado; inmediatamente después, se administró por vía oral la solución fisiológica, la metformina o el extracto y, 15 min después, se dio una carga de piruvato de sodio a una dosis de 2 g/kg vía intraperitoneal. Las mediciones de glucosa sanguínea se realizaron por duplicado a los 30, 60, 90 y 120 min tras la administración de piruvato (**Figura 19**).

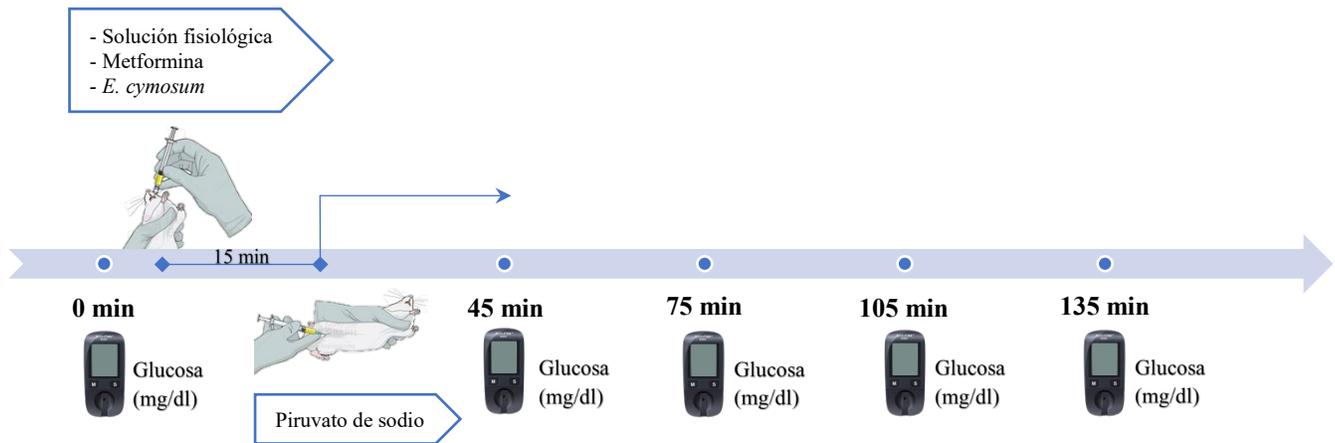


Figura 19. Diseño experimental para las pruebas de tolerancia a piruvato.

6.7.3 Evaluación de la inhibición de hiperglucemia posprandial por la hidrólisis de carbohidratos

El consumo de carbohidratos con alto índice glucémico es una de las principales fuentes de hiperglucemia posprandial que se presenta en la DM2 por lo que, con el propósito de evaluar la repercusión del extracto de *E. cymosum* sobre dicho mecanismo, se realizaron pruebas de tolerancia a la maltosa (Andrade-Cetto et al., 2019). Se utilizaron 24 ratas Wistar que se dividieron en cuatro grupos experimentales ($n = 6$): un control normoglucémico (el cual se utilizó como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia y para determinar el efecto de la maltosa sobre la glucosa sanguínea en un estado sano); un control hiperglucémico negativo, al cual se le administró solución fisiológica; un grupo hiperglucémico positivo, al que se le administró el fármaco acarbosa (Glucobay®); y el grupo experimental hiperglucémico, al cual se le dio el extracto acuoso de *E. cymosum* a la dosis tradicional elevada (**Tabla 7**).

Tabla 7. Grupos experimentales y tratamientos para las pruebas de tolerancia a maltosa.

Grupo (<i>n</i> = 6)	Tratamiento	
	1era administración	2a administración
Control normoglucémico (N)*	Solución fisiológica	
Control hiperglucémico negativo (H)	Solución fisiológica	
Control hiperglucémico positivo (HA)	Acarbosa (3 mg/kg)	Maltosa (3 g/kg)
Grupo experimental hiperglucémico (HE ⁴⁷⁰)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (470 mg/kg)	Maltosa (3 g/kg)

*Se empleó un grupo normoglucémico que sirvió como control para evaluar la efectividad de la inducción de hiperglucemia.

Primeramente, se midió la glucosa sanguínea basal por duplicado para, inmediatamente después, administrar la solución fisiológica, la acarbosa o el extracto vía oral. Transcurridos cinco minutos de esta primera administración, se dio una carga de maltosa a una dosis de 3 g/kg vía oral. Se realizaron mediciones por duplicado a los 30, 60 y 90 min tras la administración de maltosa (**Figura 20**).

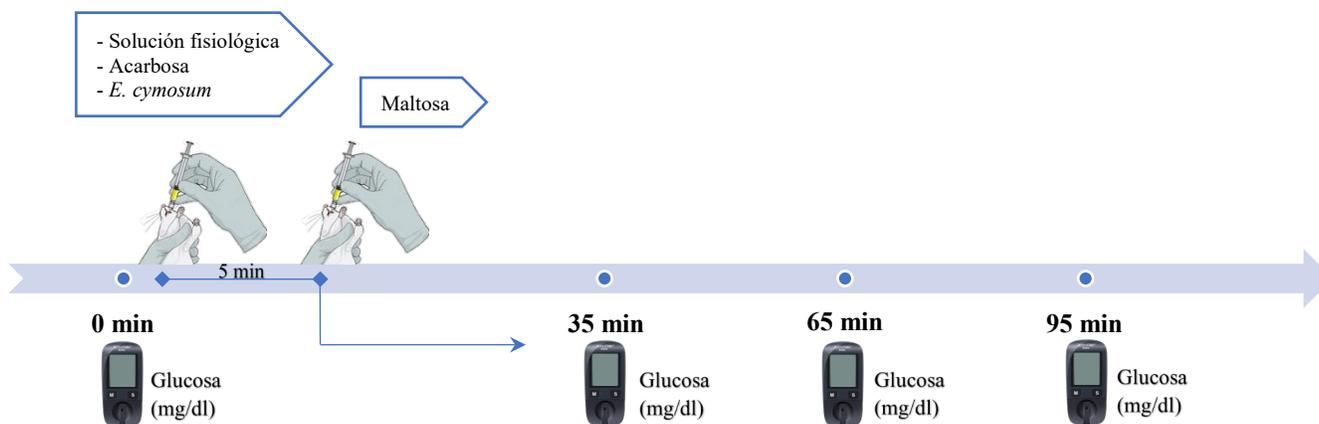


Figura 20. Diseño experimental para las pruebas de tolerancia a maltosa.

6.7.4 Evaluación de la secreción basal y estimulada de insulina en ayuno y estado posprandial

Tanto en ayuno como en estado posprandial, la insulina juega un papel esencial en el control de la homeostasis de la glucosa, por lo que, con la finalidad de determinar si el efecto hipoglucemiante del extracto de *E. cymosum* está relacionado con la liberación de la insulina, se cuantificó este parámetro en organismos sanos en ayuno y en estado posprandial.

Para determinar el efecto del extracto sobre las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (secreción basal de insulina), se realizó el seguimiento de ambos parámetros durante 2 h después de la administración vía oral de los tratamientos. Brevemente, a 15 ratas Wistar, con un ayuno previo de 12 h, se les midió la glucosa basal por duplicado y se les extrajo una muestra de sangre de la vena caudal para la posterior cuantificación de insulina. Inmediatamente después, se les administró la solución fisiológica, la glibenclamida o el extracto (**Tabla 8**). Finalmente, se realizó el seguimiento de glucosa sanguínea por duplicado y se les extrajo sangre para la posterior determinación de insulina en los tiempos 30, 60, 90 y 120 min tras la administración de los tratamientos (**Figura 21**).

La sangre extraída se centrifugó a 10 000 g por 10 min. El plasma obtenido fue guardado a -40°C para la posterior cuantificación de insulina mediante un kit comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para insulina de rata/ratón (Sigma-Aldrich EZRMI-13K).

Tabla 8. Grupos experimentales y tratamientos para determinar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la concentración de insulina plasmática en ayuno.

Grupo (<i>n</i> = 5)	Tratamiento
	Administración vía oral
Control negativo (C)	Solución fisiológica
Control positivo (G)	Glibenclamida (Euglucon®, 5 mg/kg)
Grupo experimental (E)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (470 mg/kg)

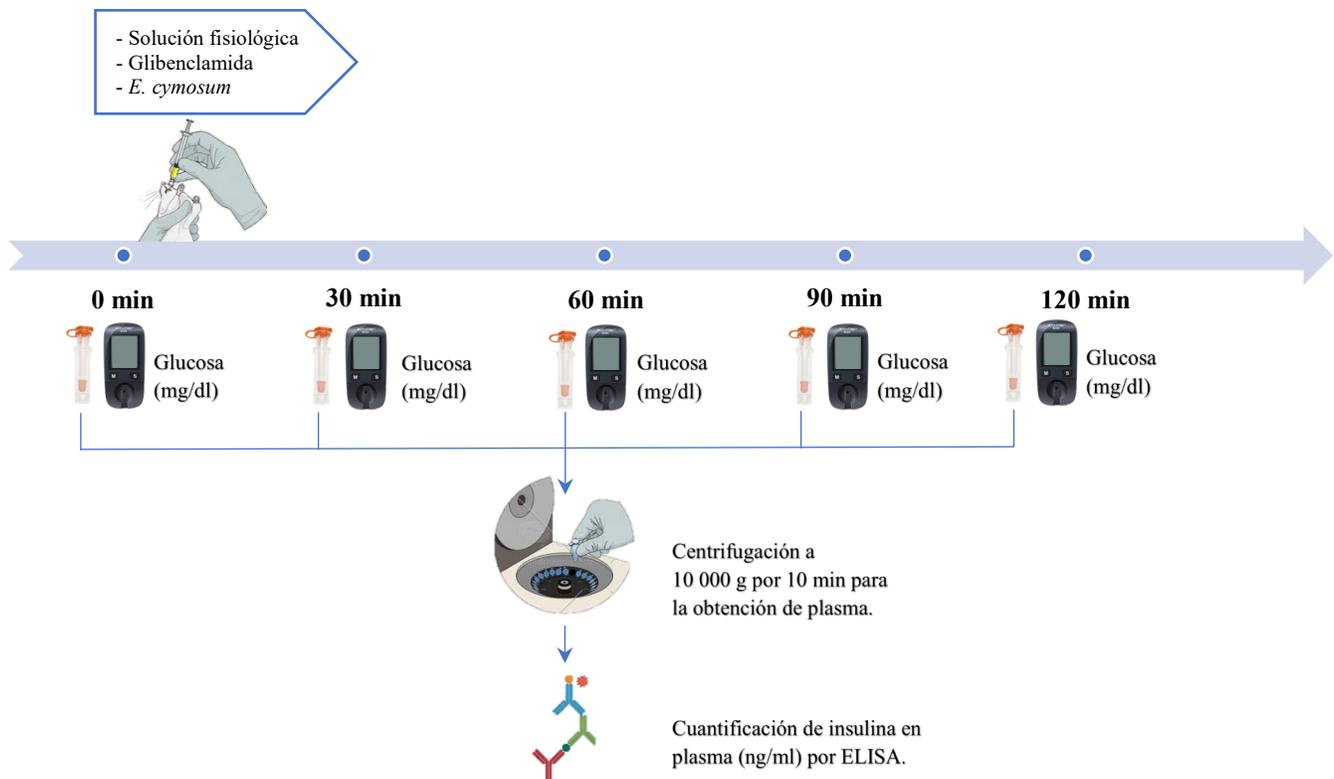


Figura 21. Diseño experimental para determinar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la concentración de insulina plasmática en ayuno.

Para determinar el efecto del extracto sobre las concentraciones de glucosa e insulina en estado posprandial (secreción estimulada de insulina), se realizó el seguimiento de ambos parámetros durante 2 h después de la administración vía oral de los tratamientos y una carga de glucosa oral. En breve, a 15 ratas Wistar, con un ayuno previo de 12 h, se les midió la glucosa basal por duplicado y se les extrajo una muestra de sangre de la vena caudal para la posterior cuantificación de insulina. Inmediatamente después, se les administró solución fisiológica, repaglinida o el extracto (**Tabla 9**). Cinco minutos después, se dio una carga de glucosa oral y, finalmente, se realizó el seguimiento de glucosa sanguínea por duplicado y se les extrajo sangre para la posterior determinación de insulina en los tiempos 30, 60, 90 y 120 min tras la administración de glucosa (**Figura 22**).

Tabla 9. Grupos experimentales y tratamientos para determinar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la concentración de insulina plasmática en estado posprandial.

Grupo (<i>n</i> = 5)	Tratamiento	
	1era administración vía oral	2a administración vía oral
Control negativo (C)	Solución fisiológica	
Control positivo (R)	Repaglinida (Prandin®, 1 mg/kg)	Glucosa (2 g/kg)
Grupo experimental (E)	Extracto acuoso de <i>E. cymosum</i> (470 mg/kg)	

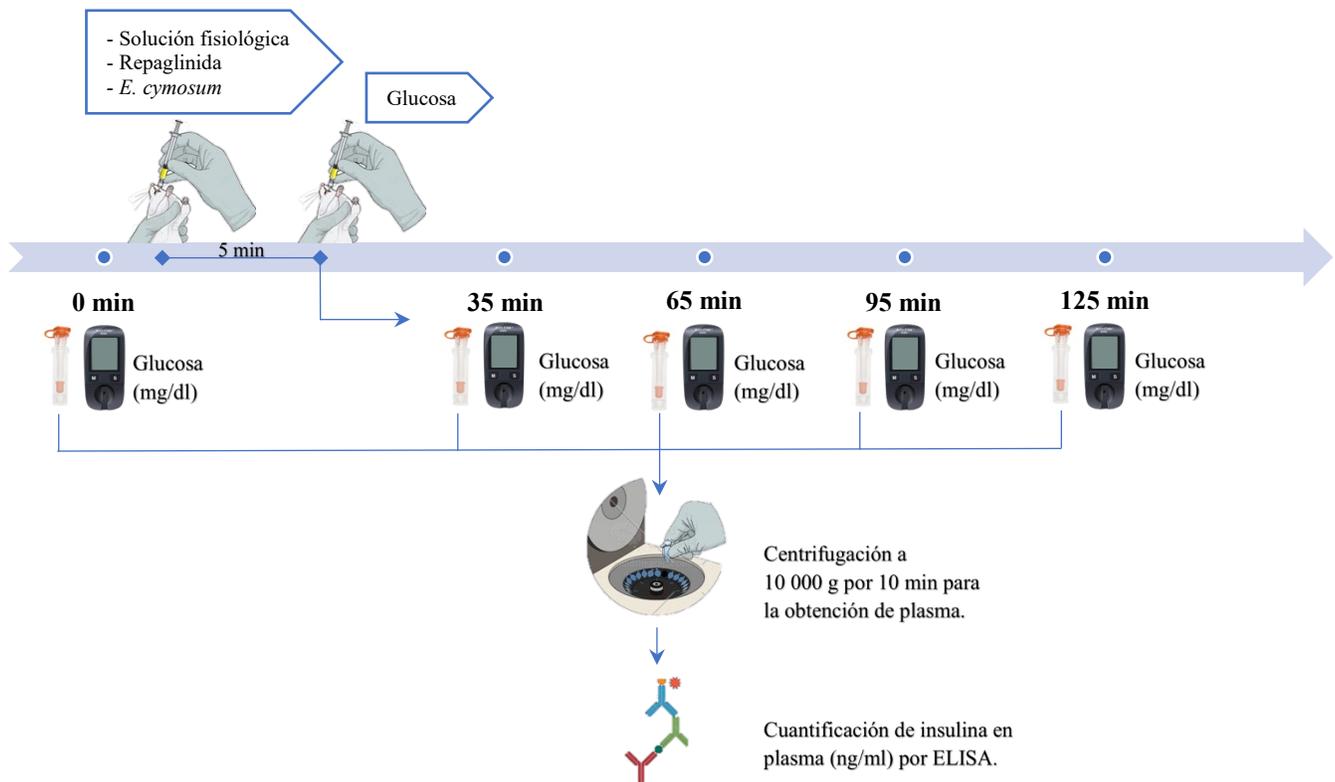


Figura 22. Diseño experimental para determinar el efecto del extracto de *E. cymosum* sobre la concentración de insulina plasmática en estado posprandial.

6.7.5 Estimación de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa implica las funciones simultáneas y coordinadas de las células β pancreáticas, el hígado y los tejidos periféricos. Con la finalidad de cuantificar si el extracto es capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina, se calculó el índice del control cuantitativo de la sensibilidad a la insulina (QUICKI) (Patarrão et al., 2014), el cual brinda una estimación de la función de la insulina hepática y de las células β en estado de ayuno:

$$QUICKI = \frac{1}{\log \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{ml}} \right) + \log \text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}$$

Por otro lado, se calculó el índice de sensibilidad a la insulina (ISI) o índice Matsuda, que refleja una estimación compuesta de la sensibilidad a la insulina hepática y muscular durante una PTGO (Matsuda & DeFronzo, 1999; Monzillo & Hamdy, 2003):

$$ISI = \frac{10000}{\sqrt{(\text{glucosa}_{T0} \times \text{insulina}_{T0}) \times (\text{glucosa}_{PTGO} \times \text{insulina}_{PTGO})}}$$

Donde, **glucosa_{T0}** es la concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) en el T0 de la PTGO, **insulina_{T0}** es la concentración de insulina plasmática ($\mu\text{U}/\text{ml}$) en el T0 de la PTGO, **glucosa_{PTGO}** es el promedio de las concentraciones de glucosa sanguínea (mg/dl) durante la PTGO, e **insulina_{PTGO}** es el promedio de las concentraciones de insulina plasmática ($\mu\text{U}/\text{ml}$) durante la PTGO.

A pesar de que estos índices no están estandarizados para modelos animales (Wallace et al., 2004), se calcularon con fines comparativos para cuantificar el mejoramiento en la función de la insulina en ambos estados metabólicos. Los valores de insulina en ng/ml se convirtieron a $\mu\text{U}/\text{ml}$ utilizando el valor de 26 U/mg establecido por la WHO en 1986 (National Institute for Biological Standards and Control, 2010).

6.8 Modelos *in vitro*

6.8.1 Evaluación de la inhibición de enzimas reguladoras de la gluconeogénesis

4.7.1.1 Obtención de fracciones celulares para ensayos de enzimas gluconeogénicas

Para realizar los ensayos *in vitro*, se obtuvieron las fracciones celulares del hígado de cuatro ratas Wistar sanas con un ayuno previo de 18 h, las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (6 mg/100 g de peso corporal., i.p.) (Andrade-Cetto & Cárdenas-Vázquez, 2010). Posteriormente, sus hígados fueron removidos y homogeneizados en un buffer de sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM y HEPES 5 mM a pH 7.4. El homogeneizado resultante fue filtrado centrifugado a 1 000 g por 10 min. Después, el sobrenadante obtenido se centrifugó a 12 000 g por 10 min y, finalmente, el sobrenadante postmitocondrial fue centrifugado a 100 000 g por 1 h. Los pellets (fracción microsomal) y el sobrenadante citosólico obtenidos en la última centrifugación fueron colectados y guardados a -40°C hasta ser utilizados.

4.7.1.2 Ensayos enzimáticos de inhibición del complejo glucosa-6-fosfatasa

Las pruebas se llevaron a cabo midiendo la concentración de fosforo inorgánico liberado en la reacción de hidrólisis de glucosa-6-fosfato (G6P) mediante espectrofotometría (Arion, 1989). El método utilizado fue el siguiente: en un volumen total de reacción de 100 µl, se colocaron 50 µl de buffer (imidazol 40 mM, sacarosa 0.5 M a pH 7.0), agua destilada a distintos volúmenes para completar el volumen de reacción, ácido clorogénico (control) o extracto a distintas concentraciones (2 – 8000 µg/ml), 5 µl de los microsomas aislados, y 10 µl de 20 mM de sustrato (G6P). La reacción inició colocando el sustrato, para posteriormente, dejar incubando durante 20 min a temperatura ambiente, y terminó añadiendo 900 µl de solución de trabajo (molibdato de amonio al 0.42%, SDS al 10% y ácido ascórbico al 10%). Después, se realizó una segunda incubación de 20 min pero a 45°C. Finalmente, se midió la densidad óptica a 830 nm.

4.7.1.3 Ensayos enzimáticos de inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

La actividad enzimática se determinó midiendo la formación de color de un complejo de molibdato de amonio – verde de malaquita con el fosfato inorgánico producido por la enzima (Baykov et al., 1988). Un día antes de realizar los ensayos se preparó el reactivo de color disolviendo 0.12% de verde malaquita en una solución, previamente enfriada, hecha de 5 volúmenes de agua destilada con 1 volumen de ácido

sulfúrico concentrado. El día en el que se realizaron los ensayos, se mezcló 1 volumen de 7.5% de molibdato de amonio con 4 volúmenes del reactivo de color, al cual se le añadió 0.17% de TWEEN 20. El procedimiento de Tashima y Yoshimura (1975) con algunas modificaciones fue utilizado para realizar los ensayos de inhibición: en un volumen de reacción de 1 ml se añadió buffer de 5 μ M EDTA, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl a pH 7.2 enriquecido con 0.1 mM del sustrato fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), y el inhibidor AMP o el extracto a distintas concentraciones. La reacción comenzó después de agregar 10 μ l de sobrenadante citosólico diluido 9:1 (buffer:sobrenadante) y, 15 min después, finalizó con la adición de 250 μ l reactivo de color. Después de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se midió la densidad óptica a 630 nm.

6.8.2 Evaluación de la inhibición de enzimas α -glucosidasas

Las pruebas *in vitro* para evaluar el efecto del extracto acuoso de *E. cymosum* sobre las α -glucosidasas se realizaron utilizando enzimas de intestino de rata (Sigma-Aldrich I1630) siguiendo los métodos descritos por Matsui y colaboradores (1996) con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución de las enzimas de intestino de rata disolviendo 85 mg de extracto crudo en 1 ml de buffer de fosfatos. Se sonicó durante 10 min y, posteriormente, se centrifugó para obtener el sobrenadante.

Para realizar los ensayos se llevó a cabo el procedimiento descrito por Escandón-Rivera y colaboradores (2012) con algunas modificaciones. Posteriormente, se preparó una solución stock del sustrato *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNGP; Sigma-Aldrich N1377) a una concentración de 20 mM; posteriormente, en una placa de 96 pozos se colocó buffer de fosfatos 100 mM (fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico a pH 6.8), acarbosa (control) o extracto a distintas concentraciones (0.2 – 2.0 mg/ml), 20 μ l de sobrenadante y el sustrato a una concentración final de 2 mM en 100 μ l de reacción. El ensayo inició al añadir el sustrato, realizándose la medición del tiempo cero inmediatamente después a 405 nm. Se dejó incubar la reacción a 35°C y se realizaron mediciones cada 15 min. Para la obtención de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) se tomaron las densidades ópticas obtenidas a los 30 min.

6.9 Análisis estadístico

Todos los análisis y las gráficas fueron realizados en el programa GraphPad Prism versión 9.0.1., GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. En primer lugar, se evaluó la normalidad de los datos y, si los datos no presentaron una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas. Para realizar la comparación de dos grupos, se aplicaron pruebas de t de student no pareadas, mientras que para realizar la comparación intragrupal de cada tiempo contra su tiempo inicial, fueron aplicadas ANOVA de medidas repetidas seguidas de pruebas *post hoc* de Dunnett. Las comparaciones intergrupales en cada tiempo se llevaron a cabo mediante la aplicación de ANOVA de una vía seguidas de pruebas *post hoc* de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con una $p < 0.05$ en todas las pruebas. Adicionalmente, se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) de cada grupo.

Para la obtención de las IC_{50} , las absorbancias de los experimentos *in vitro* fueron transformadas en porcentaje de actividad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Actividad\ enzimática\ (\%) = \frac{A_S - A_{SB}}{A_C - A_{CB}} \times 100$$

Donde A_S es la absorbancia del inhibidor a una concentración específica, A_{SB} es el blanco del inhibidor a esa concentración, A_C es la absorbancia más alta (muestra sin inhibidor), y A_{CB} es el blanco de la absorbancia más alta. Posteriormente, los valores en porcentaje fueron graficados en curvas concentración-respuesta para encontrar el mejor modelo de regresión no lineal que ajustara mejor a los datos:

- Modelo de tres parámetros:

$$y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + 10^{x - \log IC_{50}}}$$

- Modelo de cuatro parámetros:

$$y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)(HillSlope)}}$$

7 Resultados

7.1 Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *E. cymosum*

Como se observa en la **Figura 23A**, los controles normoglucémico (N) e hiperglucémico (H) se mantuvieron estables durante todo el periodo experimental, mientras que el control positivo glibenclamida (HG) y el extracto acuoso de *E. cymosum* a ambas dosis (HE⁴⁷ y HE⁴⁷⁰) disminuyeron los niveles de glucosa significativamente desde la primera hora tras su administración vía oral; sin embargo, el control positivo fue más eficaz en disminuir la glucosa que el extracto, regresando la glucemia a niveles normoglucémicos. De manera global, el extracto a ambas dosis disminuyó significativamente la glucosa sanguínea total en las pruebas (**Figura 23B**). La reducción de los niveles de glucosa por el extracto utilizando la dosis tradicional fue similar a la disminución observada usando la dosis tradicional elevada, por lo que se concluye que el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *E. cymosum* no depende de la dosis empleada; sin embargo, para los siguientes experimentos *in vivo*, se utilizó la dosis más alta para simular el efecto total de varias tomas de la infusión a lo largo del día, es decir, como es consumida tradicionalmente (agua de uso).

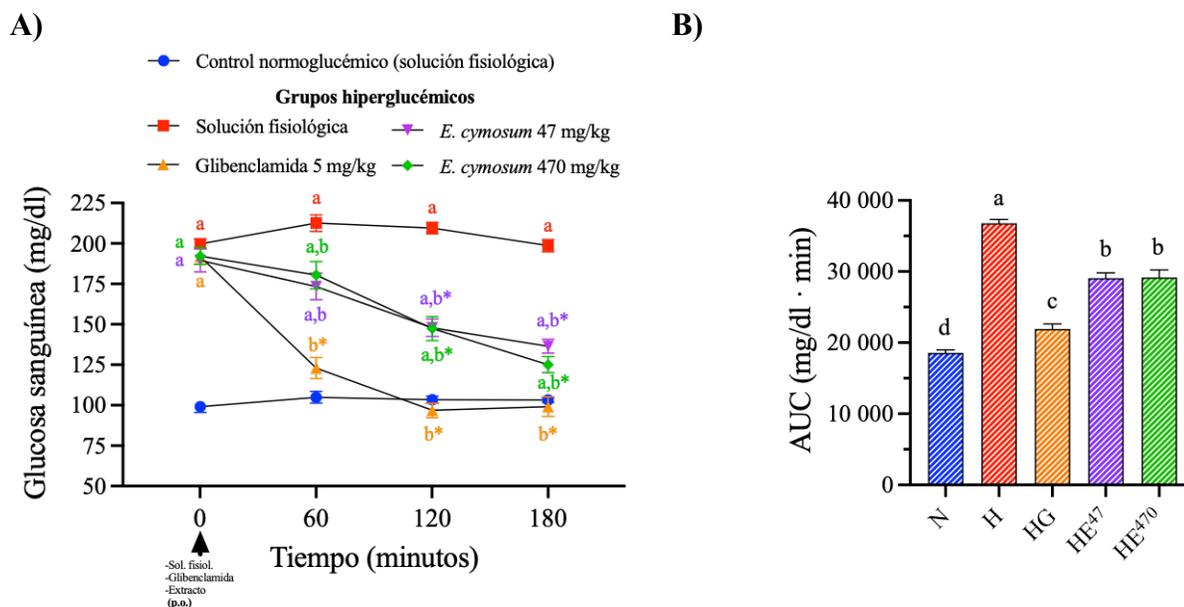


Figura 23. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de glucosa de 3 h.

Medias \pm SEM; $n = 6$. **A) Curso temporal de glucosa.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). a indica diferencia significativa vs. control normoglucémico en ese tiempo, b indica diferencia significativa vs. control hiperglucémico negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **B) AUC de las curvas temporales de glucosa.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c > d$). N, control normoglucémico (solución fisiológica); H, control hiperglucémico negativo (solución fisiológica); HG, control hiperglucémico positivo (glibenclamida; 5 mg/kg); HE⁴⁷, grupo hiperglucémico experimental (*E. cymosum*; 47 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglucémico experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg).

7.2 Inhibición de la gluconeogénesis

El piruvato es el sustrato principal de la gluconeogénesis, por lo que, para evaluar el efecto del extracto sobre esta vía, se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato en organismos hiperglucémicos (H) con un ayuno de 18 h, con la finalidad de minimizar las reservas de glucógeno y que la mayoría de la glucosa generada por la producción hepática fuera por la vía gluconeogénica. También, se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato a organismos normoglucémicos (N) con el objetivo de comparar el comportamiento regulatorio de la hiperglucemia generada por piruvato en un ambiente sano respecto a uno con repercusiones negativas en el metabolismo de la glucosa.

En la **Figura 24A** se observa que la inyección de piruvato aumentó los niveles de glucosa plasmática a partir de los primeros 30 min de su administración; sin embargo, los organismos sanos fueron capaces de regresar la glucemia a sus niveles iniciales. Por otro lado, los organismos hiperglucémicos presentaron una hiperglucemia sostenida de alrededor de 170 mg/dl por encima de sus niveles basales durante toda la prueba.

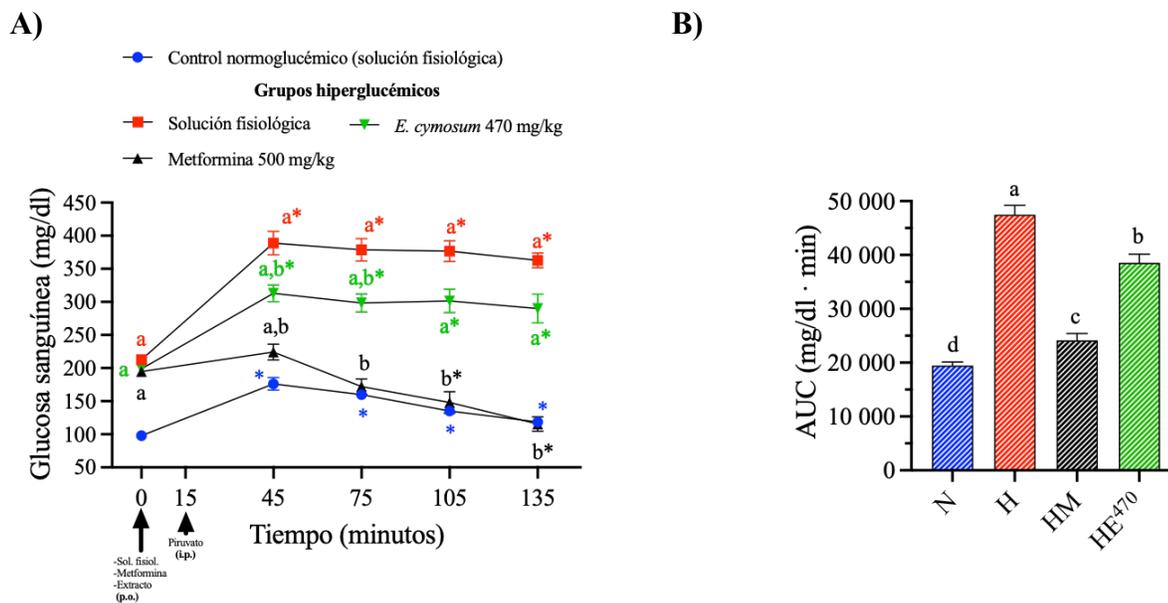


Figura 24. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a piruvato.

Medias \pm SEM; $n = 6$. **A) Curso temporal de glucosa.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). a indica diferencia significativa vs. control normoglucémico en ese tiempo, b indica diferencia significativa vs. control hiperglucémico negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **B) AUC de las curvas temporales de glucosa.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c > d$). N, control normoglucémico (solución fisiológica); H, control hiperglucémico negativo (solución fisiológica); HM, control hiperglucémico positivo (metformina; 500 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglucémico experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg)

La administración de metformina (HM) bloqueó por completo la generación de glucosa por la vía gluconeogénica debido a la efectividad en la capacidad inhibitoria de la producción hepática de glucosa de este fármaco e, incluso, ejerció un efecto hipoglucemiante que se mantuvo a lo largo de la prueba. Dicho efecto pudo deberse a la capacidad en la estimulación de la captación periférica de glucosa que también presenta este hipoglucemiante oral. Por otra parte, el extracto (HE) fue capaz de reducir significativamente el pico hiperglucémico a los 30 min, manteniendo un efecto antihiperglucémico a lo largo de toda la prueba. De manera global, el extracto redujo en un 38% los niveles de glucosa sanguínea generados por la vía gluconeogénica en comparación con el control H (**Figura 24B**).

Si bien el extracto demostró tener la capacidad de disminuir la producción de glucosa *de novo* en las pruebas de tolerancia a piruvato, el efecto inhibitorio sobre dicha vía puede ser ejercido a distintos niveles, es decir, a través de la inhibición directa de la actividad de las enzimas que participan en la síntesis de glucosa, o bien, disminuyendo su transcripción. El enfoque utilizado en este proyecto fue evaluar el efecto inhibitorio directo sobre la actividad de las enzimas reguladoras G6Pasa y FBPasa. Los resultados de los ensayos *in vitro* indicaron que, a pesar de que el extracto fue menos potente que los controles en inhibir a las dos enzimas, en ambos casos redujo más del 90% la actividad enzimática (**Figura 25**), indicando que la disminución directa de la actividad de algunas de las enzimas reguladoras gluconeogénicas participa en el efecto inhibitorio de la gluconeogénesis ejercido por el extracto acuoso de *E. cymosum*.

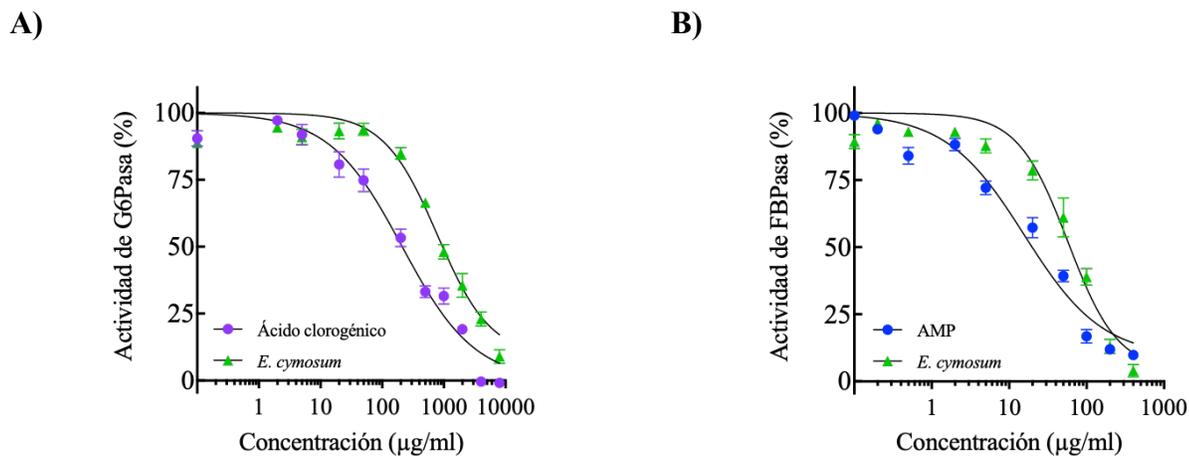


Figura 25. Curvas de inhibición concentración-respuesta de enzimas gluconeogénicas.

Cada punto representa la media \pm SEM de tres repeticiones independientes por triplicado. **A) Inhibición enzimática de G6Pasa:** la regresión no lineal del ácido clorogénico (IC_{50} : 211.3 μ g/ml; porcentaje de inhibición: 100%) se ajustó a un modelo de cuatro parámetros, mientras que la regresión no lineal del extracto (IC_{50} : 782 μ g/ml; porcentaje de inhibición: 91%) se ajustó a un modelo de tres parámetros. **B) Inhibición enzimática de FBPasa:** tanto la regresión no lineal del AMP (IC_{50} : 15.7 μ g/ml; porcentaje de inhibición: 90%) como la del extracto (IC_{50} : 57.4 μ g/ml; porcentaje de inhibición: 96%) se ajustaron a un modelo de cuatro parámetros. G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; FBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; AMP, adenosina monofosfato.

7.3 Disminución de la hiperglucemia posprandial por inhibición de α -glucosidasas

Tras la administración de la carga de maltosa, se presentó una hiperglucemia posprandial tanto en los organismos sanos (N) como en los hiperglucémicos (H); sin embargo, debido a la falta de insulina resultado del daño provocado por la STZ, los animales hiperglucémicos no fueron capaces de regular adecuadamente los niveles de glucosa (**Figura 26A**). Por otro lado, la administración de acarbosa (HA) redujo significativamente el pico posprandial alrededor de 100 mg/dl comparado con el control H; sin embargo, los niveles de glucosa tendieron a incrementarse tras la primera media hora del experimento.

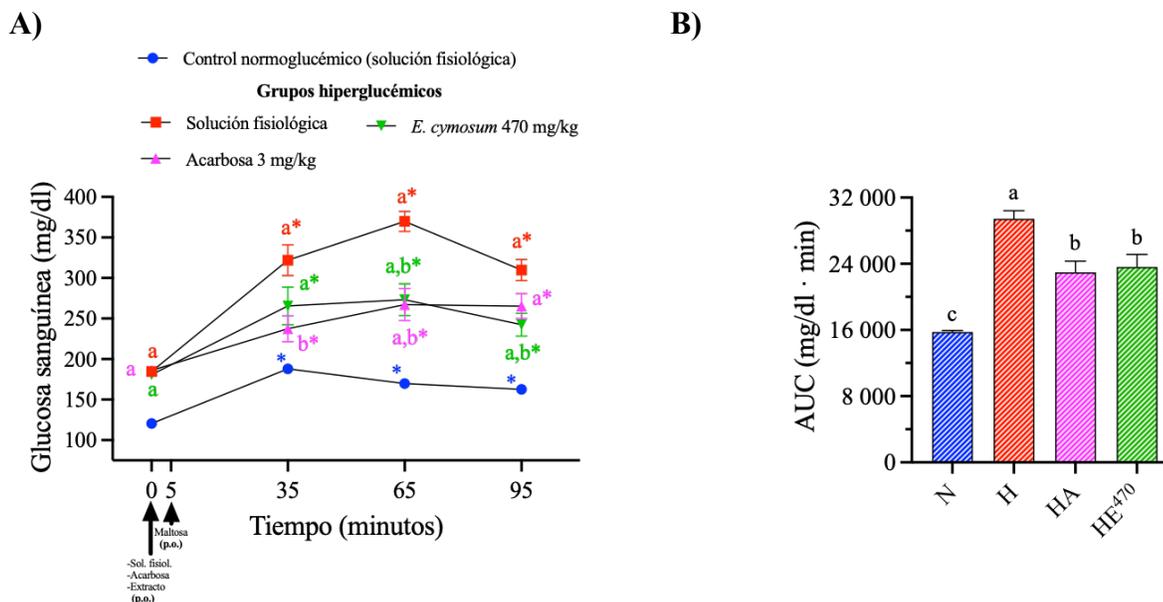


Figura 26. Concentración de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a la maltosa.

Medias \pm SEM; $n = 6$. **A) Curso temporal de glucosa.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). a indica diferencia significativa vs. control normoglicémico en ese tiempo, b indica diferencia significativa vs. control hiperglicémico negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **B) AUC de las curvas temporales de glucosa.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c$). N, control normoglicémico (solución fisiológica); H, control hiperglicémico negativo (solución fisiológica); HA, control hiperglicémico positivo (acarbose; 3 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglicémico experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg)

Aunque también fue capaz de reducir el pico posprandial, el principal efecto del extracto fue observado casi una hora después de su administración, lo que podría indicar que, a pesar de promover un retraso en la absorción de glucosa, está ejerciendo un efecto hipoglucemiante adicional que podría estar relacionado con un mecanismo intrínseco distinto a la inhibición de α -glucosidasas. A nivel global, el AUC del grupo tratado con acarbose y del grupo tratado con extracto fueron estadísticamente similares entre sí, mostrando una reducción significativa en comparación con el control negativo H (**Figura 26B**).

Por otro lado, se evaluó la repercusión del extracto sobre uno de los principales mecanismos generadores de hiperglucemia posprandial en pacientes con DM2: la hidrólisis de carbohidratos. Para abordar este objetivo, se realizaron ensayos enzimáticos de inhibición para evaluar el efecto del extracto directamente sobre las enzimas α -glucosidasas. Como se observa en la **Figura 27**, el extracto de *E. cymosum* no ejerció un efecto eficaz de inhibición sobre las enzimas de intestino de rata, alcanzando sólo un 32% de inhibición en la concentración más alta ensayada en el experimento *in vitro* (2 mg/ml). Sin embargo, aunque el extracto no fue tan potente ni tan eficaz como el control acarbosa para inhibir a estas enzimas intestinales, la reducción del pico posprandial observado *in vivo* podría ser atribuido a una saturación de extracto a nivel intestinal producto de la dosis administrada a la rata (a una rata de 250 g de peso le corresponden 117.5 mg de extracto a la dosis probada [470 mg/kg], la cual es administrada en 0.5 ml de solución fisiológica, es decir, se estaría administrando una concentración final de 235 mg/ml).

Estos resultados indicarían que la inhibición de las enzimas α -glucosidasas contribuye al efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *E. cymosum*; sin embargo, podría no ser el mecanismo principal por el cual regula los niveles de glucosa en estado posprandial debido a la baja eficacia sobre la actividad de estas enzimas intestinales.

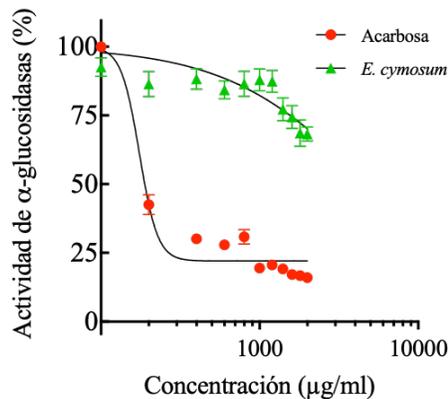


Figura 27. Curvas de inhibición concentración-respuesta de enzimas α -glucosidasas.

Cada punto representa la media \pm SEM de tres repeticiones independientes por triplicado. La regresión no lineal de la acarbosa (IC_{50} : 174.9 μ g/ml; porcentaje de inhibición: 85%) se ajustó a un modelo de cuatro parámetros, mientras que la regresión no lineal del extracto (IC_{50} : ---; porcentaje de inhibición: 32%) se ajustó a un modelo de tres parámetros.

7.4 Reducción de la secreción basal y estimulada de insulina e incremento de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial

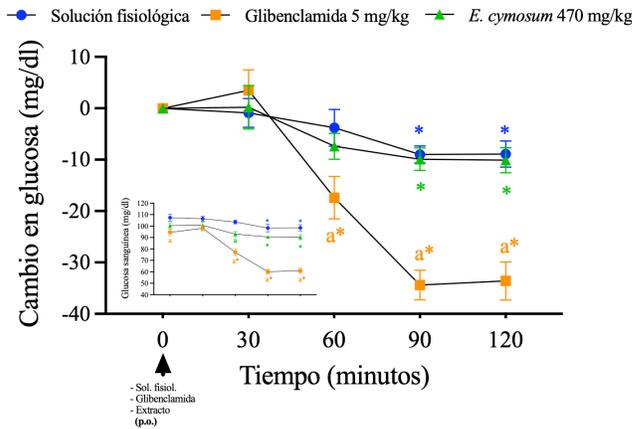
La insulina juega un papel central para la regulación de la glucemia, ya que es la encargada de promover la captación, almacenamiento y oxidación de la glucosa posprandial, así como de la inhibición de su producción endógena. Debido a esto, evaluar la posible relación entre el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *E. cymosum* con el comportamiento de la insulina forma parte esencial de los objetivos de este proyecto.

En un sistema inalterado donde la homeostasis de la glucosa funciona de manera adecuada, los niveles de glucosa e insulina del control negativo fluctuaron con el tiempo dentro de rangos específicos de 9 mg/dl y 0.4 ng/ml, respectivamente (**Figura 28A**). Después de la administración de glibenclamida, los niveles de glucosa se redujeron significativamente en 34 mg/dl después de 120 min, lo que significó una disminución significativa del 21% en el AUC (**Figura 28B**). Esta reducción fue el resultado de un aumento significativo de los niveles de insulina a partir de los 60 min de haber administrado el fármaco respecto al tiempo basal (**Figura 28C**), traduciéndose en un incremento significativo del 34% en el AUC de este parámetro respecto al control (**Figura 28D**).

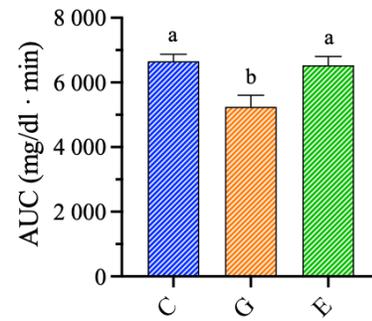
Por otro lado, la glucemia del grupo administrado con el extracto se comportó de manera similar a la del control negativo. Sin embargo, al analizar los niveles de insulina, se observó que el extracto disminuyó de manera significativa la secreción basal de insulina entre los 60 y 90 min después de su administración, lo que se tradujo en una reducción no significativa de un 14% en el AUC de este parámetro.

Estos resultados sugieren que el extracto no sólo no es capaz de promover la secreción basal de insulina, sino que la disminuye. Dado que la secreción de insulina basal se produce para inhibir la glucogenólisis hepática, la cetogénesis y la gluconeogénesis en ayuno (Borgoño & Zinman, 2012) y que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el extracto de *E. cymosum* inhibe la gluconeogénesis, su administración en ayuno podría promover la reducción de la secreción basal de insulina para evitar una hipoglucemia. Además, debido a que el extracto reguló la glucemia en estado de ayuno con menores concentraciones de insulina, se podría sugerir una mejora en la función de esta hormona, es decir, el extracto podría estar incrementando la sensibilidad a la insulina; sin embargo, son necesarios más estudios para comprobar esta hipótesis como, por ejemplo, la realización de pruebas de tolerancia a la insulina.

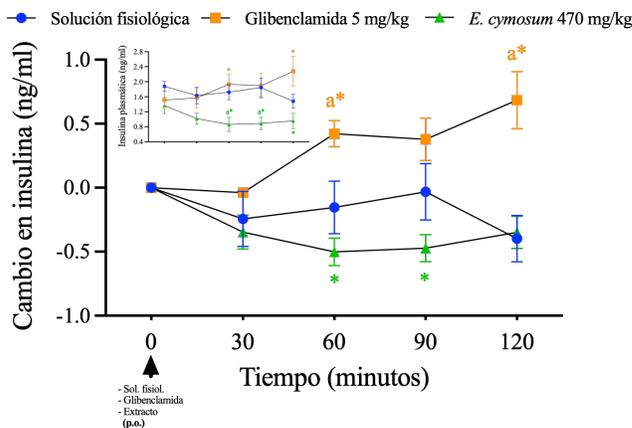
A)



B)



C)



D)

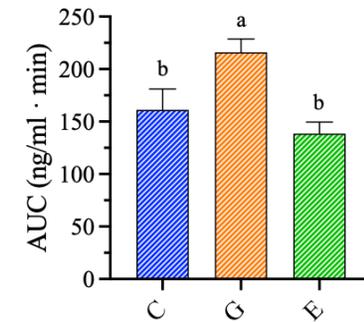


Figura 28. Concentración de glucosa sanguínea e insulina plasmática en condición de ayuno.

Medias \pm SEM; $n = 5$. **A) Curso temporal del cambio de glucosa.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). a indica diferencia significativa vs. control negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **B) AUC del cambio de glucosa.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b$). **C) Curso temporal del cambio de insulina.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). a indica diferencia significativa vs. control negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **D) AUC del cambio de insulina.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b$). C, control negativo (solución fisiológica); G, control positivo (glibenclamida; 5 mg/kg); E, grupo experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg)

Por otro lado, en el estado posprandial se observó un pico hiperglucémico significativo a los 30 min después de haber administrado la carga de glucosa en el grupo control que, posteriormente, fue disminuyendo hasta alcanzar niveles basales a los 120 min (**Figura 29A**). Este incremento de glucosa sanguínea trajo como consecuencia la elevación significativa de los niveles de insulina desde la primera media hora, observándose el pico más alto a los 90 min tras la administración de la carga de glucosa (**Figura 29C**).

Por otro lado, en el grupo control positivo, la repaglinida promovió un pico hiperinsulinémico significativo a los 35 min después de su administración, que resultó en la inhibición del pico posprandial de glucosa y un posterior efecto hipoglucemiante. Ésto se tradujo en una reducción significativa del AUC de glucosa en un 49% respecto al control negativo (Figura 29B) y en un incremento no significativo del AUC de insulina en un 20% ($p=0.361$) (Figura 29D).

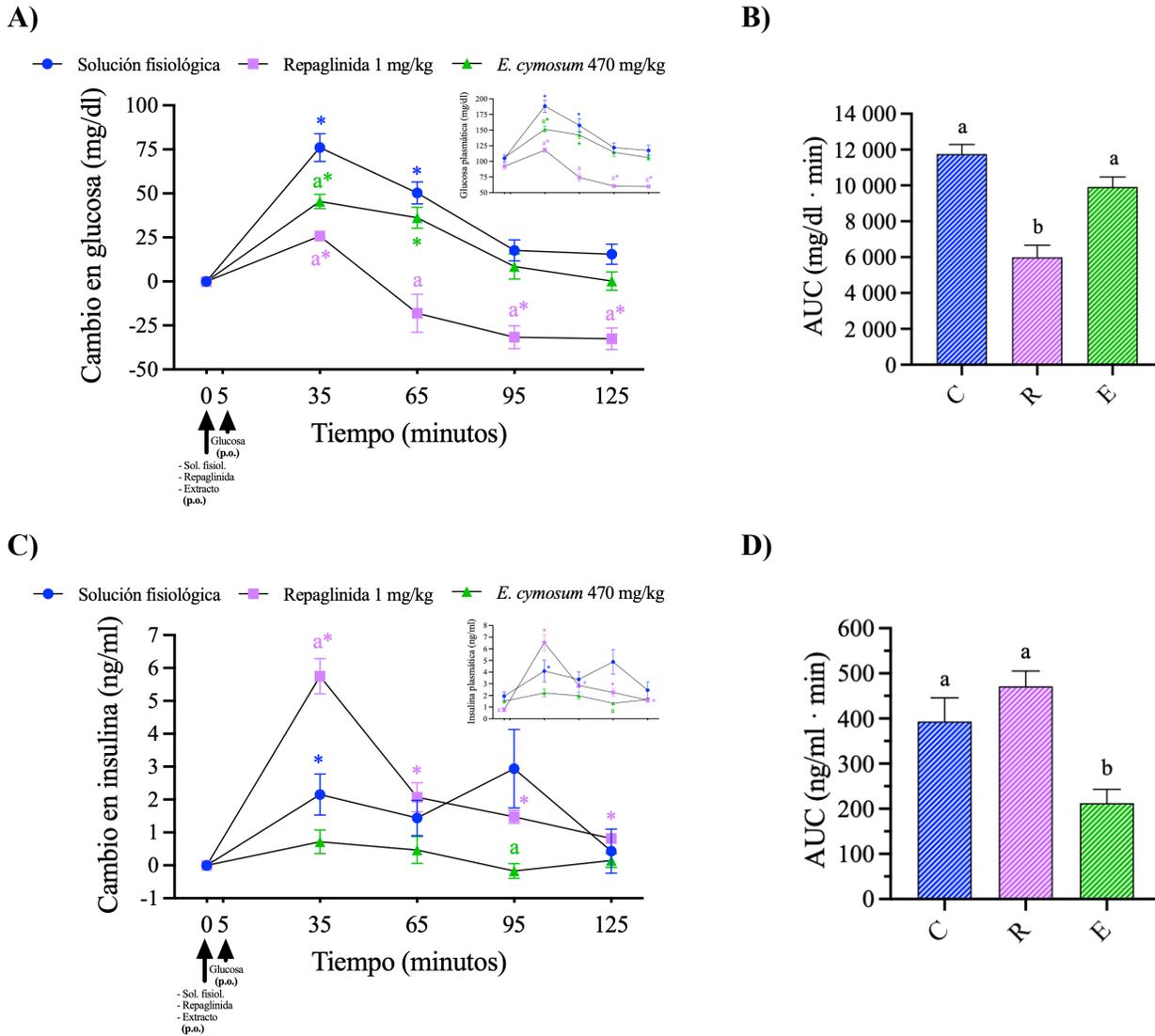


Figura 29. Concentración de glucosa sanguínea e insulina plasmática en condición posprandial.

Medias \pm SEM; $n = 5$. **A) Curso temporal del cambio de glucosa.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). ^a indica diferencia significativa vs. control negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **B) AUC del cambio de glucosa.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b$). **C) Curso temporal del cambio de insulina.** *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). ^a indica diferencia significativa vs. control negativo en ese tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$). **D) AUC del cambio de insulina.** Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b$). C, control negativo (solución fisiológica); R, control positivo (repaglinida; 1 mg/kg); E, grupo experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg).

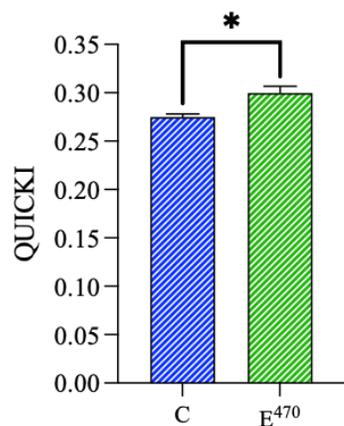
En el grupo experimental, el extracto redujo significativamente el pico posprandial en 35 mg/dl a los 35 min de su administración, promoviendo el mantenimiento de los niveles de glucosa por debajo del control negativo durante toda la prueba. De manera global, esta reducción representó un 16% de disminución en el AUC de glucosa respecto al del control ($p=0.088$). A pesar de la disminución de la hiperglucemia posprandial, los niveles de insulina se mantuvieron sin cambio respecto a su tiempo basal e incluso fueron significativamente menores al control en el tiempo 90, es decir, el extracto de *E. cymosum* inhibió la secreción estimulada de insulina, traduciéndose en una disminución significativa del AUC de insulina en un 46%.

Estos resultados sugieren que el extracto de *E. cymosum* promueve mecanismos antihiperoglucemiantes que inhiben la secreción estimulada de insulina. Dado que este mecanismo de regulación de la euglucemia se activa tras la ingesta de alimentos (estado posprandial), principalmente por glucosa, el extracto podría estar evitando la absorción intestinal de este monosacárido al inhibir, por ejemplo, a los cotransportadores sodio-glucosa tipo 1 (SGLT-1) presentes en los enterocitos (Blaschek, 2017). Es necesario que, en estudios posteriores, se evalúe este mecanismo de acción y, de igual manera, se propone cambiar la vía de administración de la glucosa para evitar el paso de absorción, así como la realización de estudios *in vitro* de secreción de insulina que prueben el efecto directo del extracto sobre las células β . Además, el extracto podría estar promoviendo mecanismos relacionados al mejoramiento de sensibilidad a la insulina, como la captación, utilización y almacenamiento de glucosa en hígado y tejidos periféricos.

Dado que el extracto fue capaz de regular la glucemia tanto en ayuno como en estado posprandial sin promover el aumento en la concentración de insulina en ambas condiciones, se calcularon los índices de sensibilidad a la insulina QUICKI e ISI para determinar virtualmente el efecto del extracto sobre la función de la insulina. La **Figura 30A** muestra que el extracto de *E. cymosum* incrementó significativamente el índice global QUICKI al compararlo con el grupo control negativo, sugiriendo que el consumo de esta planta en ayuno promueve el mejoramiento de la función hepática de la insulina.

De igual manera, la administración del extracto promovió un aumento significativo del índice ISI (Matsuda) respecto al grupo control negativo, lo que implicaría un posible incremento de la sensibilidad a la insulina en estado posprandial, es decir, el extracto podría estar regulando la captación y utilización periférica de glucosa y la inhibición de la gluconeogénesis para disminuir la hiperglucemia posprandial (**Figura 30B**).

A)



B)

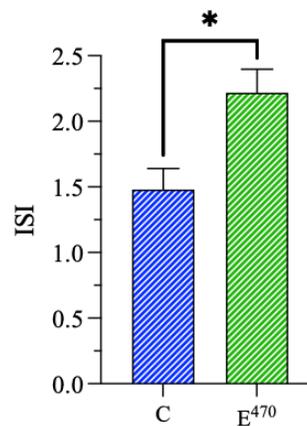


Figura 30. Mejoramiento de la sensibilidad a la insulina en la condición de ayuno (QUICKI) y estado posprandial (ISI).

Medias \pm SEM; $n = 5$. **A) Valores de QUICKI obtenidos del promedio de todos los tiempos de las curvas de glucosa en ayuno.** *indica diferencia significativa (t de student; $p < 0.05$). **B) Valores de ISI obtenidos a partir de las curvas de glucosa en estado posprandial.** *indica diferencia significativa (t de student; $p < 0.05$). C, control negativo (solución fisiológica); E⁴⁷⁰, grupo experimental (*E. cymosum*; 470 mg/kg).

8 Discusión

A lo largo de los años, la medicina tradicional se ha ido enriqueciendo con nuevas plantas para el tratamiento de distintas enfermedades. El conocimiento del uso herbolario para una especie en particular es transmitido de generación en generación, permitiendo la adopción de especies vegetales que, a través de ensayos de “prueba y error”, han resultado ser eficaces para aliviar los padecimientos que afectan la salud humana. En este contexto, las plantas medicinales que se utilizan para el tratamiento de la DM2 han sido adoptadas en los últimos años debido al creciente aumento de esta enfermedad, prevaleciendo aquellas que han sido más efectivas para contrarrestar los niveles de glucosa en sangre desde la percepción de los pacientes diabéticos.

Desde el punto de vista etnofarmacológico, estos “experimentos” que se han hecho empíricamente pueden ser útiles para la caracterización de productos naturales con potencial efecto hipoglucemiante que permitan la generación de nuevos fármacos que sean útiles para el control de la enfermedad a largo plazo. El punto de inicio involucra la identificación y descripción de estas plantas que se han adherido a la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes, por lo tanto, la información sobre la parte usada, las preparaciones, las dosis y la forma de consumo podrían resultar vitales para la elucidación de sus mecanismos de acción.

Partiendo de lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue proponer un nuevo enfoque para la caracterización de los mecanismos que participan en el efecto hipoglucemiante de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la DM2, tomando como referencia la información que se obtiene en las comunidades sobre su uso tradicional. Con base en la experiencia de estudios realizados en campo por parte de nuestro grupo de trabajo, se ha reportado que las especies que son usadas para tratar la diabetes son consumidas generalmente a lo largo del día como “agua de uso” (Andrade-Cetto, 2009; Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Cruz & Andrade-Cetto, 2015), por lo que esta forma de consumo podría estar relacionada a los mecanismos hipoglucemiantes involucrados en el efecto terapéutico.

En un paciente diabético, los procesos de regulación de la homeostasis de la glucosa se encuentran alterados debido a la secreción/función deficiente de la insulina, promoviendo la generación de hiperglucemia tanto en ayuno como en estado posprandial. Uno de los principales mecanismos que participan en esta desregulación y que funciona como fuente de hiperglucemia en ambos estados metabólicos es la producción de glucosa endógena. En ayuno, la normoglucemia es mantenida por el aporte hepático de glucosa a torrente sanguíneo para satisfacer la demanda de energía, principalmente del cerebro.

Tras la ingesta de alimento, la hiperglucemia posprandial se evita por la acción conjunta de diversos procesos entre los cuales destacan la absorción intestinal de la glucosa producida por la hidrólisis de carbohidratos complejos por enzimas intestinales, la secreción de insulina y la captación periférica de glucosa. La insulina, por un lado, inhibe la producción endógena de glucosa y, por el otro, promueve la captación de la glucosa exógena por los órganos que dependen de esta hormona para disponerla, principalmente el músculo esquelético.

Tomando en consideración lo mencionado anteriormente, se propone que para la posterior caracterización de los mecanismos de acción de una planta hipoglucemiante utilizada como “agua de uso” se realice la evaluación del efecto terapéutico sobre los principales procesos que generan hiperglucemia en ayuno y en estado posprandial (**Figura 31**).

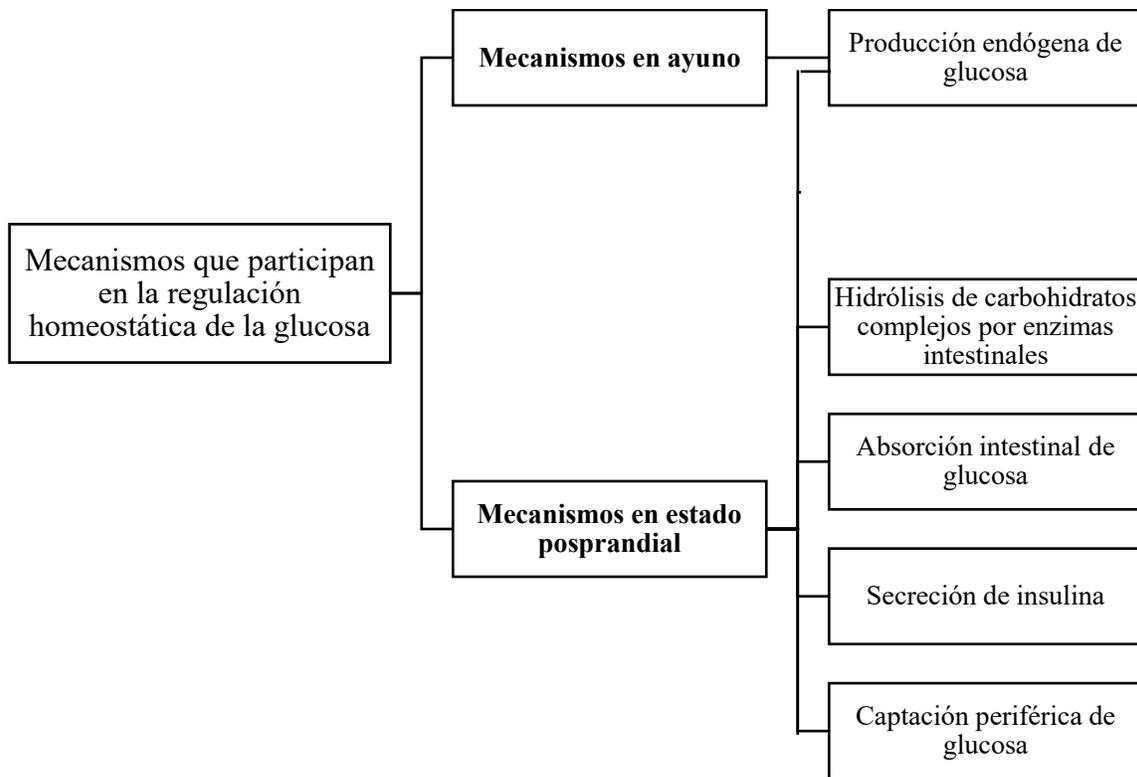


Figura 31. Propuesta inicial para la caracterización de los blancos terapéuticos de plantas hipoglucemiantes utilizadas de manera tradicional como "agua de uso".

E. cymosum, conocida comúnmente como “piñuela”, es una planta que ha sido adoptada en el sistema de medicina tradicional de los pacientes diabéticos de los municipios de Tlanchinol y Huejutla de Reyes en el estado de Hidalgo, debido a que se ha reportado su uso desde hace varias décadas por parte de

nuestro grupo de trabajo, sin embargo, hasta la fecha no se habían realizado estudios que respalden su efecto hipoglucemiante. Por lo tanto, la presente investigación se enfocó en evaluar la repercusión del extracto tradicional de esta especie sobre los niveles de glucosa sanguínea y determinar la contribución de algunos de sus mecanismos de acción tanto en ayuno como en estado posprandial.

En primera instancia, los resultados obtenidos en las curvas de glucosa de 3 h en ratas hiperglucémicas demostraron que tanto la dosis tradicional como la dosis tradicional elevada del extracto acuoso de la parte aérea de *E. cymosum* disminuyeron los niveles de glucosa sanguínea desde la primera hora de su administración, alcanzando su efecto reductor máximo a las 3 h. Aunque el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de esta especie no fue comparable con el de la glibenclamida, redujo de manera significativa la hiperglucemia total en el AUC respecto al control hiperglucémico negativo.

A pesar de que el extracto acuoso no fue capaz de corregir la hiperglucemia hasta niveles normoglucémicos (80 – 100 mg/dl) como el fármaco glibenclamida, disminuyó los niveles elevados de glucosa por debajo de 180 mg/dl, lo cual podría contribuir a un control glucémico significativo a largo plazo y a retrasar las complicaciones derivadas de la hiperglucemia persistente, si es utilizado como coadyuvante en una terapia combinada con otro agente hipoglucemiante. Dado que la exposición aguda del extracto acuoso de *E. cymosum* logró reducir los niveles de glucosa más allá de los 140 mg/dl, su administración crónica, en conjunto con algún otro fármaco, podría ayudar a alcanzar las metas glucémicas de un paciente diabético: <154 mg/dl de glucosa sanguínea (rango: 70 – 180 mg/dl), <7% de HbA1c, <36% de coeficiente de variación de glucosa a lo largo del tiempo y el mantenimiento de la meta glucémica por mayor tiempo (<70%) (ADA, 2022b).

Tras confirmar su efecto hipoglucemiante, se procedió a la caracterización de los mecanismos de acción que podrían estar participando en la reducción de hiperglucemia tanto en ayuno como en estado posprandial, con especial enfoque sobre la gluconeogénesis y la hidrólisis de carbohidratos por las enzimas α -glucosidasas intestinales.

8.1 Inhibición de la producción hepática de glucosa por *E. cymosum*

Como se mencionó previamente, se ha reportado que la vía productora de glucosa, que se encuentra alterada y que aporta la mayor cantidad de glucosa endógena, es la gluconeogénesis, por lo que, para la evaluación del impacto del extracto acuoso de *E. cymosum* sobre dicha vía, se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato (Andrade-Cetto & Cárdenas-Vázquez, 2010; Mata-Torres et al., 2020). Estos ensayos consistieron en suministrar uno de los principales sustratos de la gluconeogénesis a ratas

hiperglucémicas, las cuales se emplearon con un ayuno previo de 18 h con la finalidad de reducir al mínimo las reservas de glucógeno hepático. De esta manera, el incremento observado de los niveles de glucosa en las pruebas de tolerancia a piruvato sería, en su mayoría, proveniente de la producción *de novo*.

La administración de solución fisiológica y de este sustrato gluconeogénico elevó los niveles de glucosa sanguínea tanto en los organismos sanos como en los hiperglucémicos a partir de los 30 min después de que se les suministró piruvato (45 min después de la administración de solución fisiológica). Sin embargo, mientras que la glucosa generada por el piruvato en el control normoglucémico regresó a los niveles iniciales, el control hiperglucémico no fue capaz de regular la hiperglucemia generada por este sustrato, debido a la reducción de las reservas de insulina a causa de la destrucción parcial de células β pancreáticas (Masiello et al., 1998), manteniendo los niveles elevados durante toda la prueba.

El tratamiento con metformina evitó la aparición del pico hiperglucémico a los 45 min de su administración, además de promover un efecto hipoglucemiante que disminuyó la glucemia hasta niveles normoglucémicos a los 135 min. Este comportamiento dual pudo deberse al efecto combinado de la reducción del flujo gluconeogénico y el aumento de la captación periférica de glucosa como consecuencia del incremento en la relación AMP/ATP, es decir, los niveles elevados de AMP respecto a los de ATP pudieron haber promovido la inhibición directa de la enzima FBPasa, la activación de AMPK y la consecuente translocación de GLUT4 en tejidos periféricos (Agius et al., 2020; Foretz et al., 2014; Hunter et al., 2018). Por otro lado, aunque la administración del extracto no evitó el aumento de los niveles de glucosa a los 45 min de su administración, se observó una reducción del pico en comparación con el control hiperglucémico negativo, obteniéndose un efecto antihiperglucemiante que se mantuvo durante toda la prueba. De manera global, el extracto disminuyó significativamente el valor del AUC respecto al observado en el control hiperglucémico.

A partir del resultado obtenido en la prueba *in vivo*, se puede concluir que el extracto acuoso de *E. cymosum* inhibe la producción hepática de glucosa a través de la reducción aguda del flujo gluconeogénico, por lo que el siguiente objetivo fue evaluar su efecto directo sobre la actividad de dos enzimas reguladoras de esta vía: la G6Pasa y la FBPasa. Ambas enzimas participan en el control del flujo de glucosa proveniente de los distintos sustratos que alimentan la gluconeogénesis; sin embargo, la primera limita la liberación de glucosa proveniente tanto de la glucogenólisis como de la gluconeogénesis, mientras que la segunda sólo está involucrada en la producción de glucosa *de novo*, estando estrictamente controlada por modificación covalente y regulación alostérica (Hanson & Owen, 2013).

Mediante la realización de ensayos de inhibición enzimática, se determinó que el extracto de *E. cymosum* inhibe directamente la actividad de ambas enzimas reguladoras más allá del 90%, presentando valores de IC₅₀ en el mismo orden de magnitud que los controles. Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* apoyan lo obtenido en las pruebas de tolerancia a piruvato, por lo que se concluye que el extracto acuoso de *E. cymosum* es capaz de disminuir la gluconeogénesis de manera aguda a través de la inhibición directa de las enzimas G6Pasa y FBPasa (**Figura 32**).

Las implicaciones de inhibir a la G6Pasa podrían verse reflejadas en la reducción no sólo de la gluconeogénesis, sino de la glucogenólisis, ya que esta enzima participa en la liberación de la glucosa producida por ambas vías a torrente sanguíneo. Sin embargo, se ha reportado que los inhibidores de esta enzima pueden causar hipoglucemia y acumulación de G6P intracelular, lo que puede inducir la expresión de genes lipogénicos que podrían resultar en esteatosis hepática (Agius, 2007). Debido a esto, la inhibición de FBPasa podría considerarse un mejor blanco terapéutico, ya que controla la entrada de todos los sustratos de tres carbonos a la vía y su inhibición a largo plazo no causa hipoglucemia ni aumento de peso (van Poelje et al., 2007). Además, se ha documentado que los inhibidores de la FBPasa corrigen tanto la hiperglucemia en ayuno como la posprandial (Yoshida et al., 2008).

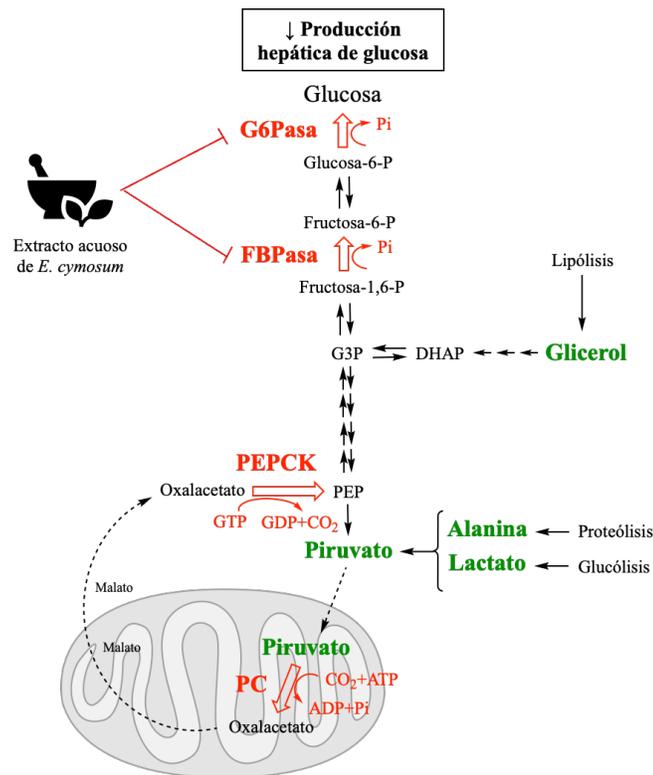


Figura 32. Blancos farmacológicos identificados en la disminución de la producción hepática de glucosa por el extracto acuoso de *E. cymosum*.

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa; PEPCCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa; PC: piruvato carboxilasa; G3P: gliceraldehído 3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato.

De manera independiente, se ha reportado que los compuestos fenólicos identificados en el extracto acuoso de *E. cymosum*, es decir, el ácido cafeico y el ácido rosmarínico, son capaces de disminuir la actividad de ambas enzimas en distintos modelos *in vivo* e *in vitro* (Jayanthi & Subramanian, 2014; Salau et al., 2020), mientras que el ácido clorogénico inhibe la translocasa 1 del complejo enzimático G6Pasa (Naveed et al., 2018). Tomando en cuenta estos antecedentes, el efecto inhibitorio sobre G6Pasa y FBPasa observado en este trabajo puede ser explicado por la composición fitoquímica del extracto.

8.2 Inhibición de la hidrólisis de carbohidratos por *E. cymosum*

Tras el consumo de alimento, el estado metabólico cambia de uno catabólico a uno anabólico gracias al incremento de las concentraciones de insulina y a la disminución de los niveles de glucagon. Para evitar la hiperglucemia posprandial, se requiere la acción combinada de diversos mecanismos dependientes de insulina que intervienen en la disminución de glucosa en torrente sanguíneo, como la inhibición de la producción endógena y la captación periférica. Sin embargo, una de las primeras aproximaciones terapéuticas para reducir la hiperglucemia posprandial a largo plazo en un paciente diabético es disminuir la entrada de glucosa a torrente sanguíneo mediante la inhibición de la hidrólisis de carbohidratos complejos de la dieta por las enzimas intestinales α -glucosidasas.

Más del 80% de los productos finales de la digestión intestinal de carbohidratos son glucosa. Los carbohidratos, específicamente el almidón, representan la mayor parte de la dieta típica humana (Luo et al., 2001). En este contexto, la maltosa es un producto importante durante la hidrólisis de este polisacárido, por lo que fue utilizada para generar hiperglucemia posprandial en el modelo hiperglucémico STZ-NA, con el objetivo de evaluar la repercusión del extracto de *E. cymosum* sobre la degradación de carbohidratos.

Los resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia a maltosa indicaron que el extracto acuoso de *E. cymosum* redujo significativamente el pico posprandial de glucosa a los 65 min de haberlo administrado en un 49% respecto al grupo hiperglucémico control. De manera similar, la acarbosa fue capaz de disminuir el pico posprandial en un 56%; sin embargo, el mayor efecto de este fármaco hipoglucemiante se observó a los 35 min de su administración, mientras que el extracto tuvo su mayor efecto reductor a los 95 min de haberlo suministrado.

Esta diferencia puede deberse a que el blanco molecular de la acarbosa es la inhibición de las enzimas α -glucosidasas, por lo que, tras disminuir su actividad, se retrasó la absorción de la glucosa hidrolizada a partir de la maltosa administrada vía oral. Debido a esto, los niveles de glucosa sanguínea del grupo

tratado con acarbosa comenzaron a incrementarse conforme pasó el tiempo. Por otro lado, en el ensayo *in vitro* se determinó que el extracto inhibió sólo un 32% de la actividad de estas enzimas intestinales, de manera que, a pesar de la contribución de la inhibición de la hidrólisis de carbohidratos a la reducción de la hiperglucemia posprandial observada en el grupo tratado con *E. cymosum*, deben existir otros mecanismos que participan en la disminución de hiperglucemia en este estado metabólico, como la inhibición directa de la absorción intestinal de glucosa o el incremento de su captación periférica.

Por ejemplo, se ha reportado que el ácido rosmarínico, uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de *E. cymosum*, modula el tráfico intestinal a través de la reducción de los niveles de SGLT-1, contribuyendo al control de la hiperglucemia en ratas inducidas con STZ (Azevedo et al., 2011).

8.1 Disminución de la secreción basal y estimulada de insulina e incremento de la sensibilidad a la insulina en ayuno y estado posprandial por *E. cymosum*

La homeostasis de la glucosa depende tanto de la sensibilidad a la insulina, así como de la función de las células β pancreáticas, es decir, para la regulación de la normoglucemia es necesario que la insulina, secretada en respuesta a diversos factores que modifican la concentración de glucosa, ejerza sus efectos fisiológicos en los tejidos periféricos sensibles a ésta (Dimitriadis et al., 2021). En este sentido, se puede formular la hipótesis de que los extractos de plantas hipoglucemiantes pueden mejorar la función de la insulina, o bien promover la secreción de esta hormona para controlar o reducir la hiperglucemia.

La reducción de la producción endógena de glucosa y la hiperglucemia posprandial inducida por el extracto acuoso de *E. cymosum* podría ser producto de una regulación de la concentración de insulina en torrente sanguíneo por parte de esta planta medicinal, de modo que se evaluó el papel de la insulina plasmática en su efecto hipoglucemiante en ayuno y en estado posprandial en ratas sanas, las cuales presentan una adecuada regulación de la homeostasis de la glucosa.

Los resultados indicaron que el extracto disminuyó significativamente la concentración de insulina en ambos estados metabólicos, a pesar de reducir los niveles de glucosa sanguínea en ayuno y de reducir el pico posprandial de glucosa. El promover la regulación de la glucemia inhibiendo o disminuyendo la secreción basal y estimulada de insulina, podría ser un indicativo de que el extracto acuoso de *E. cymosum* aumenta la sensibilidad a la insulina al inducir mecanismos que mejoren su función en tejidos periféricos, como la estimulación de la captación y utilización de la glucosa.

La sensibilidad a la insulina puede definirse como la capacidad de la insulina de ejercer sus efectos fisiológicos sobre el metabolismo, implicando que la glucemia es regulada por ciertos niveles de insulina.

Para ejemplificar mejor este concepto, se pueden comparar dos organismos que presentan los mismos valores de glucosa. Al cuantificar sus niveles de insulina, uno de ellos puede presentar niveles de insulina mayores que el otro, lo que indicaría que, para ser capaz de mantener la normoglucemia, sus células β pancreáticas necesitan secretar una mayor cantidad de insulina porque sus tejidos son menos sensibles a ésta (Petersen & Shulman, 2018).

Se ha implicado que existen diversos factores que modifican la sensibilidad a la insulina. Entre los factores individuales se encuentran la etnia, el sexo, la edad, la actividad física, la adiposidad, y el peso y la edad gestacional al nacer. Los factores ambientales pueden ser la temperatura, la altitud y la concentración de oxígeno, mientras que entre los factores dietarios se incluyen el consumo de carbohidratos y grasas, las proteínas de pescado y soya, el cromo y la vitamina D. También, se ha documentado que los contaminantes ambientales pueden afectar la función de la insulina, como contaminantes orgánicos persistentes, plaguicidas organoclorados, ftalatos, bisfenol A, arsénico y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (Latini et al., 2009).

De manera general, la sensibilidad a la insulina puede mejorarse por la activación de mecanismos involucrados en la vía de señalización de esta hormona en sus órganos blanco, así como por la estimulación de procesos independientes a la insulina, pero que convergen funcionalmente con la regulación metabólica de la glucosa, como la activación del sensor energético AMPK (Mackenzie & Elliott, 2014).

Se ha reportado en la literatura internacional que tanto alimentos funcionales como plantas medicinales son capaces de mejorar la acción de la insulina a través de mecanismos dependientes e independientes a esta hormona. Estos productos naturales promueven la activación de procesos como la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la inhibición de la gluconeogénesis a través de la regulación positiva de componentes de la vía de señalización de la insulina, como el receptor de insulina, los IRS y Akt, así como por la promoción de la fosforilación de AMPK (Cordero-Herrera et al., 2014, 2015; Dhananjayan et al., 2017; Edirs et al., 2018; Kazeem & Davies, 2016; Lee et al., 2015; Rozenberg & Rosenzweig, 2018; Semaan et al., 2017, 2018; Sun et al., 2015; Vuong et al., 2007; Yang et al., 2017; Zakłós-Szyda & Pawlik, 2018; Zhang et al., 2016).

Se ha documentado que el ácido cafeico, el ácido rosmarínico y el ácido clorogénico, presentes en el extracto acuoso de *E. cymosum*, incrementan la fosforilación de AMPK, promoviendo la translocación de GLUT4 en tejidos periféricos y la reducción transcripcional de PEPCK y G6Pasa (Meng et al., 2013; Ngo et al., 2018; Un et al., 2006), por lo que se sugiere que se evalúe la capacidad del extracto sobre estos blancos farmacológicos en estudios posteriores.

Finalmente, la generación de un fitomedicamento a partir del extracto acuoso de *E. cymosum* podría repercutir favorablemente en el control glucémico a largo plazo porque, al mejorar la acción de la insulina y al ser utilizado en combinación con otro agente hipoglucemiante, se podría preservar la función y masa de las células β pancreáticas de pacientes con DM2 avanzada.

9 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos e integrando los mecanismos de acción probados en este proyecto, se puede concluir que el extracto acuoso de *E. cymosum* presenta un efecto hipoglucemiante agudo a la dosis tradicional y que dicho efecto no es dosis-dependiente. El extracto disminuye la hiperglucemia en ayuno, a través de la inhibición de la gluconeogénesis debido a la disminución en la actividad de las enzimas GPasa y FBPasa, y en estado posprandial, mediante la reducción parcial de la hidrólisis de carbohidratos por enzimas α -glucosidasas. Por otro lado, es capaz de regular la glucemia reduciendo la secreción basal de insulina en los 60 y 90 min tras su administración (reducción parcial) e inhibiendo la secreción estimulada de insulina, lo que sugiere una mejora en la función de la insulina en ayuno (hepática) y en estado posprandial (músculo esquelético y tejido adiposo) al reducir los niveles de esta hormona en los dos estados metabólicos (**Figura 33**).

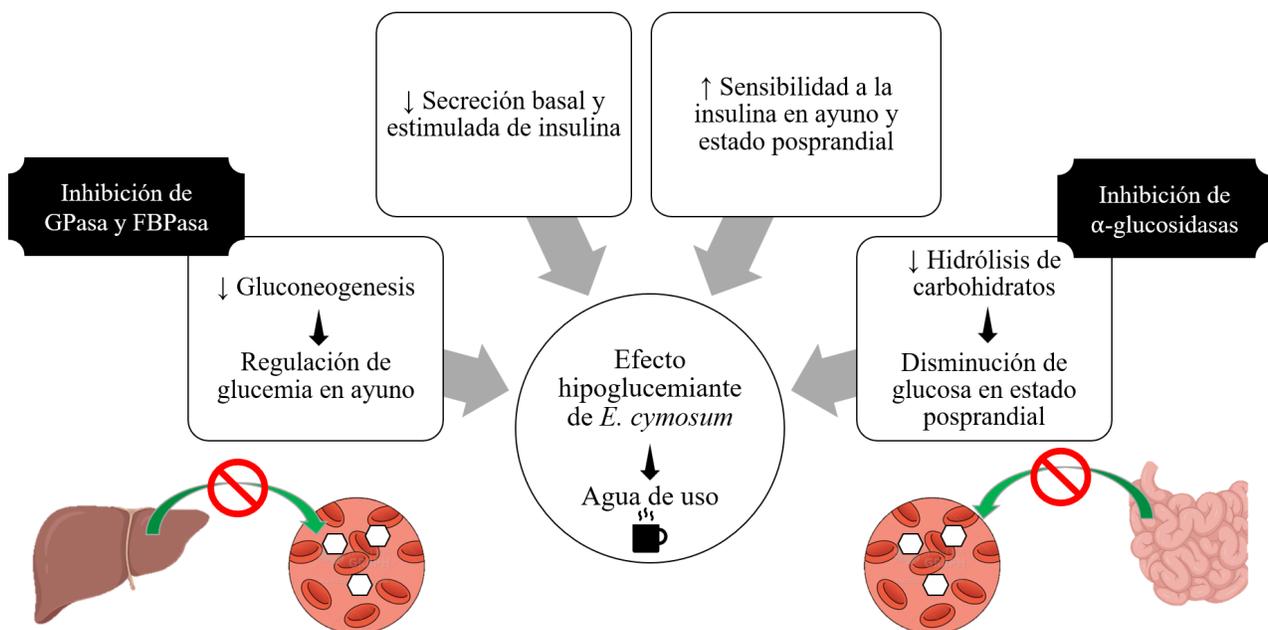


Figura 33. Mecanismos que participan en la regulación de la glucemia en ayuno y en estado posprandial por el extracto acuoso de *E. cymosum*.

GPasa: glucosa-6-fosfatasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Como se ha reportado previamente, la gluconeogénesis es el principal mecanismo desregulado tanto en estado de ayuno como en estado posprandial debido a la RI que presenta el hígado, por lo que al inhibir esta vía se explicaría el efecto hipoglucemiante que ejerce el extracto en ambas condiciones metabólicas; sin embargo, en el estado posprandial intervienen varios mecanismos que no son evaluados

en este proyecto y que pudieran estar involucrados en el efecto hipoglucemiante del extracto, como la activación de la glucogénesis y la estimulación de la captación y utilización de la glucosa.

Es importante destacar que, aunque la administración del extracto de *E. cymosum* por sí sola no disminuye la hiperglucemia hasta niveles normoglucémicos, es capaz de controlar los niveles elevados de glucosa dentro del rango establecido por la ADA para las metas glucémicas de una persona diabética, por lo que, su consumo a lo largo del día como “agua de uso”, de forma paralela al tratamiento farmacológico convencional, podría coadyuvar a la regulación de la glucemia por más tiempo, retrasando las complicaciones derivadas por la hiperglucemia persistente.

Finalmente, se espera que este trabajo contribuya al establecimiento de las bases para caracterizar los mecanismos de acción de una planta medicinal utilizada en el tratamiento de la DM2 como “agua de uso”.

10 Perspectivas

Se propone que evaluar el efecto del extracto acuoso de *E. cymosum* sobre otros mecanismos como:

- la absorción intestinal de glucosa.
- la captación periférica de glucosa.
- la síntesis de glucógeno.
- la fosforilación de componentes en la vía de señalización de la insulina que indiquen el mejoramiento de su función.

Por otro lado, se propone evaluar la participación de AMPK en el efecto hipoglucemiante de *E. cymosum* debido a que el incremento en la sensibilidad a la insulina puede ser generado por mecanismos independientes a la activación de la vía de PI3K/Akt por insulina, como se ha reportado para alimentos funcionales, otras plantas medicinales, los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso y fármacos hipoglucemiantes como la metformina y las TZDs. En primera instancia, se sugiere la realización de pruebas de tolerancia a la insulina con la finalidad de comprobar el posible mejoramiento de la función de la insulina de esta especie para, posteriormente, evaluar dicho efecto en un modelo que presente RI.

Dado que el extracto podría estar inhibiendo el proceso de absorción intestinal de glucosa, se propone cambiar la vía de administración de la glucosa para volver a evaluar la repercusión del extracto sobre la secreción estimulada de insulina *in vivo*. De igual manera, se podrían realizar estudios de secreción de insulina *in vitro* para observar el efecto directo del extracto sobre las células β .

También, es necesario evaluar el mantenimiento del efecto hipoglucemiante de esta especie, por lo que se propone realizar estudios crónicos para determinar la repercusión de la administración diaria del extracto de *E. cymosum* sobre los niveles de HbA1c y otros parámetros clínicos importantes que se relacionan a la aparición de las complicaciones diabéticas, como los niveles de triglicéridos y colesterol. Además, debido a que esta planta medicinal es consumida por pacientes diabéticos, es necesaria la evaluación de su seguridad a largo plazo mediante la realización de estudios toxicológicos.

11 Referencias bibliográficas

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Afshari, M., Mohammadshahi, M., Malayeri, A. R., & Zaheri, L. (2019). Antidiabetic, hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Eryngium caucasicum* extract in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes in male rats. *Iraq Med J*, 3(1), 11–16.
- Agius, L. (2007). New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 21(4), 587–605. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.09.001>
- Agius, L., Ford, B. E., & Chachra, S. S. (2020). The metformin mechanism on gluconeogenesis and AMPK activation: The metabolite perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21093240>
- Ahmed, B., Sultana, R., & Greene, M. W. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137(December 2020), 111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Al-Khalil, S. (1994). Phytochemistry of *Eryngium creticum*. *Alex. J. Pharm. Sci.*, 8(1), 73–74.
- Almonte-Flores, D. C. (2015). *Estudio de Polifenoles con Propiedades Antioxidantes, Hipoglucémicas e Hipocolesterolémicas a partir de Subproductos Agroforestales [Tesis de doctorado]*. Instituto Politécnico Nacional.
- American Diabetes Association. (2001). Postprandial blood glucose. *Diabetes Care*, 24(4), 775–778. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.775>
- American Diabetes Association. (2022a). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*, 45(Suppl. 1), S17–S38.
- American Diabetes Association. (2022b). 9. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*, 43(Suppl. 1), S125–S143.
- American Diabetes Association. (2022c). 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S83–S96. <https://doi.org/10.2337/dc22-S006>
- Andrade-Cetto, A. (1999). *Estudio etnofarmacológico de Equisetum myriochaetum Schlechtendal & Chalm. y Cecropia obtusifolia Bertol. [Tesis de doctorado]*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.008>
- Andrade-Cetto, A. (2010). Mexican plants traditionally used for the treatment of type 2 diabetes. In M. Hiriart-Urdanivia & J. Mas-Oliva (Eds.), *Advances in obesity-diabetes research at UNAM* (pp. 181–190). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Andrade-Cetto, A. (2015). Diabetes and Metabolic Disorders: An Ethnopharmacological Perspective. In M. Heinrich & A. Jäger (Eds.), *Ethnopharmacology* (1st ed., pp. 227–237). John Wiley & Sons, Ltd.

- Andrade-Cetto, A., & Cárdenas-Vázquez, R. (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>
- Andrade-Cetto, A., Cruz, E. C., Cabello-Hernández, C. A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2019). Hypoglycemic Activity of Medicinal Plants Used among the Cakchiquels in Guatemala for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2019*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/2168603>
- Andrade-Cetto, A., Espinoza-Hernández, F., Mata-Torres, G., & Escandón-Rivera, S. (2021). Hypoglycemic Effect of Two Mexican Medicinal Plants. *Plants*, *10*(10), 2060. <https://doi.org/10.3390/plants10102060>
- 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., & Medina-Hernández, A. E. (2013). Hypoglycemic effect of *Bromelia plumieri* (E. Morren) L.B. Sm., leaves in STZ-NA-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, *4*, 36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00036>
- Andrade, C., Gomes, N. G. M., Duangsrissai, S., Andrade, P. B., Pereira, D. M., & Valentão, P. (2020). Medicinal plants utilized in Thai Traditional Medicine for diabetes treatment: Ethnobotanical surveys, scientific evidence and phytochemicals. *Journal of Ethnopharmacology*, *263*, 1–54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113177>
- Andújar-Plata, P., Pi-Sunyer, X., & Laferrère, B. (2012). Metformin effects revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *95*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.09.022>
- Arion, W. J. (1989). [7] Measurement of intactness of rat liver endoplasmic reticulum. In S. Fleischer, B. Fleischer, J. Abelson, & M. Simon (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 174, pp. 58–67). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)74010-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)74010-6)
- Atanasov, A., Zotchev, S., Dirsch, V., the International Natural Product Sciences Taskforce, & Supuran, C. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Austin, D. F. (2004). *Florida Ethnobotany*. CRC Press.
- Ayoub, N., Kubeczka, K., & Nawwar, M. (2003). An unique n-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae). *Pharmazie*, *58*(9), 674–676.
- Azevedo, M. F., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Almeida, M. J., Wilson, J. M., & Pereira-Wilson, C. (2011). Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effects on blood glucose. *Molecular Nutrition and Food Research*, *55*(SUPPL. 1), 15–25. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000472>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, *60*(9), 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>
- Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., & Msanda, F. (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, *198*(January), 338–350.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.023>

- Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., & Avaeva, S. M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical Biochemistry*, *171*(2), 266–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90484-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90484-8)
- Bello-González, M. Á., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M. B. N., & Salgado-Garciglia, R. (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, *39*, 175–215. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.39.10>
- Blaschek, W. (2017). Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. *Planta Medica*, *83*(12/13), 985–993. <https://doi.org/10.1055/s-0043-106050>
- Borgoño, C. A., & Zinman, B. (2012). Insulins: Past, Present, and Future. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *41*(1), 1–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.03.002>
- Calle, M. C., & Fernandez, M. L. (2012). Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*, *38*(3), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2011.11.006>
- Calviño, C. I., Martínez, S. G., & Downie, S. R. (2008). The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *46*(3), 1129–1150. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.10.021>
- Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M., & Dass, C. R. (2015). Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle - A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *417*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.004>
- Carreón-Sánchez, R., Marroquín-Segura, R., Mora-Guevara, J. L. A., Valadez-Sánchez, C. S., Flores-Cabrera, Y., Flores-Pimentel, M., & Hernández-Abad, V. J. (2013). Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. *Rev Mex Cienc Farm*, *44*(2), 41–45.
- Castro-Torres, I. G., De La O-Arciniega, M., Naranjo-Rodríguez, E. B., Castro-Torres, V. A., Domínguez-Ortiz, M. Á., & Martínez-Vázquez, M. (2017). The Hypocholesterolemic Effects of *Eryngium carlinae* F. Delaroche Are Mediated by the Involvement of the Intestinal Transporters ABCG5 and ABCG8. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3176232>
- Cerf, M. E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, *4*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00037>
- Cersosimo, E., Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Mandarino, L. J., & DeFronzo, R. A. (2018). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In K. R. Feingold (Ed.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905339>
- Chang, C. L. T., Lin, Y., Bartolome, A. P., Chen, Y. C., Chiu, S. C., & Yang, W. C. (2013). Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: Chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 378657. <https://doi.org/10.1155/2013/378657>
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., & Mirza, W. (2017). Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00006>

- Cheng, A. Y. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, *172*(2), 213–226. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>
- Choudhury, J., Bora, J., Baruah, D., Borah, T., & Bharali, B. K. (2014). Portrayal of folk medicinal practices among the indigenous people of north Tripura district of Tripura, India. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, *5*(4), 480–488. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.05499>
- Clement, Y. N., Morton-Gittens, J., Basdeo, L., Blades, A., Francis, M. J., Gomes, N., Janjua, M., & Singh, A. (2007). Perceived efficacy of herbal remedies by users accessing primary healthcare in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-7-4>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2021). *EncicloVida: Eryngium cymosum*. <https://enciclovida.mx/especies/171701-eryngium-cymosum>
- Corbin, K. L., Waters, C. D., Shaffer, B. K., Verrilli, G. M., & Nunemaker, C. S. (2016). Islet hypersensitivity to glucose is associated with disrupted oscillations and increased impact of proinflammatory cytokines in islets from diabetes-prone male mice. *Endocrinology*, *157*(5), 1826–1838. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1879>
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. Á., Goya, L., & Ramos, S. (2014). Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *64*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.014>
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. ángeles, Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., & Ramos, S. (2015). Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(7), 704–712. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.01.009>
- Corkey, B. E. (2012). Banting lecture 2011: Hyperinsulinemia: Cause or consequence? *Diabetes*, *61*(1), 4–13. <https://doi.org/10.2337/db11-1483>
- Costo-Muriel, C., Martín-Carmona, J., & Pérez-Belmonte, L. M. (2020). Complicaciones macrovasculares de la diabetes. *Medicine*, *13*(16), 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.09.011>
- Cowie, M. R., & Fisher, M. (2020). SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nature Reviews Cardiology*, *17*(12), 761–772. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0406-8>
- Cruz, E. C., & Andrade-Cetto, A. (2015). Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, *159*, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.021>
- Cruz, J., Licea, M., Hernández, P., Abraham, E., & Yanes, M. (2011). Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*, *58*(2), 102–107.
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R. A., Kahn, C. R., & Mandarino, L. J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, *105*(3), 311–320. <https://doi.org/10.1172/JCI7535>
- Dalar, A., Türker, M., Zabarar, D., & Konczak, I. (2014). Phenolic Composition, Antioxidant and

Enzyme Inhibitory Activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), 30–36. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0393-6>

- DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *The Medical Clinics of North America*, 88(4), 787–835. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.04.013>
- DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773–795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- DeFronzo, R. A., Triplitt, C. L., Abdul-Ghani, M., & Cersosimo, E. (2014). Novel Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectrum : A Publication of the American Diabetes Association*, 27(2), 100–112. <https://doi.org/10.2337/diaspect.27.2.100>
- Dehghan, H., Sarrafi, Y., & Salehi, P. (2016). Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.010>
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). (2014). *Eryngium cymosum* F. Delaroché, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. Portal de Datos Abiertos UNAM. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:992321>
- Dhananjayan, I., Kathirolu, S., Subramani, S., & Veerasamy, V. (2017). Ameliorating effect of betanin, a natural chromoalkaloid by modulating hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities and glycogen content in streptozotocin – nicotinamide induced experimental rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 88, 1069–1079. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.146>
- Di Pino, A., & DeFronzo, R. A. (2019). Insulin Resistance and Atherosclerosis: Implications for Insulin-Sensitizing Agents. *Endocrine Reviews*, 40(6), 1447–1467. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00141>
- Digenio, A., Pham, N. C., Watts, L. M., Morgan, E. S., Jung, S. W., Baker, B. F., Geary, R. S., & Bhanot, S. (2018). Antisense Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B With IONIS-PTP-1BRx Improves Insulin Sensitivity and Reduces Weight in Overweight Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 41(4), 807–814. <https://doi.org/10.2337/dc17-2132>
- Dimitriadis, G. D., Maratou, E., Kountouri, A., Board, M., & Lambadiari, V. (2021). Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. *Nutrients*, 13(159), 1–33. <https://doi.org/10.3390/nu13010159>
- Ding, D., Wang, M., Wu, J. X., Kang, Y., & Chen, L. (2019). The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic K ATP Channel. *Cell Reports*, 27(6), 1848–1857.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.050>
- Duarte, A. M., Guarino, M. P., Barroso, S., & Gil, M. M. (2020). Phytopharmacological strategies in the management of type 2 diabetes mellitus. *Foods*, 9(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/foods9030271>
- Eddouks, M., Chattopadhyay, D., & Zeggwagh, N. A. (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2012, 142087. <https://doi.org/10.1155/2012/142087>
- Edirs, S., Jiang, L., Xin, X. L., & Aisa, H. A. (2018). Anti-diabetic effect and mechanism of Kursi

- Wufarikun Ziyabit in L6 rat skeletal muscle cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(2), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.011>
- Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>
- El-Abhar, H. S., & Schaalan, M. F. (2014). Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes*, 5(2), 176–197. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.176>
- Erion, K. A., Berdan, C. A., Burritt, N. E., Corkey, B. E., & Deeney, J. T. (2015). Chronic exposure to excess nutrients left-shifts the concentration dependence of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(26), 16191–16201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620351>
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., & Mata, R. (2012). α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, 75(5), 968–974. <https://doi.org/10.1021/np300204p>
- Escandón-Rivera, S. M., Mata, R., & Andrade-Cetto, A. (2020). Molecules Isolated from Mexican Hypoglycemic Plants: A Review. *Molecules*, 25(18), 4145. <https://doi.org/10.3390/molecules25184145>
- Espinoza-Hernández, F., Andrade-Cetto, A., Escandón-Rivera, S., Mata-Torres, G., & Mata, R. (2021). Contribution of fasting and postprandial glucose-lowering mechanisms to the acute hypoglycemic effect of traditionally used *Eryngium cymosum* F.Delaroche. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114339. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114339>
- Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M. A., Saavedra-Molina, A., & Salgado-Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45–52.
- Ferrannini, E., & DeFronzo, R. A. (2015). Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *European Heart Journal*, 36(34), 2288–2296. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv239>
- Ferré, P., & Foufelle, F. (2007). SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Hormone Research in Paediatrics*, 68(2), 72–82. <https://doi.org/10.1159/000100426>
- Flamini, G., Tebano, M., & Cioni, P. L. (2008). Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy). *Food Chemistry*, 107(2), 671–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.064>
- Fonseca, V. (2003). Clinical significance of targeting postprandial and fasting hyperglycemia in managing type 2 diabetes mellitus. *Current Medical Research and Opinion*, 19(7), 635–631. <https://doi.org/10.1185/030079903125002351>
- 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>
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism*, 20, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
- Fuhlendorff, J., Rorsman, P., Kofod, H., Brand, C. L., Rolin, B., Mackay, P., Shymko, R., & Carr, R. D. (1998). Stimulation of Insulin Release by Repaglinide and Glibenclamide Involves Both Common and Distinct Processes. *Diabetes*, 47(March), 345–351. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.3.345>

- Gaikwad, S. B., Krishna Mohan, G., & Sandhya Rani, M. (2014). Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, 5(Suppl 1: M2), 11–28.
- García-Cerrillo, D., Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D., Huerta-Cervantes, M., Silva-Ríos, M., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., & Saavedra-Molina, A. (2018). Antioxidant Effects of *Eryngium carlinae* in Diabetic Rats. *Asian Journal of Applied Sciences*, 6(5), 308–314. <https://doi.org/10.24203/ajas.v6i5.5482>
- García-Ruiz, I. (2013). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana*, 103, 65–118. <https://doi.org/10.1016/j.annals.2015.09.009>
- Ghani, U. (2015). Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 133–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.043>
- Ghasemi, A., Khalifi, S., & Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408–420. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2>
- Gökçay Canpolat, A., & Şahin, M. (2020). Glucose Lowering Treatment Modalities of Type 2 Diabetes Mellitus. In M. S. Islam (Ed.), *Advances in Internal Medicine* (Vol. 1307). Springer. https://doi.org/10.1007/5584_2020_516
- Grant, J. S., & Graven, L. J. (2016). Progressing from Metformin to Sulfonylureas or Meglitinides. *Workplace Health and Safety*, 64(9), 433–439. <https://doi.org/10.1177/2165079916644263>
- Guízar-González, C. (2007). *Apiaceas mexicanas relacionadas filogenéticamente con Apiaceas sudamericanas como posibles fuentes de metabolitos secundarios biológicamente activos [Tesis de maestría]*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). Gluconeogenesis. In *Metabolism Vitamins and Hormones* (pp. 381–386). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00040-2>
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 185–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105304>
- Hauner, H. (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 18(SUPPL. 2), 10–15. <https://doi.org/10.1002/dmrr.249>
- Heinrich, M. (2015). Ethnopharmacology: A Short History of a Multidisciplinary Field of Research. In M. Heinrich & A. K. Jäger (Eds.), *Ethnopharmacology* (1st ed., pp. 3–9). John Wiley & Sons, Ltd.
- Holmstedt, B. O., & Bruhn, J. A. N. G. (1983). Ethnopharmacology - A Challenge. *Journal of Ethnopharmacology*, 8(3), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90062-4)
- Hu, F., & Malik, V. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. *Physiology & Behaviour*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.036>
- Hunter, R. W., Hughey, C. C., Lantier, L., Sundelin, E. I., Peggie, M., Zeqiraj, E., Sicheri, F., Jessen, N., Wasserman, D. H., & Sakamoto, K. (2018). Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nature Medicine*, 24(9), 1395–1406. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0159-7>
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10th ed.). International Diabetes Federation. www.diabetesatlas.org

- Jäger, A. K. (2015). Medicinal Plant Research: A Reflection on Translational Tasks. In M. Heinrich & A. K. Jäger (Eds.), *Ethnopharmacology* (1st ed., pp. 11–16). John Wiley & Sons, Ltd.
- Jaghabir, M. (1991). Hypoglycemic effects of *Eryngium creticum*. *Archives of Pharmacal Research*, *14*(4), 295–297. <https://doi.org/10.1007/BF02876873>
- Jarald, E., Joshi, S. B., & Jain, D. C. (2008). Diabetes and herbal medicines. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, *7*(1), 97–106.
- Jaramillo, B., Duarte, E., & Martelo, I. (2011). Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *16*(2), 140–150. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000200003
- Jarić, S., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., & Pavlović, P. (2015). An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, *175*, 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.002>
- Jayanthi, G., & Subramanian, S. (2014). Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet - STZ induced experimental diabetes mellitus. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, *4*(3), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.03.006>
- Kasabri, V., AbuDahab, R., Afifi, F., Naffa, R., & Majdalawi, L. (2012). Modulation of pancreatic MIN6 insulin secretion and proliferation and extrapancreatic glucose absorption with *Achillea santolina*, *Eryngium creticum* and *Pistacia atlantica* extracts: in vitro evaluation. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, *2*(3), 1. <https://doi.org/10.5455/jeim.120612.or.036>
- Kasabri, V., Afifi, F. U. F. U., & Hamdan, I. (2011). Evaluation of the acute antihyperglycemic effects of four selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Pharmaceutical Biology*, *49*(7), 687–695. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.539619>
- Kazeem, M. I., & Davies, T. C. (2016). Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. *Journal of Functional Foods*, *20*, 122–138. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.013>
- Khani, S., Abdollahi, M., Asadi, Z., Nazeri, M., Nasiri, M., Yusefi, H., Moghadam, A., & Heidari, H. (2021). Hypoglycemic, hepatoprotective, and hypolipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Eryngium billardieri* root on nicotinamide/streptozotocin-induced type II diabetic rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *16*(2), 193–202. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.310526>
- Khoramipour, K., Chamari, K., Hekmatikar, A. A., Ziyaiyan, A., Taherkhani, S., Elguindy, N. M., & Bragazzi, N. L. (2021). Adiponectin: Structure, Physiological Functions, Role in Diseases, and Effects of Nutrition. *Nutrients*, *13*(1180), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu13041180>
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., & Thiem, B. (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, *34*(6), 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1011-1>
- Kikowska, M., Dworacka, M., Kędziora, I., & Thiem, B. (2016). *Eryngium creticum* – Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological activity. A review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *26*(3), 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.008>
- Kim, W., & Egan, J. M. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*, *60*(4), 470–512. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000604>

- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., & Sato, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), 511–516. <https://doi.org/10.1111/jdi.12094>
- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65(3), 385–411. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005>
- Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myers, M. G., Wallberg-Henriksson, H., & Zierath, J. R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 49(2), 284–292. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.2.284>
- Latini, G., Marcovecchio, M. L., Del Vecchio, A., Gallo, F., Bertino, E., & Chiarelli, F. (2009). Influence of environment on insulin sensitivity. *Environment International*, 35(6), 987–993. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.03.008>
- Lee, S.-Y., Lai, F.-Y., Shi, L.-S., Chou, Y.-C., Yen, I.-C., & Chang, T.-C. (2015). Rhodiola crenulata extract suppresses hepatic gluconeogenesis via activation of the AMPK pathway. *Phytomedicine*, 22(4), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.01.016>
- Leroux-stewart, J., Rabasa-lhoret, R., & Chiasson, J. (2015). α -Glucosidase inhibitors. In R. A. DeFronzo, E. Ferrannini, P. Zimmet, & G. Alberti (Eds.), *International Textbook of Diabetes Mellitus* (4th ed., pp. 673–685). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/DOI:10.1002/9781118387658>
- Lorenzati, B., Zucco, C., Miglietta, S., Lamberti, F., & Bruno, G. (2010). Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action. *Pharmaceuticals*, 3(9), 3005–3020. <https://doi.org/10.3390/ph3093005>
- Luo, H., Wang, L. F., Imoto, T., & Hiji, Y. (2001). Inhibitory effect and mechanism of acarbose combined with gymnemic acid on maltose absorption in rat intestine. *World Journal of Gastroenterology*, 7(1), 9–15. <https://doi.org/10.3748/WJG.V7.I1.9>
- Mackenzie, R. W. W. A., & Elliott, B. T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 55–64. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>
- Maffettone, A., Rinaldi, M., & Fontanella, A. (2018). Postprandial hyperglycemia: A new frontier in diabetes management? *Italian Journal of Medicine*, 12(2), 108–115. <https://doi.org/10.4081/itjm.2018.961>
- Mahmoudi, F. F., Mahmoudi, F. F., Gollo, K. H. K. H., & Amini, M. M. M. (2020). Biosynthesis of Novel Silver Nanoparticles Using *Eryngium thyrsoideum* Boiss Extract and Comparison of their Antidiabetic Activity with Chemical Synthesized Silver Nanoparticles in Diabetic Rats. *Biological Trace Element Research*, 199(5), 1967–1978. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02315-4>
- Mahmoudi, F., Mahmoudi, F., Gollo, K. H., & Amini, M. M. (2021). Novel Gold Nanoparticles: Green Synthesis with *Eryngium thyrsoideum* Boiss Extract, Characterization, and In Vivo Investigations on Inflammatory Gene Expression and Biochemical Parameters in Type 2 Diabetic Rats. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02819-7>
- Makheswari, U., & Sudarsanam, D. (2011). Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Research in Pharmacy*, 1(4), 28–37.
- Malik, T., Pandey, D. K., Roy, P., & Okram, A. (2016). Evaluation of Phytochemicals, Antioxidant, Antibacterial and Antidiabetic Potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* Plants of Manipur (India). *Pharmacognosy Journal*, 8(5), 459–464. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.5.8>

- Manjunatha, L., Kumar, V., Sannabommaji, T., Vijendra, P. D., J. R., & Gajula, H. (2019). In vitro antioxidant and antidiabetic properties of *Eryngium foetidum* Linn. *Biomedicine*, *39*(4), 2019. www.biomedicineonline.org
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-buys, D., Novelli, M., & 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*, 215. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00215>
- Matsuda, M., & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, *22*(9), 1462–1470. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>
- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., & Osajima, Y. (1996). In Vitro Survey of α - Glucosidase Inhibitory Food Components. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *60*(12), 2019–2022. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.2019>
- Mazidi, M., Kengne, A. P., George, E. S., & Siervo, M. (2021). The association of red meat intake with inflammation and circulating intermediate biomarkers of type 2 diabetes is mediated by central adiposity. *British Journal of Nutrition*, *125*(9), 1043–1050. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002149>
- Mazzola, N. (2012). Review of current and emerging therapies in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Managed Care*, *18*(1 Suppl), S17-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559854>
- Mcclenaghan, N. H., & Flatt, P. R. (2015). Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon. In A. W. Norman & H. L. Henry (Eds.), *Hormones* (3rd ed., pp. 109–139). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091906-5.00006-9>
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>
- Miranda-Velásquez, L. G. (2010). *Actividad hipocolesterolémica de plantas de uso etnobotánico en México [Tesis de doctorado]*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mlinar, B., Marc, J., Janez, A., & Pfeifer, M. (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *375*(1–2), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.005>
- Monzillo, L. U., & Hamdy, O. (2003). Evaluation of Insulin Sensitivity in Clinical Practice and in Research Settings. *Nutrition Reviews*, *61*(12), 397–412. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.dec.397-412>
- Naik, S. R., & Kokil, G. R. (2013). Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 39, pp. 431–466). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00012-6>
- Natali, A., & Ferrannini, E. (2006). Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetologia*, *49*(3), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0141-7>
- National Institute for Biological Standards and Control. (2010). *WHO International Standard: Insulin*,

Human. Version 4.0. NIBSC code: 83/500 [monograph on the Internet]. National Institute for Biological Standards and Control. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/83-500.pdf>

- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97(August 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Ngo, Y. L., Lau, C. H., & Chua, L. S. (2018). Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 121(June), 687–700. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>
- Ning, J., Hong, T., Yang, X., Mei, S., Liu, Z., Liu, H. Y., & Cao, W. (2011). Insulin and insulin signaling play a critical role in fat induction of insulin resistance in mouse. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(2), 391–401. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00164.2011>
- Nirmalan, N., & Nirmalan, M. (2017). Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 18(10), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.06.019>
- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Ávila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2012). Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry Research International*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/603501>
- Noriega-Cisneros, R., Pena-Montes, D. J. D. J., Huerta-Cervantes, M., Torres-Martinez, R., Huerta, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2020). *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes. *Journal of Medicinal Food*, 23(8), 827–833. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0189>
- OECD. (2019). *Health at a Glance 2019: OECD Indicators*. OECD Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>
- Oyagbemi, A. A., Salihu, M., Oguntibeju, O. O., Esterhuyse, A. J., & Farombi, E. O. (2014). Some selected medicinal plants with antidiabetic potentials. In O. O. Oguntibeju (Ed.), *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health* (pp. 95–113). <https://doi.org/10.5772/57230>
- Palá-Paúl, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica [Tesis de doctorado]*. Universidad Complutense de Madrid.
- Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Vadaré, J., Villa, A. M., Sanz, J., & Brophy, J. J. (2005). Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain. *Journal of Chromatography A*, 1074(1–2), 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.036>
- Pan, Z., Yang, Y., & Zhang, J. (2020). Efficacy and safety of DPP-IV inhibitors combined with basal insulin in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes*. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.13119>
- Patarrão, R. S., Wayne Lutt, W., & Paula Macedo, M. (2014). Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 9(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2013.10.004>
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K., & Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 54(6), 863–880. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0974-2>

- Paul, J. H. A., Seaforth, C. E., & Tikasingh, T. (2011). *Eryngium foetidum* L.: A review. *Fitoterapia*, 82(3), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.010>
- Paun, G., Neagu, E., Moroeanu, V., Albu, C., Savin, S., & Lucian Radu, G. (2019). Chemical and Bioactivity Evaluation of *Eryngium planum* and *Cnicus benedictus* Polyphenolic-Rich Extracts. *BioMed Research International*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/3692605>
- Peña-Montes, D. J. D., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Huerta, M., Noriega-Cisneros, R., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2019). Protective Effect of the Hexanic Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences In Vitro, in Yeast, and in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Antioxidants*, 8(3), 73. <https://doi.org/10.3390/antiox8030073>
- Pereira, C. G. G., Locatelli, M., Innosa, D., Cacciagrano, F., Polesná, L., Santos, T. F. F., Rodrigues, M. J. J., & Custódio, L. (2019). Unravelling the potential of the medicinal halophyte *Eryngium maritimum* L.: In vitro inhibition of diabetes-related enzymes, antioxidant potential, polyphenolic profile and mineral composition. *South African Journal of Botany*, 120, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.013>
- Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *Journal of Functional Foods*, 20, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.024>
- Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2006). Etiology of Insulin Resistance. *The American Journal of Medicine*, 119(5), S10–S16. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.01.009>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Plants of the World Online (POWO). (2021). *Eryngium cymosum* F.Delaroche. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/841746-1#source-KBD>
- Polat, R., & Satil, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir - Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 626–641. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.004>
- Powers, A. C., Stafford, J. M., & Rickels, M. R. (2018). Diabetes Mellitus: Complications. In J. L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1183992628>
- Ramlo-Halsted, B. A., & Edelman, S. V. (2000). The Natural History of Type 2 Diabetes: Practical Points to Consider in Developing Prevention and Treatment Strategies. *Clinical Diabetes*, 18(2).
- Reddy, S., & Zhang, S. (2013). Polypharmacology: Drug discovery for the future. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 6(1), 41–47. <https://doi.org/10.1586/ECP.12.74>
- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rewers, A. (2018). Acute Metabolic Complications in Diabetes. In C. C. Cowie, S. S. Casagrande, A. Menke, M. A. Cissell, M. S. Eberhardt, J. B. Meigs, E. W. Gregg, W. C. Knowler, E. Barrett-Connor, D. J. Becker, F. L. Brancati, E. J. Boyko, W. H. Herman, B. V. Howard, K. M. V. Narayan, M. Rewers, & J. E. Fradkin (Eds.), *Diabetes in America* (3rd ed., pp. 1–19). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US).
- Rizza, R. A. (2010). Pathogenesis of Fasting and Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetes:

- Implications for Therapy. *Diabetes*, 59(11), 2697–2707. <https://doi.org/10.2337/db10-1032>
- Roden, M., & Shulman, G. I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, 576, 51–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1797-8>
- Rozenberg, K., & Rosenzweig, T. (2018). Sarcopoterium spinosum extract improved insulin sensitivity in mice models of glucose intolerance and diabetes. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196736>
- Sadiq, A., Rashid, U., Ahmad, S., Zahoor, M., AlAjmi, M. F., Ullah, R., Noman, O. M., Ullah, F., Ayaz, M., Khan, I., Islam, Z.-U., & Ali, W. (2020). Treating Hyperglycemia From *Eryngium caeruleum* M. Bieb: In-vitro α -Glucosidase, Antioxidant, in-vivo Antidiabetic and Molecular Docking-Based Approaches. *Frontiers in Chemistry*, 8, 558641. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.558641>
- Salau, V. F., Erukainure, O. L., & Islam, M. S. (2020). Caffeic Acid Protects against Iron-Induced Cardiotoxicity by Suppressing Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Modulating Lipid Spectrum, Gluconeogenesis and Nucleotide Hydrolyzing Enzyme Activities. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02227-3>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Samuel, V. T., Beddow, S. a, Iwasaki, T., Zhang, X.-M., Chu, X., Still, C. D., Gerhard, G. S., & Shulman, G. I. (2009). Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 12121–12126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812547106>
- Santos, A., Magro, D. O., Evangelista-Poderoso, R., & Saad, M. J. A. (2021). Diabetes, obesity, and insulin resistance in COVID-19: molecular interrelationship and therapeutic implications. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00639-2>
- Schmeltz, L., & Metzger, B. (2007). Diabetes/Syndrome X. In J. Taylor & D. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (2nd ed., pp. 417–458). Elsevier Ltd.
- Schultze, S. M., Hemmings, B. A., Niessen, M., & Tschopp, O. (2012). PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002109>
- Seino, S., Takahashi, H., Takahashi, T., & Shibusaki, T. (2012). Treating diabetes today: A matter of selectivity of sulphonylureas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(Suppl. 1), 9–13. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01507.x>
- Semaan, D. G., Igoli, J. O., Young, L., Gray, A. I., Rowan, E. G., & Marrero, E. (2018). In vitro anti-diabetic effect of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on the glucose uptake assays by HepG2, L6, 3T3-L1 and fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 216, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.014>
- Semaan, D. G., Igoli, J. O., Young, L., Marrero, E., Gray, A. I., & Rowan, E. G. (2017). In vitro anti-diabetic activity of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on PTP1B, DPPIV, alpha-glucosidase and alpha-amylase enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 203(March), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.023>
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J., & Rivera-Dommarco, J. (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.

- Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., & Roth, J. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, *31*(Suppl 2), S262–S268. <https://doi.org/10.2337/dc08-s264>
- Sharabi, K., Tavares, C., Rines, A., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects of Medicine*, *46*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
- Sharma, B., Mittal, A., & Dabur, R. (2018). Mechanistic approach of anti-diabetic compounds identified from natural sources. *Chem Biol Lett*, *5*(2), 63–99. <https://doi.org/10.2174/092986706776360860>
- Singh, S. B. (2012). Pharmaceuticals: Natural Products and Natural Product Models. In N. Civjan (Ed.), *Natural Products in Chemical Biology* (1st ed., pp. 289–324). John Wiley & Sons, Inc.
- Song, T., & Jo, J. (2019). Tripartite cell networks for glucose homeostasis. *Physical Biology*, *16*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ab2a9d>
- Soumia, B. (2018). *Eryngium campestre* L.: Polyphenolic and flavonoid compounds; applications to health and disease. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 69–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00007-6>
- Subramoniam, A. (2016). *Plants with anti-diabetes mellitus properties*. CRC Press.
- Sun, J., Wang, Y., Fu, X., Chen, Y., Wang, D., Li, W., Xing, S., & Li, G. (2015). Magnolia officinalis Extract Contains Potent Inhibitors against PTP1B and Attenuates Hyperglycemia in db/db Mice. *BioMed Research International*, *2015*, 139451. <https://doi.org/10.1155/2015/139451>
- Szablewski, L. (2011). Glucose Homeostasis – Mechanism and Defects. In E. Rigobelo (Ed.), *Diabetes - Damages and Treatments* (Issue November). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/22905>
- Tashima, Y., & Yoshimura, N. (1975). Control of rabbit liver fructose-1, 6-diphosphatase activity by magnesium ions. *Journal of Biochemistry*, *78*(6), 1161–1169. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131012>
- Toma, L., Stancu, C. S., & Sima, A. V. (2021). Endothelial dysfunction in diabetes is aggravated by glycated lipoproteins; novel molecular therapies. *Biomedicines*, *9*(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010018>
- Toro-Rivera, G. (2017). *Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de la hierba de sapo (Eryngium calinae Delar F.) (Umbelliferae) [Tesis de licenciatura]*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Un, J. J., Lee, M. K., Yong, B. P., Jeon, S. M., & Choi, M. S. (2006). Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(2), 476–483. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105163>
- van Poelje, P. D., Dang, Q., & Erion, M. D. (2007). Fructose-1,6-bisphosphatase as a therapeutic target for type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *4*(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2007.10.003>
- Vinayagam, R., Xiao, J., & Xu, B. (2017). An insight into anti-diabetic properties of dietary phytochemicals. *Phytochem Rev*. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9496-2>
- Viollet, B., Lantier, L., Devin-leclerc, J., Hébrard, S., Mounier, R., Foretz, M., & Andreelli, F. (2009). Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*, *14*(1), 3380–3400.

- Vuong, T., Martineau, L. C., Ramassamy, C., Matar, C., & Haddad, P. S. (2007). Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(9), 956–965. <https://doi.org/10.1139/Y07-090>
- Wallace, T. M., Levy, J. C., & Matthews, D. R. (2004). Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*, 27(6), 1487–1495. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.6.1487>
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G., & Li, S. (2012). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3(1), 99–120. <https://doi.org/10.2174/2210290601203010099>
- Weber, J.-M. (2001). Energy Cycle in Vertebrates. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–4). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001820>
- World Health Organization. (2019a). *Classification of diabetes mellitus*. World Health Organization (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
- World Health Organization. (2019b). *WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019*. World Health Organization (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
- World Health Organization. (2020). *Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes (HEARTS-D)*. World Health Organization (WHO/UCN/NCD/20.1).
- World Health Organization. (2021a). *Obesity*. <https://www.who.int/health-topics/obesity>
- World Health Organization. (2021b). *Traditional, Complementary and Integrative Medicine*. <https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine>
- Wu, C., Okar, D. A., Kang, J., & Lange, A. J. (2005). Reduction of Hepatic Glucose Production as a Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes. *Current Drug Targets -Immune Endocrine & Metabolic Disorders*, 5, 51–59.
- Yang, J. L., Ha, T. K. Q., Lee, B. W., Kim, J., & Oh, W. K. (2017). PTP1B inhibitors from the seeds of *Iris sanguinea* and their insulin mimetic activities via AMPK and ACC phosphorylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(22), 5076–5081. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.031>
- Yaniv, Z., Dafnib, A., Friedman, J., & Palevitch, D. A. N. (1987). Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(1165), 145–151. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90038-9)
- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine*, 7(1), 14–24. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0262-6>
- Yoshida, T., Okuno, A., Izumi, M., Takahashi, K., Hagsiawa, Y., Ohsumi, J., & Fujiwara, T. (2008). CS-917, a fructose 1,6-bisphosphatase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia after meal loading in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *European Journal of Pharmacology*, 601(1–3), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.050>
- Zakłós-Szyda, M., & Pawlik, N. (2018). Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) fruit polyphenolic extract modulates carbohydrate metabolism in HepG2 cells via AMP-activated protein kinase. *Acta Biochimica Polonica*, 65(1), 67–78. https://doi.org/10.18388/abp.2017_1604
- Zhang, Q., Cui, Q., Hou, Y., Wang, H., Xu, Y., & Pi, J. (2017). The impairment of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells caused by prolonged glucotoxicity and lipotoxicity is associated with elevated adaptive antioxidant response. *Food and Chemical Toxicology*, 100, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.016>

Zhang, X., Lv, Q., Jia, S., Chen, Y., Sun, C., Li, X., & Chen, K. (2016). Effects of flavonoid-rich Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruit extract on regulating glucose and lipid metabolism in diabetic KK-Ay mice. *Food and Function*, 7(7), 3130–3140.
<https://doi.org/10.1039/c6fo00397d>

12 Anexos

12.1 Carta de aprobación del comité de Bioética de la CEARC



FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias, UNAM
Cto. Exterior s/n, C.U., 04510
Ciudad de México, CDMX

Folio: T_2019_09_005.

Nombre de la comisión: Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias.

Nombre del autor del protocolo: M. en C. Fernanda Artemisa Espinoza Hernández.

Título del proyecto: Estudio del mecanismo hipoglucemiante de *Eryngium cymosum* F. Delaroche.

Fecha de recepción: 12 de septiembre de 2019.

Nombre de la institución y sede de la investigación: Facultad de Ciencias, UNAM.

Estimado Dr. Adolfo Andrade Cetto.

El subcomité de Bioética de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias revisó el protocolo arriba mencionado, de acuerdo a la información proporcionada, el comité resolvió que tanto la metodología como los procedimientos de la investigación cumplen con los lineamientos bioéticos relacionados con el uso y manejo de animales de laboratorio.

Los miembros del comité dan un dictamen favorable sobre la investigación y las forma de aplicación de los procedimientos.

Dictamen: APROBADO

A T E N T A M E N T E

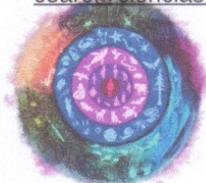
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, CDMX, a 4 de noviembre de 2019.

Dr. Ricardo Noguera Solano

Coordinador de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM

cearc@ciencias.unam.mx



CEARC
Comisión de Ética Académica
y Responsabilidad Científica
FC - UNAM



12.2 Información nutrimental de Nutricubos Purina®



Análisis de Garantía

Humedad	12.0 % máx.	Proteína	23.0 % mín.
Grasa	3.0 % mín.	Fibra	6.0 % máx.
Cenizas	7.0 % máx.	E.L.N.	49.0 % P. Dif.
Calcio	1.0 % mín.	Fósforo	0.6 % mín.

Ingredientes: cereales molidos, combinación de pasta de oleaginosas, harina de pescado, subproductos de cereales, alfalfa, melaza de caña.

Vitaminas: vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, niacina, cloruro de colina, pantotenato de calcio, vitamina B12, vitamina D, vitamina E, vitamina K.

Minerales: fosfato dicálcico, roca fosfórica, carbonato de calcio, cloruro de sodio, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, yodato de calcio, tiosulfato de sodio, óxido de zinc.

Aditivos: saborizante vegetal, fungicida a base de ácido propiónico.

Indicaciones: dieta para roedores con fórmula constante recomendada para ratas, ratones y hamsters. La fórmula está diseñada para minimizar las variaciones nutricionales en los estudios a largo plazo. Este alimento está formulado en base a la nutrición del ciclo de vida completo de los roedores mencionados, pero no está diseñado para maximizar la producción de colonias reproductoras. Las ratas adultas comerán entre 12 a 15 gr por día y los ratones adultos comerán entre 4 y 5 gr por día. Los hamsters adultos comerán entre 10 y 14 gr por día.

Recomendaciones:

- Mantener el producto en un lugar seco y fresco, lejos del alcance de insectos y roedores.
- No ofrezca el producto si se enlamea, cambia de apariencia o color
- Este producto no contiene proteína de origen rumiante u otros ingredientes de origen rumiante.

Consulte al Médico Veterinario

Lote No.

Fecha de Caducidad



Elaborado por:

Agribrands Purina México, S.A. de C.V.
Prol. P de la Reforma 1015, Torre A, 3er. Piso
Col. Desarrollo Sta. Fe Delegación Álvaro Obregón
C.P. 01376 México, D.F.

12.3 Tablas de resultados

Tabla 10. Niveles de glucosa sanguínea en las curvas de glucosa de 3 h.

Grupo	Glucosa sanguínea (mg/dl)			
	0 min	60 min	120 min	180 min
N	99 ± 3 ^b	105 ± 4 ^c	103 ± 2 ^c	103 ± 1 ^c
H	200 ± 3 ^a	213 ± 5 ^a	210 ± 4 ^a	199 ± 4 ^a
HG	192 ± 5 ^a	123 ± 7 ^{c*}	97 ± 4 ^{c*}	99 ± 6 ^{c*}
HE⁴⁷	190 ± 7 ^a	173 ± 8 ^b	148 ± 5 ^{b*}	137 ± 4 ^{b*}
HE⁴⁷⁰	192 ± 5 ^a	180 ± 8 ^b	147 ± 7 ^{b*}	125 ± 5 ^{b*}

Medias ± SEM; $n = 6$. Comparación intragrupal (filas): *indica diferencia significativa vs. Su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). Comparación intergrupala (columnas): letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos en cada tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c$). N, control no hiperglucémico; H, control hiperglucémico negativo; HG, control hiperglucémico positivo (glibenclamida; 5 mg/kg); HE⁴⁷, grupo hiperglucémico experimental (extracto; 47 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglucémico experimental (extracto; 470 mg/kg).

Tabla 11. Niveles de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a piruvato.

Grupo	Glucosa sanguínea (mg/dl)				
	0 min	45 min	75 min	105 min	135 min
N	98 ± 3 ^b	176 ± 10 ^{d*}	160 ± 7 ^{c*}	135 ± 6 ^{b*}	118 ± 5 ^{b*}
H	213 ± 8 ^a	389 ± 17 ^{a*}	379 ± 17 ^{a*}	377 ± 16 ^{a*}	363 ± 11 ^{a*}
HM	195 ± 4 ^a	224 ± 12 ^c	172 ± 12 ^c	148 ± 16 ^{b*}	116 ± 11 ^{b*}
HE⁴⁷⁰	199 ± 7 ^a	313 ± 13 ^{b*}	299 ± 14 ^{b*}	301 ± 18 ^{a*}	290 ± 22 ^{a*}

Medias ± SEM; $n = 6$. Comparación intragrupal (filas): *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). Comparación intergrupala (columnas): letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos en cada tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c > d$). N, control no hiperglucémico; H, control hiperglucémico negativo; HM, control hiperglucémico positivo (metformina; 500 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglucémico experimental (extracto; 470 mg/kg).

Tabla 12. Niveles de glucosa sanguínea en las pruebas de tolerancia a maltosa.

Grupo	Glucosa sanguínea (mg/dl)			
	0 min	35 min	65 min	95 min
N	121 ± 2 ^b	188 ± 3 ^{c*}	170 ± 3 ^{c*}	163 ± 4 ^{c*}
H	185 ± 2 ^a	322 ± 19 ^{a*}	370 ± 12 ^{a*}	310 ± 13 ^{a*}
HA	186 ± 3 ^a	238 ± 16 ^{bc*}	267 ± 20 ^{b*}	265 ± 16 ^{ab*}
HE ⁴⁷⁰	181 ± 2 ^a	266 ± 23 ^{ab*}	273 ± 20 ^{b*}	243 ± 14 ^{b*}

Medias ± SEM; $n = 6$. Comparación intragrupal (filas): *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). Comparación intergrupala (columnas): letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos en cada tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c$). N, control no hiperglucémico; H, control hiperglucémico negativo; HA, control hiperglucémico positivo (acarbosea; 3 mg/kg); HE⁴⁷⁰, grupo hiperglucémico experimental (extracto; 470 mg/kg).

Tabla 13. Niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática en ayuno.

Grupo	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Glucosa sanguínea (mg/dl)					
C	107 ± 3 ^a	106 ± 2 ^a	104 ± 2 ^a	98 ± 3 ^{a*}	98 ± 3 ^{a*}
G	95 ± 3 ^b	98 ± 3 ^a	77 ± 3 ^{c*}	60 ± 2 ^{b*}	61 ± 2 ^{b*}
E ⁴⁷⁰	100 ± 3 ^{ab}	101 ± 3 ^a	93 ± 2 ^b	91 ± 1 ^{a*}	90 ± 2 ^{a*}
Insulina plasmática (ng/ml)					
C	1.88 ± 0.14 ^a	1.63 ± 0.22 ^a	1.72 ± 0.20 ^a	1.84 ± 0.26 ^a	1.48 ± 0.19 ^{ab}
G	1.51 ± 0.24 ^a	1.57 ± 0.27 ^a	1.93 ± 0.27 ^{a*}	1.89 ± 0.33 ^a	2.28 ± 0.40 ^{a*}
E ⁴⁷⁰	1.36 ± 0.21 ^a	1.02 ± 0.15 ^a	0.86 ± 0.19 ^{b*}	0.89 ± 0.16 ^{b*}	0.96 ± 0.20 ^{b*}

Medias ± SEM; $n = 5$ Comparación intragrupal (filas): *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). Comparación intergrupala (columnas): letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos en cada tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c$). C, control negativo; G, control positivo (glibenclamida; 5 mg/kg); E⁴⁷⁰, grupo experimental (extracto; 470 mg/kg).

Tabla 14. Niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática en estado posprandial.

Grupo	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Glucosa sanguínea (mg/dl)					
C	107 ± 5 ^a	183 ± 11 ^{a*}	157 ± 11 ^{a*}	125 ± 7 ^{a*}	122 ± 7 ^{a*}
R	92 ± 5 ^a	118 ± 3 ^{c*}	74 ± 6 ^b	61 ± 2 ^{b*}	60 ± 2 ^{b*}
E ⁴⁷⁰	106 ± 3 ^a	151 ± 4 ^{b*}	142 ± 5 ^{a*}	114 ± 6 ^a	106 ± 5 ^a
Insulina plasmática (ng/ml)					
C	1.94 ± 0.35 ^a	4.09 ± 0.93 ^{ab}	3.38 ± 0.65 ^a	4.88 ± 1.07 ^a	2.45 ± 0.70 ^a
R	0.78 ± 0.19 ^b	6.53 ± 0.71 ^{a*}	2.86 ± 0.58 ^{a*}	2.26 ± 0.35 ^{ab*}	1.60 ± 0.19 ^{a*}
E ⁴⁷⁰	1.50 ± 0.13 ^a	2.22 ± 0.33 ^b	1.97 ± 0.31 ^a	1.33 ± 0.11 ^b	1.65 ± 0.12 ^a

Medias ± SEM; $n = 5$. Comparación intragrupal (filas): *indica diferencia significativa vs. su tiempo inicial (ANOVA de medidas repetidas, prueba *post hoc* de Dunnett; $p < 0.05$). Comparación intergrupala (columnas): letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos en cada tiempo (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$; $a > b > c$). C, control negativo; R, control positivo (repaglinida; 1 mg/kg); E⁴⁷⁰, grupo experimental (extracto; 470 mg/kg).

12.4 Artículo requisito para la obtención de grado

Journal of Ethnopharmacology 279 (2021) 114339



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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



Contribution of fasting and postprandial glucose-lowering mechanisms to the acute hypoglycemic effect of traditionally used *Eryngium cymosum* F. Delaroche

Fernanda Espinoza-Hernández^a, Adolfo Andrade-Cetto^{a,*}, Sonia Escandón-Rivera^a, Gerardo Mata-Torres^a, Rachel Mata^b

^a Laboratorio de Etnofarmacología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

^b Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N, Delegación Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Medicinal plants
Type 2 diabetes
Gluconeogenesis inhibition
Fructose 1,6-bisphosphatase inhibitors
Insulin sensitizers
Hypoglycaemic effect

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Eryngium cymosum* F. Delaroche was detected as a traditional remedy against type 2 diabetes consumed by patients of Tlanchinol in the state of Hidalgo, Mexico. Aim of the study. Assessing the hypoglycemic effect and safety of the traditional extract of *E. cymosum* and relating it to key glucose-lowering mechanisms both in fasting and postprandial state.

Materials and methods: The aqueous extract of *E. cymosum* was subjected to HPLC analysis to identify its main components. Hyperglycaemic STZ-NA Wistar rats were administered with the extract to evaluate its effect on blood glucose levels and a possible dose-dependence. Afterward, it was evaluated in both pyruvate and maltose tolerance tests in STZ-NA rats to characterize its effect on gluconeogenesis and carbohydrate breakdown, two of the main mechanisms responsible for fasting and postprandial hyperglycaemia in type 2 diabetes patients. In addition, the inhibitory capacity of the extract was evaluated on key enzymes involved in gluconeogenesis and aglucosidases. Moreover, insulin concentrations were measured in normoglycemic rats in both conditions to establish a link between the hypoglycaemic effect of the extract with insulin release and functioning.

Results: Caffeic acid (1), chlorogenic acid (2), and rosmarinic acid (3) were identified as the main constituents of the aqueous extract of *E. cymosum*, which exerted a hypoglycaemic effect in hyperglycaemic STZ-NA rats. It has a significant antihyperglycaemic effect in the pyruvate tolerance test, and it was able to reduce the postprandial hyperglycaemia in maltose tolerance tests significantly. Moreover, it effectively reduced the activity of both gluconeogenic enzymes reaching almost 100% of inhibition, while it presented a modest 32% inhibition of aglucosidases. On the other hand, the extract decreased insulin levels after its oral administration in healthy rats in both nutritional states, without affecting normoglycemia in normal curves and reducing the postprandial peak in glucose load curves.

Conclusions: The traditional consumed form of aerial parts of *E. cymosum* is safe and regulated glucose levels both in fasting and in postprandial state.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a complex illness characterized by abnormalities in carbohydrate, lipid, and protein metabolism due to insulin malfunctioning in peripheral tissues, a phenomenon known as insulin resistance (IR), and impaired insulin secretion (American Diabetes

Association, 2021). According to the International Diabetes Federation (2019) all cases of diabetes have increased in recent years, reaching almost half a billion people in 2019, of which T2D comprises almost 90% of them. The main feature of diabetes is hyperglycemia, whose long-term uncontrolled treatment leads to vascular complications that impair the patients' quality of life, causing their premature death (Forbes and Cooper, 2013; World Health Organization, 2020). Therefore,

* Corresponding author.

E-mail addresses: f.artemis.ahdz@ciencias.unam.mx (F. Espinoza-Hernández), aac@ciencias.unam.mx (A. Andrade-Cetto), soniaer@ciencias.unam.mx (S. Escandón-Rivera), gerardom.torres@ciencias.unam.mx (G. Mata-Torres), rachel@unam.mx (R. Mata).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114339>

Received 18 March 2021; Received in revised form 10 June 2021; Accepted 13 June 2021

Available online 21 June 2021

0378-8741/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Glossary			
T2D	type 2 diabetes	G6Pase	glucose 6-phosphatase
IR	insulin resistance	G6P	glucose 6-phosphate
HbA1c	glycated hemoglobin	FBPase	fructose 1,6-bisphosphatase
CEARC	Academic Ethics and Scientific Responsibility Commission	F1,6BP	fructose 1,6-bisphosphate
STZ	streptozotocin	AMP	adenosine 5'-monophosphate
NA	nicotinamide	p-NPGP	4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside
OGTT	oral glucose tolerance test	AUC	area under curve
ISI	insulin sensitivity index (Matsuda index)	PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
FBG	fasting blood glucose	HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance
FI	fasting insulin	DPP-IV	dipeptidyl peptidase IV
BG _{mean}	mean of blood glucose in OGTT	PTP-1B	protein tyrosine phosphatase 1B
I _{mean}	mean of insulin in OGTT	AMPK	AMP-activated protein kinase
		GLUT2	glucose transporter 2
		GLUT4	glucose transporter 4

adequate control of blood glucose levels is necessary to improve the patient's life by delaying these mortal consequences.

The core of T2D management involves lifestyle changes through exercise and improved eating habits, and the administration of hypoglycemic agents (Gökçay Canpolat and Şahin, 2020). Over the years, multiple types of drugs have been developed to correct the pathophysiological defects caused by the metabolic imbalance in T2D (Chaudhury et al., 2017; Cheng and Fantus, 2005; DeFronzo, 2009; Nolan et al., 2011). Specifically, two different yet complementary approaches have been used to diminish the hyperglycemia triggered by IR in T2D patients (Maffettone et al., 2018; Monnier et al., 2003; Rizza, 2010): decreasing impaired endogenous glucose production that mainly contributes to fasting hyperglycemic state (Cersosimo et al., 2018), and lowering glycaemic excursions in a postprandial hyperglycemic state by delaying the digestion of complex carbohydrates (Leroux-stewart et al., 2015), stimulating insulin release or enhancing glucose disposal (insulin sensitivity). Both therapeutic approaches have the ultimate objective of decreasing glycated hemoglobin A1C (HbA1c), whose reduction is related to delay the apparition of long-term complications related to T2D (Upadhyay et al., 2018).

In developing countries such as Mexico, diabetic patients usually consume medicinal plants in addition to conventional drug treatment (Andrade-Cetto et al., 2006; Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). This common practice has been maintained worldwide due to historical and cultural reasons for different diseases (World Health Organization, 1999). It is estimated that around 800 medicinal plants are currently used in Mexico for treating diabetes (Escandón-Rivera et al., 2020); however, only some of them have scientific studies to support their hypoglycemic activity or mechanism of action.

Eryngium L. is the largest and most complex genus of the family Apiaceae, comprising about 250 species distributed in every continent's temperate regions (Calviño et al., 2008). It has numerous species with assorted medicinal uses throughout the world (Choudhury et al., 2014; Clement et al., 2007; Flamini et al., 2008; Jarić et al., 2015; Palá-Paül, 2002; Paul et al., 2011; Polat and Satil, 2012; Soumia, 2018). Regarding diabetes, it has been reported the traditional usage of *E. foetidum* L. (Andrade et al., 2020; Paul et al., 2011), *E. ilicifolium* Lam (Barkaoui et al., 2017), and *E. thyrsoideum* Boiss. (Mahmoudi et al., 2020). In Mexico, *E. heterophyllum* Engel. and *E. carlinae* F. Delaroché (both known as "hierba del sapo") are popularly used for treating diabetes and dyslipidemias; however, while both did have an hypocholesterolemic effect (Almonte-Flores, 2015; Castro-Torres et al., 2017; Miranda-Velásquez, 2010; Noriega-Cisneros et al., 2020), none of them presented an effect on blood glucose levels (Carreón-Sánchez et al., 2013; Noriega-Cisneros et al., 2012).

Since 1994, our group detected that *Eryngium cymosum* F. Delaroché (Apiaceae) is one of the most important medicinal plants used for treating diabetes in the municipalities of Tlanchinol and Huejutla de

Reyes, Hidalgo. At that time, the plant already had a well-established reputation among the healers and patients for treating the disease. Specifically, the healer Isabel Escalante (RIP) recommended the plant to his patients, who have been using the plant for many years since then (data not published).

The plant is described as a robust perennial herb with solitary erect stems; numerous linear-lanceolate basal leaves (coriaceous), 20–60 cm long; blades with dilated base, sharp apex, spiny-serrated with extended teeth; inflorescence in the form of a branched top with numerous heads, pedunculated, and globose to hemispherical heads. It grows on slopes and understory of coniferous forests, between 2000 and 3200 m of altitude; it flowers from July to October. Its distribution is known in the State of Mexico, Guerrero, Hidalgo, and Michoacan (García-Ruiz, 2013). The healers or diabetic people buy the plant from the Huejutla market or collect the fresh plant in the river near Huejutla; therefore, we performed a market study to document the use of this species. Moreover, since there is no previous research supporting the hypoglycemic effect of *E. cymosum*, we aimed to assess the impact of its traditional extract on blood glucose levels and to characterize its effect on key glucose-lowering mechanisms both in fasting and in postprandial state, such as the inhibition of gluconeogenesis and carbohydrate breakdown, and the increase of insulin release and sensitivity.

2. Methods and materials

2.1. Field study

The Municipality of Huejutla de Reyes is in the north of the Hidalgo state, between the parallels 21°08' N and 98°25' W, at an altitude of 140 m a.s.l. The name came from the Náhuatl: *huexotl*, "willow" and *tlán*, "place", which means "place where willows abound". About 66% of the inhabitants speak "Náhuatl, Otomí or Huastec" languages (Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002). Because it is situated in "hot land" (annual average temperature of 31 °C) (Ayuntamiento de Huejutla de Reyes, 2010), people from the nearby colder areas, such as "Tlanchinol" and "Orizatlan", go to the market to buy and sell products, including medicinal plants. We detected that *E. cymosum* was used by the healer Isabel Escalante (RIP) to treat T2D patients. The healer had a good reputation, and patients from all over came to see him. Through direct previous interviews to the patients, we noticed that they usually buy the plant in the Huejutla market, while the healer used to buy the plant in the same market or collect it in the nearby river.

Following the methodology proposed by Bye and Linares (1983), medicinal plant sellers from the Huejutla market were interviewed to know how the plant is used and locate the area where it is usually harvested for later sale. In several visits between 2016 and 2020, which covered the two main seasons of rain and drought, free-listing interviews were applied, then semi-structured questionnaires were used by which

the following data was collected: **Plant Information:** local name, used part, uses, preparations, recipes, doses, and way of collection (Albuquerque et al., 2014); and **Trade Information:** how often the plant is collected, how often it is sold, and how often people come back to buy it. The informants agreed with the Prior Informed Consent (PIC) and thereafter the Consensus Statement on Ethnopharmacological Field Studies – ConSEFS was followed (Heinrich et al., 2018).

The botanical description of the plant can be consulted at the website of [Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad \(2021\)](#). It is important to remark that this species is native of Mexico, so we consider that it is valuable to understand and document its uses.

2.2. Chemicals and reagents

Standards of caffeic (C0625), chlorogenic (C3878) and rosmarinic (R4033) acids, as well as nicotinamide (N0636), streptozotocin (S0130), sodium pyruvate (P2256), maltose (M5885), glucose (G7021), sucrose (S7903), EDTA (EDS), HEPES (H3375), imidazole (I0250), SDS (L3771), ascorbic acid (A7506), malachite green (M6880), TWEEN 20 (P1379), Tris-HCl (T3253), MgCl₂ (M9272), glucose 6-phosphate (G7879), fructose 1,6-bisphosphate (F6803), adenosine 5'-monophosphate (A2252), 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (N1377), and intestinal acetone powders from rat (I1630) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium molybdate (AT0330-5) was bought from Tecsiquim (Mexico). Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv® was acquired from Merck-Millipore.

2.3. Plant extract elaboration and dose calculation

Aqueous extract (the traditional consumed form) was prepared by keeping in agitation 20 g of the dry and ground plant in 500 ml of boiling water for 15 min. Afterward, the mix was filtered and then lyophilized to obtain the final extract. Twenty g of dry plant yielded 3299 mg of crude extract. The traditional dose was calculated as follows, considering that a 70-kg person consumes 20 g of the plant (see results):

Traditional dose = 3299 mg of crude extract/70 kg of body weight = 47 mg/kg b. w.

2.4. HPLC analysis

The HPLC profile was developed using an Agilent 1260 HPLC instrument equipped with an Agilent G1315C UV diode array detector (DAD) and a Phenomenex (Luna Omega Polar C₁₈, 50 × 2.1 mm id., 1.6 μ m) reverse phase column. Elution was carried out at a flow rate of 0.35 ml/min with water as solvent A containing 0.1% formic acid (pH = 2.7) and acetonitrile (MeCN) as solvent B, the elution gradient was carried out by starting with a mixture of 99:1 (A:B), 75:25 (A:B) at 14 min, 70:30 (A:B) at 14–18 min, 65:35 (A:B) at 18–22 min, 5:95 (A:B) at 22–27 holding this mixture for a minute and 99:1 (A:B) at 28–30. The column temperature was kept at 35 °C. Working solutions of samples (extract and standards) were prepared by dissolving 15.0 mg of extract in 1 ml of H₂O and 2 mg of standard in 5 ml of MeOH and diluted to 100 μ g/ml, were filtered on membrane filters (PTFE, 0.45 μ m) and injected (2 μ l) using an autosampler. For UV detection, the wavelength program was set at acquisition of λ 240, 254, 280, 320, and 365 nm; the UV spectra were recorded from 200 to 400 nm. System control, data collection and processing were accomplished using OpenLAB LC 1260 chromatography software.

2.5. HPLC qualitative analysis

The identification of caffeic (1), chlorogenic (2) and rosmarinic (3) acids in the extract was made by HPLC coeluting with suitable concentrations of the standards (30, 40, and 30 μ g/ml of chlorogenic, caffeic and rosmarinic acids, respectively) and by comparing the UV spectra and retention times of the peaks identified in the chromatographic

profile with those of the standards.

2.6. Experimental animal handling

All procedures and animal management were approved by the Academic Ethics and Scientific Responsibility Commission (CEARC) of the School of Sciences, UNAM (number: T_2019_09_005) and were carried out according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) and Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

Eight-week-old Wistar rats and 8-week-old BALB/c mice were obtained from the bioterium of the School of Sciences, which were maintained with food and water *ad libitum* under standard conditions (25 °C, 55% humidity, and 12:12 h light: dark periods). All blood samples were obtained from the tail vein. Blood glucose was measured by duplicate using Accu-Chek® Active glucometers.

2.7. Acute oral toxicity test

Five BALB/c mice were used to perform an acute oral toxicity test according to the [OECD 425 guidelines \(2008\)](#). A 3-h fasted mouse was administered orally with a single dose of 2000 mg/kg b. w. of the aqueous extract of *E. cymosum*. After that, any abnormal physical or behavioral change was closely observed for 30 min and then every 4 h for 24 h. Based on the outcomes, the remaining four mice were fasted and administered orally with a single dose of 2000 mg/kg b. w. to follow the same procedure. All mice were examined frequently for 14 days.

2.8. Induction of hyperglycemia

Because of the heterogeneous etiopathogenesis of T2D, there is not a unique model to mimic all the characteristics of the disease. Hence, STZ-NA hyperglycemic model was selected for this research since it is reported to be suitable for testing new natural compounds' hypoglycemic ability. Although in this model no IR is observed, some other features of T2D are developed; these include a stable and moderate hyperglycemia, a modest reduction of β -cell and pancreatic insulin stores, glucose intolerance, impaired glucose-stimulated insulin secretion, responsiveness to insulin secretagogues, and classic diabetes symptoms (polyphagia, polydipsia and polyuria) (Ghasemi et al., 2014; Masiello et al., 1998). Briefly, rats fasted for 12 h were administered intraperitoneally with 150 mg/kg b. w. of nicotinamide (NA), dissolved in physiological solution and, 15 min after, they were injected intravenously with 65 mg/kg b. w. of streptozotocin (STZ), dissolved in acetate buffer 0.1 M, pH 4.5. One week later, animals with non-fasting blood glucose above 180 mg/dl were selected for performing the experiments.

2.9. In vivo experimental designs

2.9.1. Evaluation of acute hypoglycemic effect

The hypoglycemic potential of an aqueous extract of *E. cymosum*, administered via gavage, was monitored every hour for 3 h (Andrade-Cetto and Medina-Hernández, 2013). Thirty rats were assigned into five groups ($n = 6$ each one). (1) Control normoglycemic group, which received the physiological solution (vehicle); (2) control hyperglycemic group, which also received physiological solution; (3) positive-control hyperglycemic group, which received glibenclamide (Euglucon®, 5 mg/kg b. w.) (Berridge et al., 1992); (4) an experimental hyperglycemic group treated with the traditional dose of extract (47 mg/kg b. w., equivalent to 1 cup of traditional used tea); and (5) an experimental hyperglycemic group treated with a dose of extract higher than the traditional (470 mg/kg b. w., equivalent to the maximum cups consumed in one day [10]).

2.9.2. Evaluation of gluconeogenesis inhibition

Since impaired gluconeogenesis is a hallmark of hepatic IR that

contributes to fasting and postprandial hyperglycemia in T2D patients, this pathway's inhibition by the aqueous extract of *E. cymosum* could contribute to the hypoglycemic mechanism (Mata-Torres et al., 2020). To test this hypothesis, a pyruvate tolerance test was performed in rats fasted for 18 h to deplete glycogen storage in liver (only rats with approximately 200 mg/dl of 18-h fasting glucose were used). Twenty-four rats were divided into four groups ($n = 6$ each one). (1) Control normoglycemic group, receiving physiological solution by gavage and, 15 min after, an intraperitoneal sodium pyruvate load (2 g/kg b. w.); (2) control hyperglycemic group, having physiological solution orally and a sodium pyruvate load intraperitoneally; (3) positive-control hyperglycemic group, receiving metformin (Aurax®, 500 mg/kg b. w.) (Meng et al., 2017) orally and a sodium pyruvate load intraperitoneally; and (4) experimental hyperglycemic group, getting extract (470 mg/kg b. w.) orally and a sodium pyruvate load intraperitoneally. Blood glucose was determined at baseline and every 30 min after the sodium pyruvate load for 2 h.

2.9.3. Evaluation of carbohydrate breakdown inhibition

High consumption of carbohydrates from the diet is one of the primary causes of postprandial hyperglycemia in T2D patients, especially from foods with a high glycemic index (Jenkins et al., 2002). One approach to diminish postprandial hyperglycemia is the inhibition of carbohydrate breakdown to reduce the hyperglycemic peak by suppressing intestinal α -glucosidase enzyme activity. For that purpose, maltose tolerance tests were performed to evaluate the repercussion of *E. cymosum* aqueous extract on this mechanism (Andrade-Cetto et al., 2015, 2019). Twenty-four rats were assigned into four groups ($n = 6$ each one). (1) The normoglycemic control group, taking physiological solution and, 5 min after, a maltose load (3 g/kg b. w.); (2) control hyperglycemic group, receiving physiological solution and a maltose load; (3) positive-control hyperglycemic group, getting acarbose (Glucobay®, 3 mg/kg b. w.) (Seeram et al., 2012) and a maltose load; and (4) experimental hyperglycemic group, receiving extract (470 mg/kg b. w.) and a maltose load. All treatments were given by gavage. Blood glucose was measured just before both oral treatments and 30 min after administering the maltose load for 1.5 h.

2.9.4. Assessment of fasting and postprandial insulin concentration

The insulin involvement in the *E. cymosum* aqueous extract's hypoglycemic action was next investigated, measuring the hormone levels in different conditions. Two-hour acute tests were performed without and with a glucose load, simulating fasting and postprandial conditions, respectively. Thirty normoglycemic rats on an overnight fast were assigned into six groups ($n = 5$ each one). (1) control group, receiving physiological solution; (2) positive-control group, having glibenclamide (Euglucon®, 5 mg/kg b. w.); (3) experimental group, receiving the extract (470 mg/kg b. w.); (4) control group plus glucose, having physiological solution and, 5 min later, a glucose load (2 g/kg b. w.); (5) positive-control group plus glucose, receiving repaglinide (Prandin®, 1 mg/kg b. w.) (Balfour and Faulds, 1998) and a glucose load; and (6) experimental group plus glucose, getting the extract and a glucose load. All treatments were given by gavage.

Blood glucose and insulin were measured at baseline and were monitored every 30 min for 2 h. To measure insulin, serum was obtained by centrifuging blood samples at 10000 g for 10 min and then freezing them at -40°C until further analysis. Later, insulin was quantified using a specific immunoassay kit (Rat/Mouse Insulin ELISA kit EZRMI-13K EMD Millipore/Merck).

2.9.5. Evaluation of acute insulin sensitivity in oral glucose tolerance tests

Blood glucose and insulin values obtained from glucose load curves (oral glucose tolerance tests [OGTTs]) were used for determining the insulin sensitivity index (ISI) to assess the effect of the aqueous extract of *E. cymosum* on insulin-dependent glucose disposal in postprandial state. Insulin sensitivity was measured by calculating the Matsuda index as

follows (Matsuda and DeFronzo, 1999):

$$\text{Matsuda index (ISI)} = 10000/\sqrt{(\text{FBG} \times \text{FI}) \times (\text{BG}_{\text{mean}} \times \text{I}_{\text{mean}})},$$

where FBG is blood glucose measured at 0 min in OGTT (mg/dl), FI is insulin measured at 0 min in OGTT ($\mu\text{IU/ml}$), BG_{mean} is the mean of blood glucose values from 0 to 120 min in OGTT (mg/dl), and I_{mean} is the mean of insulin values from 0 to 120 min in OGTT ($\mu\text{IU/ml}$).

Insulin values (ng/ml) were converted to $\mu\text{IU/ml}$ using the value of 26 IU/mg established by the World Health Organization in 1986 (National Institute for Biological Standards and Control, 2010).

2.10. In vitro experiments

2.10.1. Inhibition of gluconeogenic rate-limiting enzymes

Subcellular fractions used to perform the *in vitro* assays were obtained as previously done (Andrade-Cetto and Cárdenas-Vázquez, 2010). First, livers of four Wistar rats fasted for 18 h, anesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g b. w., i. p.) were dissected and homogenized in buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7.4). Posteriorly, the homogenate was filtered and submitted to differential centrifugation. After the last centrifugation of 100000 g for 1 h, the pellets (microsomal fraction) and the cytosolic supernatant were collected and stored at -40°C until use.

2.10.1.1. Inhibition assay of glucose 6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9).

A colorimetric assay was performed by detecting a reduced blue phosphomolybdate complex that is proportional to the activity of G6Pase (Arion, 1989). Firstly, the microsomal fraction was resuspended in buffer (40 mM imidazole, 0.25 M sucrose, pH 7) and added to a reaction mix, which contained buffer and inhibitor samples (chlorogenic acid or extract) at different concentrations ranging from 2 $\mu\text{g/ml}$ to 8000 $\mu\text{g/ml}$. Later, the reaction mix was incubated for 5 min at room temperature. Enzymatic activity was started by adding 20 mM of glucose 6-phosphate (G6P) to the final 100- μl reaction volume. A 22°C incubation for 20 min was made, which ended with the addition of 900 μl of "stop solution" (0.42% ammonium molybdate in 1 N H_2SO_4 , 10% SDS, 10% ascorbic acid). Finally, the mix was incubated at 45°C for 20 min, and then absorbances were obtained at 830 nm. Three independent assays were carried out by triplicate.

2.10.1.2. Inhibition assay of fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11).

Enzymatic activity of FBPase was determined by measuring the color formation of an ammonium molybdate – malachite green complex with the inorganic phosphate produced by the enzyme (Baykov et al., 1988). Before performing the assays, the color reagent was prepared by dissolving 0.12% malachite green in a solution made of 5 vol of distilled water with 1 volume of concentrated H_2SO_4 previously cooled at room temperature. On the assay day, 1 volume of 7.5% ammonium molybdate was mixed with 4 vol of the color reagent with 0.17% TWEEN 20. The procedure of Tashima and Yoshimura (1975) was followed with modifications: in a 1-ml of reaction volume, buffer (5 μM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 7.2) enriched with 0.1 mM fructose 1, 6-bisphosphate (F1,6BP) was added and incubated for 5 min with inhibitor samples (adenosine 5'-monophosphate [AMP] or extract) at different concentrations ranging from 0.2 $\mu\text{g/ml}$ to 800 $\mu\text{g/ml}$. The reaction started by adding 10 μl of diluted cytosolic supernatant 9:1 (buffer: supernatant) and, 15 min later, ended with the addition of 250 μl of the color reagent. After a 10-min incubation period at room temperature, absorbances were measured at 630 nm. Three independent assays were carried out by triplicate.

2.10.2. Inhibition of intestinal α -glucosidase enzymes

An α -glucosidase solution from rat intestinal acetone powder was prepared according to the procedure described by Oki et al. (1999) with some modifications. In brief, 100 mg of crude extract were dissolved in 1.5 ml of 0.1 M phosphate buffer at pH 6.8. The mix was sonicated for

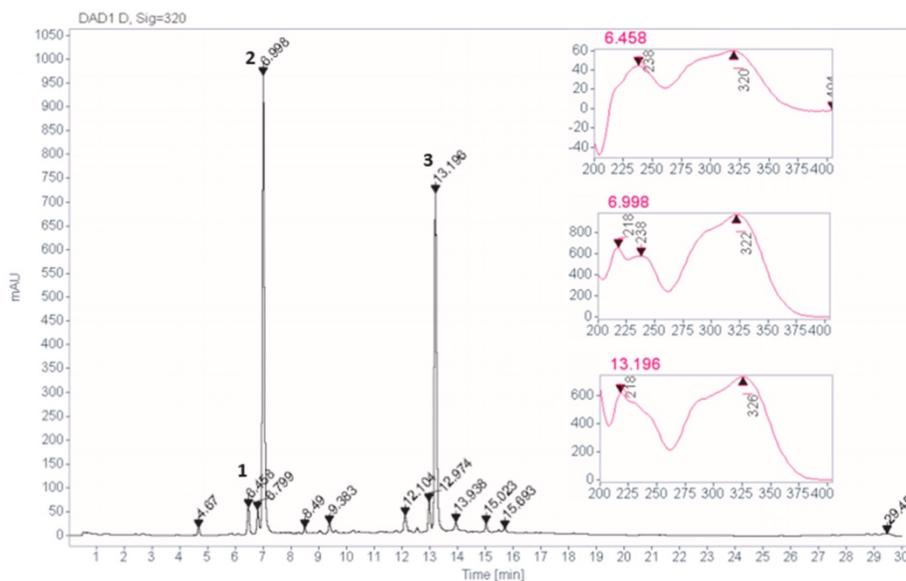


Fig. 1. Chromatographic profile of the *E. cymosum* aqueous extract, 320 nm.

10 min and then centrifugated at 10000 g for 10 min to obtain the supernatant used in the inhibitory assay.

2.10.2.1. Inhibition assay of α -glucosidases (EC 3.2.1.20). *In vitro* assay was performed following the protocol proposed by Escandón-Rivera et al. (2012) with modifications: assay phosphate buffer, inhibitor samples (acarbose or extract) at concentrations ranging from 200 μ g/ml to 2000 μ g/ml, and 20 μ l of α -glucosidase solution were incubated for 5 min at 35 °C; later, 2 mM of 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside (p-NPGP) was added to initiate the enzymatic activity. The 100- μ l reaction volume was incubated for 35 min at 35 °C, and the absorbances were determined at 405 nm. Three independent experiments by triplicate were carried out.

2.11. Statistical analysis

All graphics and analysis were made in GraphPad Prism version 8.4.0, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. The data are expressed as mean \pm SEM.

Data from *in vivo* experiments were firstly assessed for normal distribution. Then, ordinary one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* tests were performed to compare means among groups, while repeated measures ANOVA and Dunnet's *post-hoc* tests were applied for comparing the means with their baseline. P-values less than 0.05 were considered significant. In addition, the area under curve (AUC) of original values, and the variation of blood glucose and insulin levels were calculated for every curve.

With the aim of calculating the IC_{50} values, absorbances of the *in vitro* experiments were transformed to percentage of activity as follows:

Enzyme activity (%) = $(A_S - A_{SB}) / (A_C - A_{CB}) \times 100$, where A_S is the absorbance of the inhibitor sample at a specific concentration, A_{SB} is the blank of the inhibitor sample, A_C is the highest absorbance (without inhibitor), and A_{CB} is the blank of the highest absorbance.

Thereafter, percentage values were plotted in concentration-response curves to find the best fitting non-linear regression model (three or four parameters).

3. Results

3.1. Field study

We detected five medicinal plant market stalls in the Huejutla market, all of which sell *E. cymosum* through the year. Sometimes, diabetic people from places up to 100 km, go there to buy the plant, but mainly it is sold to the people of the municipality. The local name of the plant is "piñuela" and no other names in the specific languages were detected.

E. cymosum was selected for the further experiments because it invariably appears on the market through the year at all stands. According to the sellers, the plant enjoys a high-volume trade. The species has a consistent and limited number of uses exclusively related to the treatment of T2D. For treating the disease, they recommend boiling a handful (20 g) of the aerial parts in half a liter of water and consuming the decoction throughout the day as "agua de uso".

The informants helped us to find the collection area, which was located on the edge of the urban area of the municipal seat of Huejutla, on the Tecacalax river path located in a pasture next to "Colonia 1ero de Mayo" (21°07'35" N Lat, 98°26'53" W Long). The aerial part collection was made in this location with one of the sellers, José Humberto Flores, in June 2017 and 2019. Posteriorly, the taxonomic identification was carried out in the School of Sciences by Dr. Jaime Jiménez Ramírez (voucher ETNOF248). For the following work, the collected plant material was placed in a drying chamber at 40 °C for one week and subsequently cut and ground.

3.2. Chromatographic profile

The HPLC fingerprint profile of the *E. cymosum* aqueous extract (Fig. 1) shows two main peaks and around 15 minor peaks, the most important were observed at 254 (Fig. S1) and 320 nm (Fig. 1). The UV spectra detected were consistent with the presence in the extract of different types of flavonoids and phenolic acids (Ramawat and Mérillon, 2013). The two main peaks corresponded to chlorogenic (2) and rosmarinic acids (3); compound 2 is slightly more abundant than 3 when

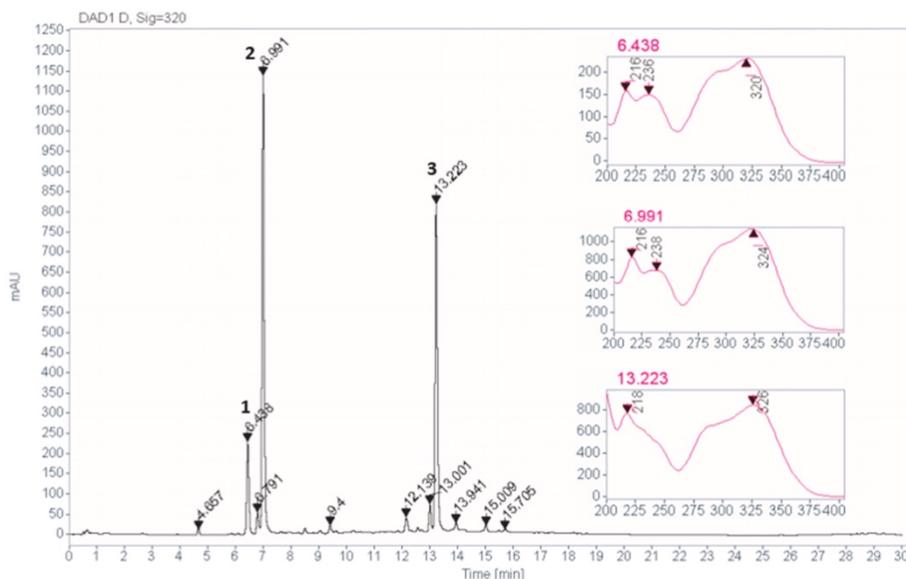


Fig. 2. Chromatographic profile of the co-injection of *E. cymosum* aqueous extract with standards 1 (caffeic acid), 2 (chlorogenic acid) and 3 (rosmarinic acid).

Table 1
Blood glucose values in 3-h acute tests.

Group	Blood glucose (mg/dl)			
	0 min	60 min	120 min	180 min
Normoglycemic control	99 ± 3 ^b	105 ± 4 ^c	103 ± 2 ^c	103 ± 1 ^c
Hyperglycemic control	200 ± 3 ^a	213 ± 5 ^a	210 ± 4 ^a	199 ± 4 ^a
Hyperglycemic + glibenclamide (5 mg/kg)	192 ± 5 ^a	123 ± 7 ^{c*}	97 ± 4 ^{c*}	99 ± 6 ^{c*}
Hyperglycemic + aqueous extract (47 mg/kg)	190 ± 7 ^a	173 ± 8 ^{b*}	148 ± 5 ^{b*}	137 ± 4 ^{b*}
Hyperglycemic + aqueous extract (470 mg/kg)	192 ± 5 ^a	180 ± 8 ^{b*}	147 ± 7 ^{b*}	125 ± 5 ^{b*}

The values represent the mean ± SEM (n = 6). Intragroup comparison (rows): asterisk indicates statistically significant difference versus its initial time at p < 0.05. Intergroup comparison (columns): different letters indicate statistically significant differences at each time at p < 0.05 (a > b > c).

comparing its area percentages, 41.5 and 35.9, respectively; additionally, caffeic acid (1) was identified as part of the minor constituents. The phenolic compounds 1–3 were characterized according to their retention times and UV data compared with commercial standards and previously reported data. Enrichment of the extract with the standards resulted in an increment in the peak areas attributed to 1–3 in the extract chromatogram (Fig. 2), supporting unequivocal identification.

3.3. Acute oral toxicity test

No deaths were reported after oral administration of the maximum OECD dose, indicating that the LD50 is greater than 2000 mg/kg b. w. During the observation time, no physical or behavioral abnormalities were described, such as inactivity, alertness, difficulty breathing, convulsions, salivation, diarrhea, or changes in skin, fur, eyes, or mucous membranes. These outcomes suggest that both doses used for this study, the traditional dose (47 mg/kg b. w.), and the elevated-traditional dose

(470 mg/kg b. w.), are within the safety margin.

3.4. Hypoglycemic effect

Compared with the hyperglycemic control administered only with the vehicle, *E. cymosum* aqueous extract, both at its traditional and elevated-traditional doses, significantly decreased blood glucose after 30 min of the administrations, while glibenclamide diminished blood glucose levels reaching its maximum hypoglycemic effect at 120 min (Table 1, Fig. 3A). After 180 min, the extract, at the traditional and elevated-traditional doses, diminished blood glucose levels to 53 and 67 mg/dl, respectively, showing the same glucose-reducing behavior. According to the AUC analyses, glibenclamide decreased glucose levels by 40% compared with the control, while both traditional and elevated-traditional doses of the *E. cymosum* aqueous extract by 21% (Fig. 3B). These results indicated that the elevated-traditional dose presents a slightly better effect thus, for the following experiments, this dose was used to simulate a cumulative effect since the plant is consumed over the day in the form of “agua de uso”.

3.5. Inhibition of gluconeogenesis

Pyruvate tolerance tests were performed in 18-h fasted rats to measure the impact of the extract on the gluconeogenic way since pyruvate is one of the primary substrates from which glucose is synthesized. As shown in Table 2 and Fig. 4A, pyruvate's intraperitoneal injection caused two different blood glucose responses from normo- and hyperglycemic organisms. Even though a hyperglycemic peak was generated in both controls, the hyperglycemic organisms' peak was 2.3 times larger than that observed in healthy ones and even blood glucose levels remained approximately between 176 mg/dl and 150 mg/dl throughout the test compared with those in normoglycemic control.

Regarding the other treatments, positive-metformin control decreased the hyperglycemic peak by 147 mg/dl compared with the control. Furthermore, it lowered glucose levels beyond the baseline, reaching normoglycemic levels at 120 min. This outcome could be due

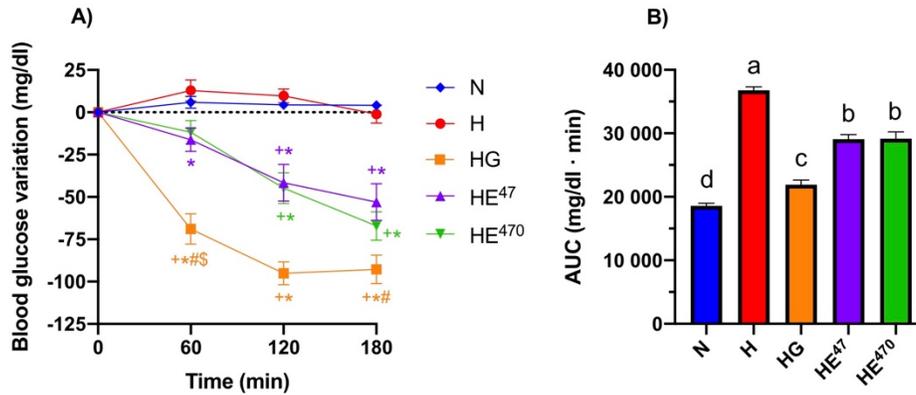


Fig. 3. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *E. cymosum*. A) Blood glucose variation in acute tests. Symbols indicate statistically significant difference at each time versus N (+), H (*), HE⁴⁷ (#) or HE⁴⁷⁰ (\$) at p < 0.05. B) AUC of raw data in acute tests. Different letters over bars indicate statistically significant difference at p < 0.05 (a > b > c > d). The values represent the mean ± SEM (n = 6). N: normoglycemic control group; H: hyperglycemic control group; HG: hyperglycemic plus glibenclamide control group; HE⁴⁷: hyperglycemic plus traditional dose extract group; HE⁴⁷⁰: hyperglycemic plus elevated-traditional dose extract group.

Table 2
Blood glucose values in pyruvate tolerance tests (2 g/kg, i.p.).

Group	Blood glucose (mg/dl)				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normoglycemic control	98 ± 3 ^b	176 ± 10 ^{d*}	160 ± 7 ^{c*}	135 ± 6 ^{b*}	118 ± 5 ^{b*}
Hyperglycemic control	213 ± 8 ^a	389 ± 17 ^{a*}	379 ± 17 ^{a*}	377 ± 16 ^{a*}	363 ± 11 ^{a*}
Hyperglycemic + metformin (500 mg/kg)	195 ± 4 ^a	224 ± 12 ^c	172 ± 12 ^c	148 ± 16 ^{b*}	116 ± 11 ^{b*}
Hyperglycemic + aqueous extract (470 mg/kg)	199 ± 7 ^a	313 ± 13 ^{b*}	299 ± 14 ^{b*}	301 ± 18 ^{a*}	290 ± 22 ^{a*}

The values represent the mean ± SEM (n = 6). Intragroup comparison (rows): asterisk indicates statistically significant difference versus its initial time at p < 0.05. Intergroup comparison (columns): different letters indicate statistically significant differences at each time at p < 0.05 (a > b > c).

Table 3
Blood glucose values in maltose tolerance tests (3 g/kg, p.o.).

Group	Blood glucose (mg/dl)			
	0 min	30 min	60 min	90 min
Normoglycemic control	121 ± 2 ^b	188 ± 3 ^{c*}	170 ± 3 ^{c*}	163 ± 4 ^{c*}
Hyperglycemic control	185 ± 2 ^a	322 ± 19 ^{a*}	370 ± 12 ^{a*}	310 ± 13 ^{a*}
Hyperglycemic + acarbose (3 mg/kg)	186 ± 3 ^a	238 ± 16 ^{bc*}	267 ± 20 ^{b*}	265 ± 16 ^{ab*}
Hyperglycemic + aqueous extract (470 mg/kg)	181 ± 2 ^a	266 ± 23 ^{ab*}	273 ± 20 ^{b*}	243 ± 14 ^{b*}

The values represent the mean ± SEM (n = 6). Intragroup comparison (rows): asterisk indicates statistically significant difference versus its initial time at p < 0.05. Intergroup comparison (columns): different letters indicate statistically significant differences at each time at p < 0.05 (a > b > c).

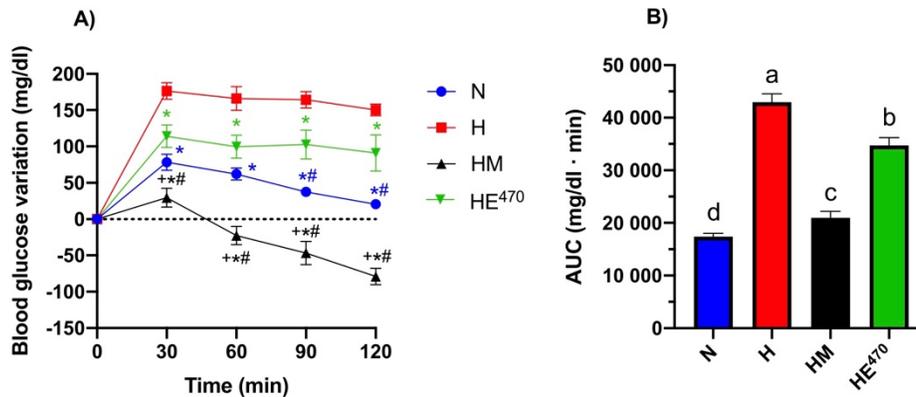


Fig. 4. Effect of aqueous extract of *E. cymosum* on hepatic glucose output (pyruvate tolerance tests). A) Blood glucose variation in pyruvate tolerance tests. Symbols indicate statistically significant difference at each time at p < 0.05 versus N (+), H (*), HE⁴⁷⁰ (#). B) AUC of raw data in pyruvate tolerance tests. Different letters over bars indicate statistically significant difference at p < 0.05 (a > b > c > d). The values represent the mean ± SEM (n = 6). N: normoglycemic control group; H: hyperglycemic control group; HM: hyperglycemic plus metformin control group; HE⁴⁷⁰: hyperglycemic plus extract group.

Table 4
In vitro assessment of the effect of aqueous extract of *E. cymosum* on gluconeogenic rate-limiting enzymes and α -glucosidase enzymes.

Sample	Inhibition percentage	IC ₅₀ \pm SEM (μ g/ml)
G6Pase enzyme		
Chlorogenic acid	100	211.3 \pm 21.1 (596.4 μ M)
<i>E. cymosum</i> aqueous extract	91	782 \pm 57.2
FBPase enzyme		
AMP	90	15.7 \pm 1.5 (45.2 μ M)
<i>E. cymosum</i> aqueous extract	96	57.4 \pm 4.7
Intestinal α-glucosidase enzymes		
Acarbose	85	174.8 \pm 12.1 (270.8 μ M)
<i>E. cymosum</i> aqueous extract	32	–

Concentrations ranging from 2 to 8000 μ g/ml were used for G6Pase assays, 0.2–800 μ g/ml for FBPase assays, and 200–2000 μ g/ml for α -glucosidase assays.

to a suppression of gluconeogenesis followed by an increase in peripheral glucose uptake. On the other hand, the *E. cymosum* aqueous extract significantly reduced the hyperglycemic peak by 62 mg/dl compared with the hyperglycemic control. The antihyperglycemic effect was maintained over the experiment. Because of its dual effect, metformin provoked a 51%-reduction effect of glucose AUC, while *E. cymosum* aqueous extract caused a decrease of 19% compared with the control (Fig. 4B).

The direct inhibitory capacity of the extract on gluconeogenesis was evaluated by measuring the enzymatic activity of G6Pase and FBPase, which are two of the rate-limiting enzymes that control the pathway. According to the concentration-response curves (Fig. 6A-B and Table 4), *E. cymosum* aqueous extract effectively suppressed both enzymes' activity, reaching almost 100% inhibition. Moreover, the extract was more effective than the control (AMP) in inhibiting the FBPase activity (96% vs. 90%) though its IC₅₀ value was lower (57.4 μ g/ml vs. 15.7 μ g/ml).

3.6. Reduction of postprandial hyperglycemia and inhibition of α -glucosidase enzymes

One of the main contributors to postprandial hyperglycemia is glucose from the diet's breakdown of complex carbohydrates. Therefore, maltose tolerance tests were performed to evaluate the extract's potential inhibitory effect on this mechanism. After the maltose load, the hyperglycemic control's blood glucose levels increased 185 mg/dl at 60 min, while those of the normoglycemic control only increased a maximum of 67 mg/dl at 30 min and later started to diminish (Table 3,

Fig. 5A). When positive-acarbose control was administered, the postprandial peak was significantly reduced by 84 mg/dl from 30 min compared with the hyperglycemic control, indicating the inhibition of the maltose breakdown by α -glucosidase enzymes. Likewise, *E. cymosum* aqueous extract inhibited the hyperglycemic peak by 56 mg/dl at 30 min, although statistical difference versus hyperglycemic control was reached until 60 min. The AUC of both acarbose and extract was significantly reduced by 22% and 20%, respectively, in comparison to the hyperglycemic control (Fig. 5B).

On the other hand, while the extract could reduce blood glucose levels in the same way as acarbose in maltose tolerance tests, it only inhibited 32% of the enzymatic activity of α -glucosidases *in vitro* (Fig. 6C, Table 4). This outcome suggests that although inhibition of α -glucosidases contributes to the postprandial hyperglycemia-lowering effect of the *E. cymosum* aqueous extract, there could be other mechanisms for reducing blood glucose levels in this nutritional state.

3.7. Decreased fasting and postprandial insulin, and improved insulin sensitivity

In an unaltered system where glucose homeostasis functions properly, namely in normoglycemic organisms, blood glucose and insulin levels of control fluctuated over time within specific ranges of 9 mg/dl and 0.4 ng/ml, respectively (Tables 5 and 6; Fig. 7A,C). After glibenclamide administration, glucose levels were significantly reduced by 34 mg/dl after 120 min, which meant a significant decrease of 24% in AUC (Fig. 7B). This reduction resulted from significantly increasing insulin levels by 0.77 ng/ml, although the AUC of this parameter showed no significant rise (Fig. 7D).

Interestingly, though *E. cymosum* aqueous extract held the same blood glucose-lowering behavior shown by the control (displaying an AUC reduction of 8%), it tended to maintain lower insulin levels than the control. This outcome turned out in a significant reduction of insulin AUC of 44%, suggesting that not only does the extract not promote insulin release, but it also stimulates mechanisms that decrease insulin levels in order to prevent hypoglycemia.

After glucose loading, a significant hyperglycemic peak was observed at 30 min in the control, which then progressively decreased; on the contrary, insulin levels gradually increased from 30 min to 90 min, peaking in the latter (Tables 5 and 6; Fig. 7 E,G). Meanwhile, the short-acting insulin secretagogue repaglinide showed its maximum insulin-secretory effect at 30 min by significantly increasing 5.75 ng/ml

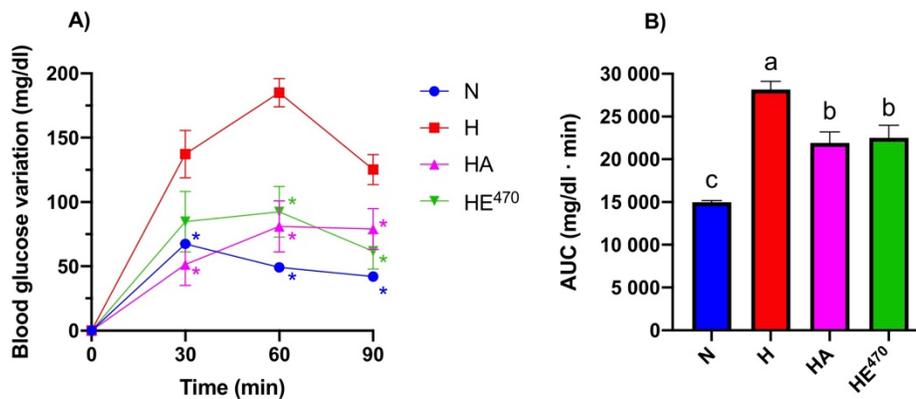


Fig. 5. Effect of aqueous extract of *E. cymosum* on postprandial hyperglycemia by carbohydrate breakdown (maltose tolerance tests). A) Blood glucose variation of maltose tolerance tests. Asterisk indicates statistically significant difference versus H at each time at $p < 0.05$. B) AUC of raw data in maltose tolerance tests. Different letters over bars indicate statistically significant difference at $p < 0.05$ ($a > b > c$). The values represent the mean \pm SEM ($n = 6$). N: normoglycemic control group; H: hyperglycemic control group; HA: hyperglycemic plus acarbose control group; HE⁴⁷⁰: hyperglycemic plus extract group.

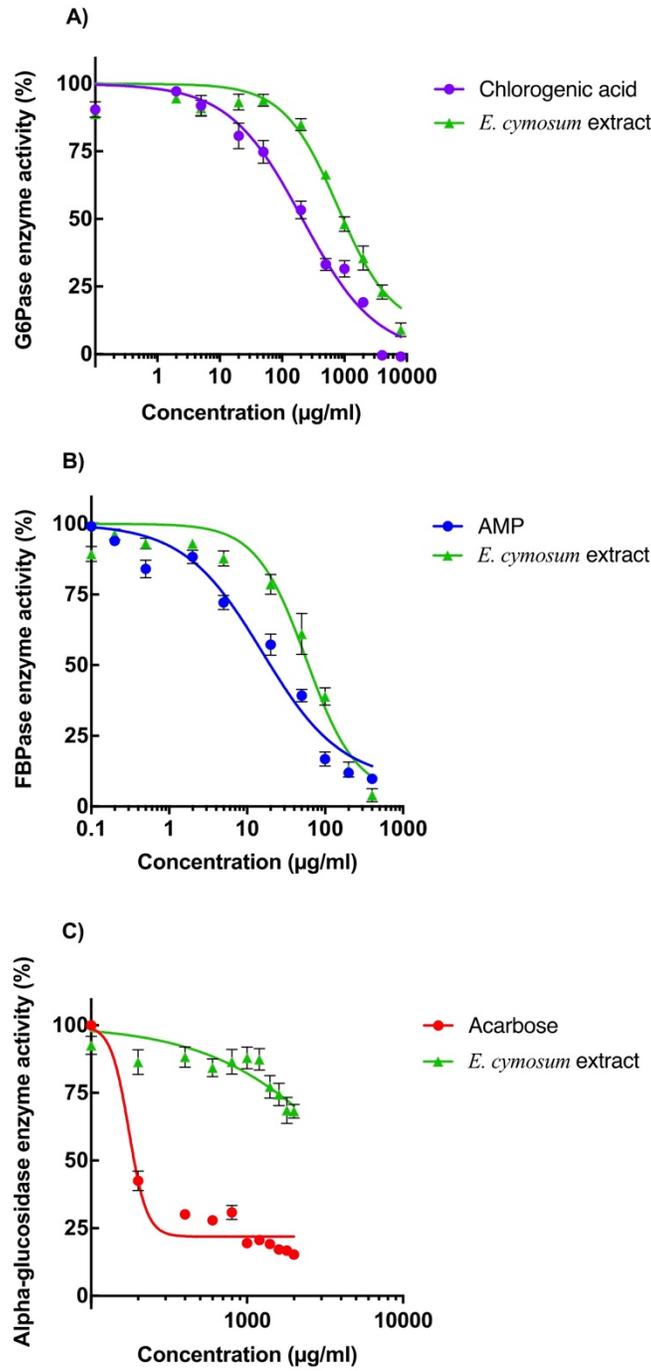


Fig. 6. Concentration-response inhibition curves on gluconeogenic rate-limiting enzymes and α -glucosidase enzymes. A) Glucose 6-phosphatase. B) Fructose 1,6-bisphosphatase. C) Intestinal α -glucosidases. Each point represents the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicate.

Table 5
Blood glucose values in 2-h acute tests in normoglycemic rats.

Group	Blood glucose (mg/dl)				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normal curve					
Control	107 ± 3 ^a	106 ± 2 ^a	104 ± 2 ^a	98 ± 3 ^{a*}	98 ± 3 ^{a*}
Glibenclamide (5 mg/kg)	95 ± 3 ^b	98 ± 3 ^a	77 ± 3 ^{c*}	60 ± 2 ^{b*}	61 ± 2 ^{b*}
Aqueous extract (470 mg/kg)	100 ± 3 ^{ab}	101 ± 3 ^a	93 ± 2 ^b	91 ± 1 ^{a*}	90 ± 2 ^{a*}
Glucose load curve (2 g/kg, p.o.)					
Control	107 ± 5 ^a	183 ± 11 ^{a*}	157 ± 11 ^{a*}	125 ± 7 ^{a*}	122 ± 7 ^{a*}
Repaglinide (1 mg/kg)	92 ± 5 ^a	118 ± 3 ^{c*}	74 ± 6 ^b	61 ± 2 ^{b*}	60 ± 2 ^{b*}
Aqueous extract (470 mg/kg)	106 ± 3 ^a	151 ± 4 ^{b*}	142 ± 5 ^{a*}	114 ± 6 ^a	106 ± 5 ^a

The values represent the mean ± SEM (n = 5). Intragroup comparison (rows): asterisk indicates statistically significant difference versus its initial time at p < 0.05. Intergroup comparison on each curve (columns): different letters indicate statistically significant differences at each time at p < 0.05 (a > b > c).

Table 6
Insulin values in 2-h acute tests in normoglycemic rats.

Group	Insulin (ng/ml)				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normal curve					
Control	1.88 ± 0.14 ^a	1.63 ± 0.22 ^a	1.72 ± 0.20 ^a	1.84 ± 0.26 ^a	1.48 ± 0.19 ^{ab}
Glibenclamide (5 mg/kg)	1.51 ± 0.24 ^a	1.57 ± 0.27 ^a	1.93 ± 0.27 ^{a*}	1.89 ± 0.33 ^a	2.28 ± 0.40 ^{a*}
Aqueous extract (470 mg/kg)	1.36 ± 0.21 ^a	1.02 ± 0.15 ^a	0.86 ± 0.19 ^{b*}	0.89 ± 0.16 ^{b*}	0.96 ± 0.20 ^{b*}
Glucose load curve (2 g/kg, p.o.)					
Control	1.94 ± 0.35 ^a	4.09 ± 0.93 ^{ab}	3.38 ± 0.65 ^a	4.88 ± 1.07 ^a	2.45 ± 0.70 ^a
Repaglinide (1 mg/kg)	0.78 ± 0.19 ^b	6.53 ± 0.71 ^{a*}	2.86 ± 0.58 ^{a*}	2.26 ± 0.35 ^{ab*}	1.60 ± 0.19 ^{a*}
Aqueous extract (470 mg/kg)	1.50 ± 0.13 ^a	2.22 ± 0.33 ^b	1.97 ± 0.31 ^a	1.33 ± 0.11 ^b	1.65 ± 0.12 ^a

The values represent the mean ± SEM (n = 5). Intragroup comparison (rows): asterisk indicates statistically significant difference versus its initial time at p < 0.05. Intergroup comparison on each curve (columns): different letters indicate statistically significant differences at each time at p < 0.05 (a > b > c).

with respect to its baseline time, producing an early-phase postprandial insulin secretion which completely suppressed the hyperglycemic peak compared with the control. Subsequently, this secretagogue maintained a significant hypoglycemic effect throughout the test, showing a decrease in blood glucose beyond the baseline. Even though repaglinide showed a significant 43% reduction of glucose AUC compared with the control, it did not modify insulin AUC (Fig. 7 F, H).

Regarding the *E. cymosum* aqueous extract, the hyperglycemic peak at 30 min was significantly reduced by 32 mg/dl, and then glucose levels were maintained lower than those in the control, which overall represented a non-significant reduction of 11% in the AUC. Nevertheless, insulin levels remained almost unchanged compared with the baseline, and were even significantly lower at 90 min compared with those observed in the control. Overall, the extract diminished insulin AUC by 50%. These results pointed out that the *E. cymosum* aqueous extract promotes glucose-lowering mechanisms which are not related to insulin release. Conversely, the extract could improve insulin functioning, enhancing insulin sensitivity to avoid postprandial hyperglycemia. Therefore, Matsuda indices of control and extract groups were calculated to assess the insulin sensitivity enhancement. The results showed that the extract significantly increased this index 1.5 times than the

control (Table 7).

4. Discussion

Glucose homeostasis is strictly controlled by numerous mechanisms whose defects impact on how blood glucose is regulated, arousing acute alterations such as seizures and loss of consciousness owing to hypoglycemia, and long-term complications that are the result of chronic damage to blood vessels due to prolonged exposure to high glucose levels (Szablewski, 2011). T2D is a complex metabolic illness whose heterogeneity leading to impair several regulatory mechanisms in glucose homeostasis. Therefore, to maintain a successful blood glucose management, a therapy involving multiple therapeutic targets is necessary.

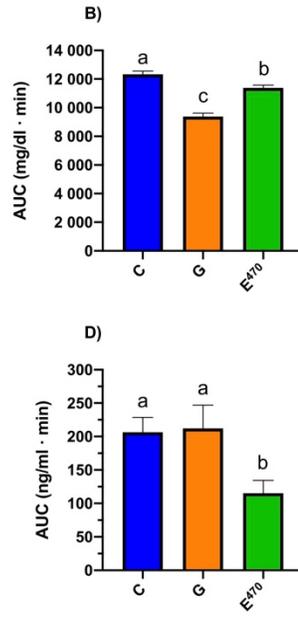
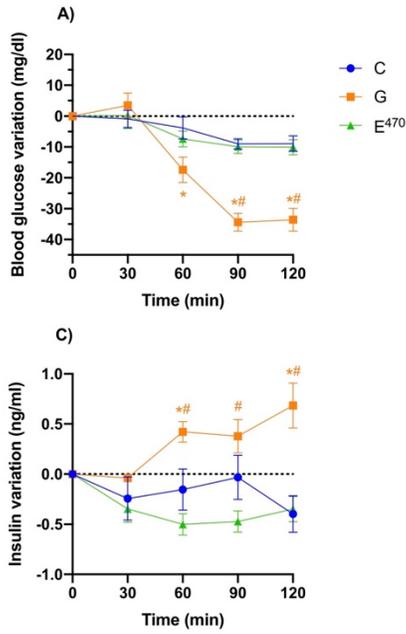
Medicinal plants, the primary resource of local communities for treating diseases around the globe, are an important source of molecules with numerous mechanisms of action that have shown to affect glucose metabolism positively, and thus they have a good potential against diabetes (Escandón-Rivera et al., 2020; Shanak et al., 2019). Since extracts of medicinal plants are mixtures of individual constituents (Caesar and Cech, 2019), they could have combinatorial effects on several targets in a disease as complex as T2D.

As previously mentioned, *E. cymosum* has been used by patients in the state of Hidalgo, Mexico, to treat T2D for many years. Hence, the main objective of this research was to assess the hypoglycemic effect of the aqueous extract. The results showed that the traditionally consumed form of this medicinal plant effectively diminished blood glucose levels in hyperglycemic STZ-NA rats. Commonly, medicinal plants as "piñuela" are drunk through the day as "agua de uso", then there is not a specific time to consume the decoction (it may be consumed during fasting or postprandial state). Therefore, the hypoglycemic effect could be related to diverse mechanisms of action involved in the different phases of glucose homeostasis.

Understanding the pathogenesis of the nutritional states of glucose homeostasis in T2D has been useful to design new therapies that allow appropriate blood glucose level control (DeFronzo, 2009). As a result of diabetes research, it is well-known that patients with T2D have disproportionate rates of endogenous glucose production that contribute to hyperglycemia of both in fasting (postabsorptive state) and in postprandial state and, between the two production routes, gluconeogenesis is the leading impaired supplier (Rines et al., 2016; Rizza, 2010). Following this rationale, since the decoction of *E. cymosum* could be consumed in both conditions, the aqueous extract was assessed to evaluate its impact on gluconeogenesis through a pyruvate tolerance test, a good tool for evaluating potential gluconeogenic inhibitors due to the depletion of glycogen storage and the usage of one of the main substrates of the gluconeogenic pathway (Andrade-Cetto and Cárdenas-Vázquez, 2010).

As shown herein, the aqueous extract of *E. cymosum* had the capacity of decreasing gluconeogenesis since it exhibited an antihyperglycemic effect that was held throughout the test. The observed effect is similar to those obtained previously by other plant extracts tested in our laboratory (Andrade-Cetto et al., 2021; Mata-Torres et al., 2020). Furthermore, *E. cymosum* was an effective activity-suppressor of G6Pase and FBPase, two of the principal rate-limiting enzymes that control the gluconeogenic pathway. The inhibition of both enzymes impacts directly on the inhibitory capacity for glucose production of the extract because G6Pase controls the efflux of glucose from both gluconeogenesis and glucogenesis, limiting completely the supply of endogenous glucose (Jawad et al., 2016). On the other hand, decreasing FBPase activity by the extract is determinant in the therapeutical effect on gluconeogenesis since the enzyme is strictly regulated by allosterism and covalent modification, thus it plays a critical role in controlling the carbon flux of both glycolysis and gluconeogenesis (Hanson and Owen, 2013). Although it has been reported that overproduction of hepatic glucose is a consequence of an atypical activity of phosphoenolpyruvate

Fasting condition



Post-prandial state

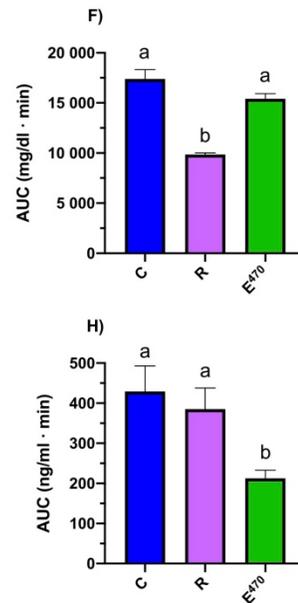
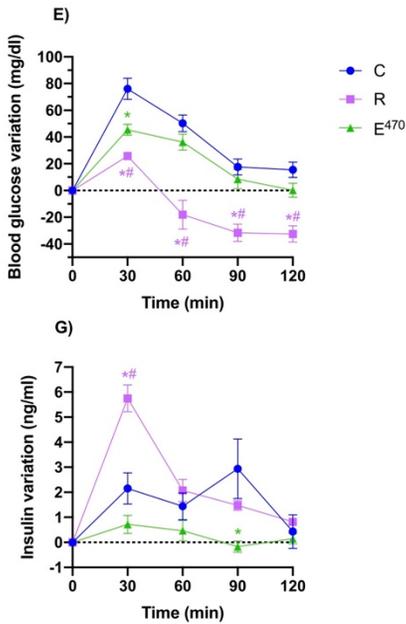


Fig. 7. Effect of aqueous extract of *E. cymosum* on insulin behavior in fasting and in postprandial state. Fasting (normal curves): A) Blood glucose variation. B) Blood glucose AUC of raw data. C) Insulin variation. D) Insulin AUC of raw data. Postprandial state (glucose load curves): E) Blood glucose variation. F) Blood glucose AUC of raw data. G) Insulin variation. H) Insulin AUC of raw data. The values represent the mean \pm SEM (n = 5). In variation curves: symbols indicate statistically significant difference at each time at $p < 0.05$ versus C (*) or E⁴⁷⁰ (#). In AUC analysis: different letters over bars indicate statistically significant difference at $p < 0.05$ (a > b > c). In fasting: C, control group; G, glibenclamide control group; E⁴⁷⁰, extract group. In post-prandial state: C, control group plus glucose; R, repaglinide control group plus glucose; E⁴⁷⁰, extract group plus glucose.

Table 7
Improvement of acute insulin sensitivity by aqueous extract of *E. cymosum* in the glucose load curve (OGTT).

Group	Matsuda index (IS)
Control (vehicle)	1.48 ± 0.16
Aqueous extract (470 mg/kg)	2.22 ± 0.18*

The values represent the mean ± SEM (n = 5). Asterisk indicates statically difference versus control (unpaired t-test, p < 0.05).

carboxykinase [PEPCK] and G6Pase rather than an elevation in their expression (Samuel et al., 2009), allosteric inhibition of FBPase seems to be the key target of gluconeogenesis since it controls the entrance of all three-carbon substrates to the pathway, and its long-term inhibition is safe because the risk of hypoglycemia is reduced and does not cause weight gain in diabetic rodents (van Poelje et al., 2007). Also, FBPase inhibitors correct fasting and postprandial hyperglycemia (Yoshida et al., 2008). However, further experiments should be addressed to know how the extract is inhibiting the activity of FBPase.

After food consumption, postprandial hyperglycemia in non-diabetic individuals is avoided due to the coordinated action of carbohydrate absorption and the effects on glucose metabolism of insulin and glucagon in the liver and peripheral tissues (Maffettone et al., 2018). In this case, the extract also had the capacity of decreasing postprandial hyperglycemia after administration of both glucose and maltose. However, even though *E. cymosum* partially inhibited α -glucosidase enzymes after a maltose load, it did not promote an increase in insulin levels

neither in postprandial state nor in fasting. These outcomes suggest the participation of other mechanisms like the direct inhibition of intestinal absorption or those involved in increasing insulin sensitivity, as pointed out by the enhanced Matsuda index in OGTTs. Inhibition of endogenous glucose production could be a mechanism involved in this improvement, as tested here; however, other mechanisms such as stimulation of peripheral glucose uptake and oxidation, and the promotion of glycogen synthesis should not be discarded.

Through HPLC analysis, caffeic (1), chlorogenic (2) and rosmarinic (3) acids were identified as components of the aqueous extract of aerial parts of *E. cymosum*. These compounds are polyphenols well-known for their antioxidant and anti-inflammatory capacity (Cizmarova et al., 2020; Sharma et al., 2018) and they have also been reported in other *Eryngium* species (Cádiz-Gurrea et al., 2013; Dalar et al., 2014; Kikowska et al., 2012; Paun et al., 2019; Soumia, 2018; Wang, 2012). The mechanisms mentioned above of the *E. cymosum* aqueous extract can be explained by the effects of these hydroxycinnamic acids since all of them have reports of improving glucose metabolism. First, it has been reported that caffeic acid significantly reduces blood glucose levels and HbA1c in insulin-resistant C57BL/KsJ-db/db mice, through the inhibition of activity and expression of PEPCK and G6Pase, a reduction in expression of hepatic glucose transporter 2 (GLUT2) and augmentation of adipocyte glucose transporter 4 (GLUT4) (Un et al., 2006). Moreover, it inhibited the increased enzymatic activity of both G6Pase and FBPase *in vitro* in a model of iron-mediated cardiotoxicity (Salau et al., 2020) and the enzymatic activity of PEPCK in tumor necrosis factor- α -treated

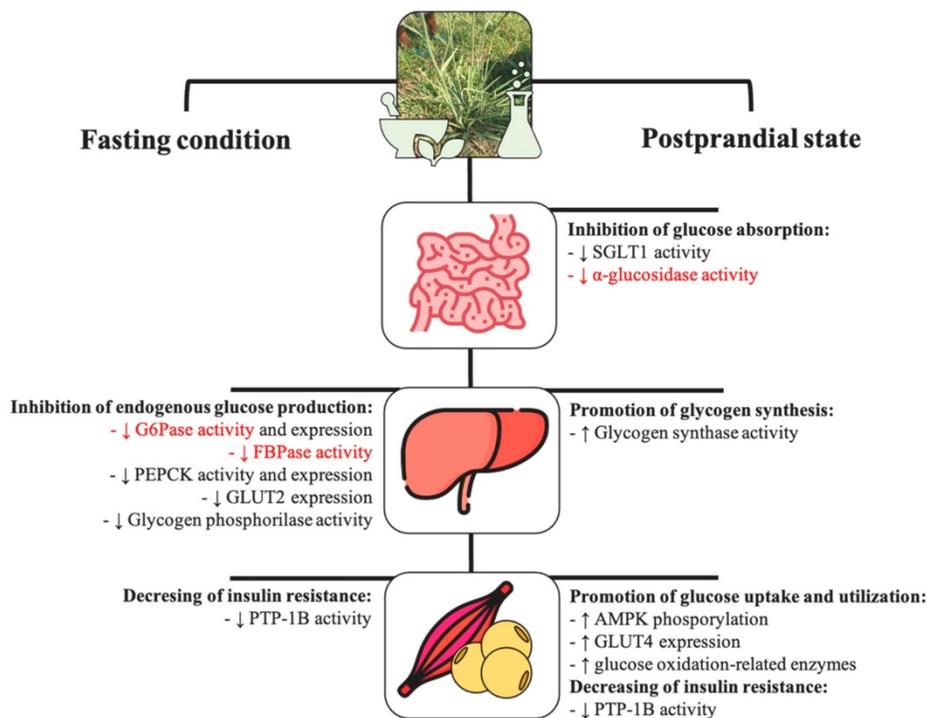


Fig. 8. Glucose-lowering mechanisms exerted by the aqueous extract of the aerial parts of *E. cymosum* both in fasting and in postprandial state. The mechanisms addressed in this work are highlighted in red. Non-highlighted mechanisms should be assessed in further research. SGLT1: sodium-glucose linked transporter 1; G6Pase: glucose 6-phosphatase; FBPase: fructose 1,6-bisphosphatase; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; GLUT2: glucose transporter type 2; AMPK: AMP-activated protein kinase; GLUT4: glucose transporter type 4; PTP-1B: protein tyrosine phosphatase 1B. Images from Flaticon.com. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

insulin-resistant mouse FL83B hepatocytes (Huang and Shen, 2012).

On the other hand, it has been reported that rosmarinic acid reduces blood glucose levels, HbA1c and HOMA-IR significantly in diabetic rats induced with a high-fat diet and STZ after 30 days of treatment (100 mg/kg/day). Furthermore, this phenolic acid reduced the increased enzymatic activity of both G6Pase and FBPase and reestablished the impaired activity of enzymes related to glucose oxidation and glycogen synthesis in this diabetic model (Jayanthi and Subramanian, 2014). In other studies, rosmarinic acid showed inhibitory activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B), and α -glucosidase enzymes, in addition to promoting glucose uptake through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and the increase of GLUT4 expression; it has also modulated the traffic of intestinal sodium-glucose cotransport proteins (Ngo et al., 2018). Finally, many beneficial effects on metabolism are attributed to chlorogenic acid. To exemplify, it has shown to decrease hyperglycemic peak in OGTTs by attenuating intestinal glucose absorption, inhibiting endogenous glucose production through inhibition of G6P translocase 1 (which is part of the enzymatic complex G6Pase), stimulating glucose uptake in insulin-sensitive and insulin-resistant adipocytes, and promoting insulin secretion in INS-1E insulin-secreting cell line and rat islets of Langerhans (Meng et al., 2013).

As a result of the combination of the effects exhibited by the pure compounds in previous research and the results obtained in the current work, Fig. 8 summarizes all the possible glucose-lowering mechanisms exerted by the aqueous extract of *E. cymosum* both in fasting and in postprandial state. Although the traditionally consumed dose of *E. cymosum* aqueous extract has been shown to be capable of acutely regulating blood glucose levels and to be safe within a range for acute exposure, it is encouraged to address some issues that were not assessed in the current work, such as the inhibition of the other gluconeogenic-regulatory enzymes, the chronic maintenance of the hypoglycemic effect, and its impact of long-term exposure to confirm its safety. Moreover, further studies are encouraged to support the proposed mechanisms of action.

5. Conclusions

The present research provides evidence for the acute hypoglycemic effect of *E. cymosum*, a medicinal plant traditionally consumed in the state of Hidalgo, Mexico, and it establishes the first insights into the mechanisms of action of this plant, emphasizing the contribution of the aqueous extract in fasting and in the postprandial state, which could be related to its phytochemical content. The aqueous extract of the aerial parts of *E. cymosum* inhibited the endogenous glucose production, specifically gluconeogenesis, which is the impaired pathway that causes fasting and postprandial hyperglycemia in T2D patients. Besides, it lowered the hyperglycemic excursions after administration of glucose and maltose loads. Despite its mild inhibitory capacity of α -glucosidase enzymes, the aqueous extract demonstrated a potent and effective suppressive ability on the key gluconeogenic enzymes G6Pase and FBPase. Additionally, its hypoglycemic effect was not related to insulin release in both nutritional states; nevertheless, it increased the insulin sensitivity index in OGTTs, which could point to the search for other mechanisms in further works, such as direct inhibition of intestinal absorption and mechanisms that improve insulin sensitivity.

Acknowledgements

This article is a requirement for obtaining the Doctor of Sciences degree of Fernanda Espinoza-Hernández at Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. The authors acknowledge Dr. Adriana Romo-Pérez for helping with the chemical analysis (through a DGAPA Post-Doctoral Scholarship), M. en C. Daniela Moreno-Vargas for helping with the accomplishment of the *in vivo* experiments, and M. en C. Christian Cabello-Hernández for housing the animals.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114339>.

Funding statement

This project was sponsored by DGAPA, PAPIIT IN226719.

Author contributions

F. E-H performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A. A-C envisioned the study, got the financial support, performed the field study, supervised the experiments, and reviewed the manuscript. S. E-R performed the phytochemical analysis and supervised the α -glucosidase inhibition assays. G. M-T standardized and performed the FBPase inhibition assays. R. M supervised the experiments and reviewed the manuscript.

References

- Albuquerque, U.P., da Cunha, L., Lucena, R., Alves, R. (Eds.), 2014. *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. Humana Press, New York.
- Almonte-Flores, D.C., 2015. *Estudio de Polifenoles con Propiedades Antioxidantes, Hipoglucémicas e Hipocolesterolémicas a partir de Subproductos Agroforestales* [PhD thesis]. Instituto Politécnico Nacional, Victoria de Durango.
- American Diabetes Association, 2021. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care* 44, S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>.
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., Martínez-Zurita, E., Ortega-Larrocea, P., Heinrich, M., 2006. Disease-Consensus Index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México. *J. Ethnopharmacol.* 107, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.005>.
- Andrade-Cetto, A., Cabello-Hernández, C.A., Cárdenas-Vázquez, R., 2015. Alpha-glucosidase inhibiting activity of five mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacologyonline* 1, 67–71.
- Andrade-Cetto, A., Cárdenas-Vázquez, R., 2010. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J. Ethnopharmacol.* 130, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.016>.
- Andrade-Cetto, A., Cruz, E.C., Cabello-Hernández, C.A., Cárdenas-Vázquez, R., 2019. Hypoglycemic activity of medicinal plants used among the cackhiquels in Guatemala for the treatment of type 2 diabetes. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/2168603>, 2019.
- Andrade-Cetto, A., Espinoza-Hernández, F., Mata-Torres, G., 2021. Hypoglycemic effect of *Calea urticifolia* (mill.) DC. Evidence-based complement. *Alternative Med.* 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/6625009>.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>.
- Andrade-Cetto, A., Medina-Hernández, A.E., 2013. Hypoglycemic effect of *Bromelia plumieri* (E. Morren) L.B. Sm., leaves in STZ-NA-induced diabetic rats. *Front. Pharmacol.* 4, 36. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00036>.
- Andrade, C., Gomes, N.G.M., Duangsrirai, S., Andrade, P.B., Pereira, D.M., Valentão, P., 2020. Medicinal plants utilized in Thai Traditional Medicine for diabetes treatment: ethnobotanical surveys, scientific evidence and phytochemicals. *J. Ethnopharmacol.* 263 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113177>.
- Arion, W.J., 1989. [7] Measurement of intactness of rat liver endoplasmic reticulum. In: Fleischer, S., Fleischer, B., Abelson, J., Simon, M. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 58–67. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)74010-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)74010-6).
- Ayuntamiento de Huejutla de Reyes, 2010. *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, Estado de Hidalgo. Huejutla de Reyes* [WWW Document]. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13028a.html>. accessed 3.18.21.
- Balfour, J., Faulds, D., 1998. Repaglinide. *Drugs Aging* 13, 173–180. <https://doi.org/10.2165/00002512-199813020-00008>.
- Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., Msanda, F., 2017. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 198, 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.023>.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., Avaeva, S.M., 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 171, 266–270. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90484-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90484-8).
- Berridge, T.L., Doxey, J.C., Roach, A.G., 1992. Comparison of the effects of efaroxan and glibenclamide on plasma glucose and insulin levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 213, 213–218. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90684-V](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90684-V).
- Bye, R.A., Linares, E., 1983. The role of plants found in the Mexican markets and their importance in ethnobotanical studies. *J. Ethnobiol.* 3, 1–13.
- Cádiz-Gurrea, M., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., Segura-Carretero, A., 2013. Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium*

- bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Res. Int. 50, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.038>.
- Caesar, L.K., Cech, N.B., 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. Nat. Prod. Rep. 36, 869–888. <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>.
- Calviño, C.I., Martínez, S.G., Downie, S.R., 2008. The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. Mol. Phylogenet. Evol. 46, 1129–1150. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.10.021>.
- Carreón-Sánchez, R., Marroquín-Segura, R., Mora-Guevara, J.L.A., Valadez-Sánchez, C. S., Flores-Cabrera, Y., Flores-Pimentel, M., Hernández-Abad, V.J., 2013. Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. Rev. Mex. Ciencias Farm. 44, 41–45.
- Castro-Torres, I.G., De La O-Arciniega, M., Naranjo-Rodríguez, E.B., Castro-Torres, V.A., Domínguez-Ortiz, M.A., Martínez-Vázquez, M., 2017. The hypocholesterolemic effects of *Eryngium carlinae* F. Delarochae are mediated by the involvement of the intestinal transporters ABCG5 and ABCG8. Evidence-based complement. Alternative Med. 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/3176232>.
- Cersosimo, E., Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Mandarino, L.J., DeFronzo, R.A., 2018. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In: Feingold, K.R. (Ed.), Endotext. MDText. Com. Inc.
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V.S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N.S., Montales, M.T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C.K., Lohani, G.P., Mirza, W., 2017. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. Front. Endocrinol. 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00006>.
- Cheng, A.Y.Y., Fantus, I.G., 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. CMAJ (Can. Med. Assoc. J.) 172, 213–226. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>.
- Choudhury, J., Bora, J., Baruah, D., Borah, T., Bharali, B.K., 2014. Portrayal of folk medicinal practices among the indigenous people of north Tripura district of Tripura, India. Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 5, 480–488. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.05499>.
- Cizmarova, B., Hubkova, B., Bolerazska, B., Marekova, M., Birkova, A., 2020. Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. Bioact. Compd. Heal. Dis. 3, 74–81. <https://doi.org/10.31989/bchd.v3i4.692>.
- Clement, Y.N., Morton-Gittens, J., Basdeo, L., Blades, A., Francis, M.J., Gomes, N., Janjua, M., Singh, A., 2007. Perceived efficacy of herbal remedies by users accessing primary healthcare in Trinidad. BMC Compl. Alternative Med. 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-7-4>.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2021. EncicloVida: *Eryngium cymosum* [WWW Document]. URL <https://enciclovida.mx/especies/171701-eryngium-cymosum>. accessed 3.18.21.
- Dalar, A., Türker, M., Zabarar, D., Konczak, I., 2014. Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. Plant Foods Hum. Nutr. 69, 30–36. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0393-6>.
- DeFronzo, R.A., 2009. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Diabetes 58, 773–795. <https://doi.org/10.2337/ab09-9028>.
- Escandón-Rivera, S., González-Andrade, M., Bye, R., Linares, E., Navarrete, A., Mata, R., 2012. α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. J. Nat. Prod. 75, 968–974. <https://doi.org/10.1021/np300204p>.
- Escandón-Rivera, S.M., Mata, R., Andrade-Cetto, A., 2020. Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants: a review. Molecules 25, 1–33. <https://doi.org/10.3390/molecules25184145>.
- Flamini, G., Tebano, M., Gioni, P.L., 2008. Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy). Food Chem. 107, 671–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.064>.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. Physiol. Rev. 93, 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>.
- García-Ruiz, I., 2013. Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. Acta Bot. Mex. 103, 65–118. <https://doi.org/10.1016/j.annals.2015.09.009>.
- Ghasemi, A., Khalifi, S., Jodi, S., 2014. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). Acta Physiol. Hung. 101, 408–420. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2>.
- Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002. Enciclopedia de los Municipios de México, Estado de Hidalgo. Huejutla de Reyes [WWW Document]. URL <http://intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13028a.htm>. accessed 3.18.21.
- Gökçay Canpolat, A., Şahin, M., 2020. Glucose lowering treatment modalities of type 2 diabetes mellitus. In: Islam, M.S. (Ed.), Advances in Internal Medicine. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-5-584-2020-516>.
- Hanson, R.W., Owen, O.E., 2013. Gluconeogenesis. In: Metabolism Vitamins and Hormones. Elsevier, pp. 381–386. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00040-2>.
- Heinrich, M., Lardos, A., Leonti, M., Weckerle, C., Willcox, M., Applequist, W., Ladio, A. H., Lin Long, C., Mukherjee, P., Stafford, G., 2018. Best practice in research: Consensus statement on ethnopharmacological field studies. ConSEFS. J. Ethnopharmacol. 211, 329–339.
- Huang, D.W., Shen, S.C., 2012. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. J. Funct. Foods 4, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.005>.
- International Diabetes Federation, 2019. IDF Diabetes Atlas, ninth ed. International Diabetes Federation, Brussels (Belgium). <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>.
- Jarić, S., Maćukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., Pavlović, P., 2015. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). J. Ethnopharmacol. 175, 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.002>.
- Jawad, A.H., Ibrahim, A.E., Alsayed, R., Hallab, Z.S., Al-qaisi, Z., 2016. Study the impact of glucose-6-phosphatase activity in type 2 diabetic patients and non diabetic counterparts. Preprints 1–6. <https://doi.org/10.20944/preprints201610.0137.v1>, 2016100137.
- Jayanthy, G., Subramanian, S., 2014. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet - STZ induced experimental diabetes mellitus. Biomed. Prev. Nutr. 4, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.03.006>.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Augustin, L.S.A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A.L., Axelsen, M., 2002. Glycemic index: overview of implications in health and disease. Am. J. Clin. Nutr. 76, 266–273. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.1.266>.
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., Thiem, B., 2012. Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L. Acta Physiol. Plant. 34, 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1011-1>.
- Leroux-stewart, J., Rabasa-lhoret, R., Chiasson, J., 2015. α -Glucosidase inhibitors. In: DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Zimmet, P., Alberti, G. (Eds.), International Textbook of Diabetes Mellitus. John Wiley & Sons, Ltd., Eds, pp. 673–685. <https://doi.org/10.1002/9781118387658>.
- Maffettone, A., Rinaldi, M., Fontanella, A., 2018. Postprandial hyperglycemia: a new frontier in diabetes management? Ital. J. Med. 12, 108–115. <https://doi.org/10.4081/ijtm.2018.961>.
- Mahmoudi, Fariba, Mahmoudi, Farzaneh, Gollo, K.H., Amini, M.M., 2020. Biosynthesis of novel silver nanoparticles using *Eryngium thrysoides* Boiss extract and comparison of their antidiabetic activity with chemical synthesized silver nanoparticles in diabetic rats. Biol. Trace Elem. Res. 199 (5), 1967–1978. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02315-4>.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-buys, D., Novelli, M., Ribes, G., 1998. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 47, 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. Front. Pharmacol. 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00215>.
- Matsuda, M., DeFronzo, R.A., 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. Diabetes Care 22, 1462–1470. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., Hu, Y., 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. Evidence-Based Complement. Alternative Med. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>, 2013.
- Meng, X.M., Ma, X.X., Tian, Y.L., Jiang, Q., Wang, L.L., Shi, R., Ding, L., Pang, S.G., 2017. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 21, 2232–2237.
- Miranda-Velázquez, L.G., 2010. Actividad hipocolesterolemia de plantas de uso etnobotánico en México [PhD thesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Monnier, L., Lapinski, H., Colette, C., 2003. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA1c. Diabetes Care 26, 881–885. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.3.881>.
- National Institute for Biological Standards and Control, 2010. WHO international standard: insulin, human. Version 4.0. NIBSC code: 83/500 [monograph on the Internet] [WWW Document]. URL <https://www.nibsc.org/documents/ifu/83-500.pdf>.
- National Research Council Us, 2011. In: eighth ed. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- Ngo, Y.L., Lau, C.H., Chua, L.S., 2018. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. Food Chem. Toxicol. 121, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.064>.
- Nolan, C.J., Damm, P., Prentki, M., 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. Lancet 378, 169–181. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60614-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60614-4).
- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Ávila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M.M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A., 2012. Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. Biochem. Res. Int. 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/603501>, 2012, 603501.
- Noriega-Cisneros, R., Pena-Montes, D.J., Huerta-Cervantes, M., Torres-Martínez, R., Huerta, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Saavedra-Molina, A., 2020. *Eryngium carlinae* ethanol extract corrects lipid abnormalities in wistar rats with experimental diabetes. J. Med. Food 23, 827–833. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0189>.
- Oecd/Ocde (testing guidelines 425), 2008. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity - up and Down Procedure (UDP).

- Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 550–553. <https://doi.org/10.1021/jf980788t>.
- Palá-Paúl, J., 2002. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*Eryngium*” L., en la Península Ibérica [PhD thesis]. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Paul, J.H.A., Seaforth, C.E., Tikasingh, T., 2011. *Eryngium foetidum* L.: a review. *Fitorapia* 82, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.010>.
- Paun, G., Neagu, E., Moroceanu, V., Albu, C., Savin, S., Lucian Radu, G., 2019. Chemical and bioactivity evaluation of *Eryngium planum* and *Cnicus benedictus* polyphenolic-rich extracts. *BioMed Res. Int.* 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/3692605>, 2019.
- Polat, R., Satil, F., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir - Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 139, 626–641. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.004>.
- Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), 2013. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- Rines, A.K., Sharabi, K., Tavares, C.D.J., Puigserver, P., 2016. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (11), 786–804. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.151>.
- Rizza, R.A., 2010. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes* 59, 2697–2707. <https://doi.org/10.2337/db10-1032>.
- Salau, V.F., Erukainure, O.L., Islam, M.S., 2020. Caffeic acid protects against iron-induced cardiotoxicity by suppressing angiotensin-converting enzyme activity and modulating lipid spectrum, gluconeogenesis and nucleotide hydrolyzing enzyme activities. *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (3), 1052–1061. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02227-3>.
- Samuel, V.T., Beddow, S. A., Iwasaki, T., Zhang, X.-M., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., Shulman, G.I., 2009. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12121–12126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812547106>.
- Seeram, N., Xu, J., Li, L., Slitt, A., 2012. Mining red maple (*Acer rubrum*) trees for novel therapeutics to manage diabetes. *Med. Health R.* 1, 95, 283–284.
- Shanak, S., Saad, B., Zaid, H., 2019. Metabolic and epigenetic action mechanisms of antidiabetic medicinal plants. Evidence-based complement. *Alternative Med.* 2019, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/3583067>, 2019.
- Sharma, B., Mittal, A., Dabur, R., 2018. Mechanistic approach of anti-diabetic compounds identified from natural sources. *Chem Biol Lett* 5, 63–99. <https://doi.org/10.2174/092986706776360860>.
- Soumia, B., 2018. *Eryngium campestre* L.: polyphenolic and flavonoid compounds; applications to health and disease. In: *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*. Elsevier, pp. 69–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00007-6>.
- Szablewski, L., 2011. Glucose homeostasis – mechanism and defects. In: Rigobelo, E. (Ed.), *Diabetes - Damages and Treatments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/22905>.
- Tashima, Y., Yoshimura, N., 1975. Control of rabbit liver fructose-1, 6-diphosphatase activity by magnesium ions. *J. Biochem.* 78, 1161–1169. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131012>.
- Un, J.J., Lee, M.K., Yong, B.P., Jeon, S.M., Choi, M.S., 2006. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 318, 476–483. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105163>.
- Upadhyay, J., Polyzos, S.A., Perakakis, N., Thakkar, B., Paschou, S.A., Katsiki, N., Underwood, P., Park, K.H., Seufert, J., Kang, E.S., Sternthal, E., Karagiannis, A., Mantzoros, C.S., 2018. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: an update. *Metabolism* 78, 13–42. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.08.010>.
- van Poelje, P.D., Dang, Q., Erion, M.D., 2007. Fructose-1,6-bisphosphatase as a therapeutic target for type 2 diabetes. *Drug Discov. Today Ther. Strat.* 4, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2007.10.003>.
- Wang, P., 2012. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceut. Crop* 3, 99–120. <https://doi.org/10.2174/2210290601203010099>.
- World Health Organization, 2020. *Diabetes* [WWW Document]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>, accessed 11.5.20.
- World Health Organization, 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. World Health Organization, Geneva.
- Yoshida, T., Okuno, A., Izumi, M., Takahashi, K., Hagsiwa, Y., Ohsumi, J., Fujiwara, T., 2008. CS-917, a fructose 1,6-bisphosphatase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia after meal loading in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Pharmacol.* 601, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.050>.