



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS DE *Swietenia humilis* Zucc.
(MELIACEAE): UNA FUENTE POTENCIAL DE FITOFÁRMACOS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. BERENICE OVALLE MAGALLANES

TUTORA PRINCIPAL: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
FACULTAD DE QUÍMICA, U.N.A.M.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M

MÉXICO D.F. ABRIL DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Mariano Martínez Vázquez
VOCAL	Dr. Andrés Navarrete Castro
VOCAL	Dr. Francisco Hernández Luis
VOCAL	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
SECRETARIO	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

PUBLICACIÓN

Ovalle-Magallanes B., Medina-Campos O. N., Pedraza-Chaverri J., Mata R. **2015**. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*, 110: 111–119.

ESTANCIA ACADÉMICA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN

Proyecto: *In vitro* assessment of the potential anti-hyperglycemic mechanism of action of *Swietenia humilis* (Meliaceae). Supervisor: Dr. Pierre S. Haddad. Laboratorio R-401, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Montreal. Montreal, Canadá. Julio – Noviembre, 2015.

CONGRESOS

QUIMIUNAM 2015. Ponencia: **Antidiabetic properties of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae)**. Abril 2015. México D.F., México.

55th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: **Isolation and pharmacological evaluation of limonoids from *Swietenia humilis* (Meliaceae)**. Agosto 2014. Oxford, Mississippi, Estados Unidos de América.

55th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Cartel: **Antihyperglycemic, hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Swietenia humilis* decoction (Meliaceae)**. Agosto 2014. Oxford, Mississippi, Estados Unidos de América.

10^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Cartel: **Potencial antihiper glucémico de *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae)**. Mayo, 2014. Mérida, Yucatán, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, me proporcionó todos los recursos para continuar y enriquecer mi formación académica y profesional. Gracias por la aventura más grande de mi vida y por este sitio al cual puedo llamar casa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios doctorales (número de becario: 240053), así como por el apoyo complementario de Beca Mixta concedido para la realización de una estancia académica internacional de investigación en la Universidad de Montreal (Canadá). Asimismo agradezco a los proyectos CONACyT 219765 y DGAPA-UNAM (IN-217516) por el financiamiento provisto.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, quien guió mi formación de posgrado. Agradezco su confianza, dedicación, compromiso y paciencia depositados en todos mis proyectos académicos; gracias por alentar siempre mis inquietudes científicas.

A los doctores Andrés Navarrete Castro y Ricardo Reyes Chilpa, miembros del Comité Tutor, quienes contribuyeron al desarrollo de este proyecto de investigación con sus observaciones útiles y puntuales.

A los miembros del jurado asignado, quienes con sus acertados comentarios, cuestionamientos y críticas constructivas sobre esta tesis enriquecieron la versión final de la misma.

A las Dras. Araceli Pérez Vásquez e Isabel del Carmen Rivero Cruz, por la invaluable asesoría técnica brindada en el trabajo experimental desarrollado en el Laboratorio 124. Agradezco al Dr. Abraham Madariaga Mazón por sus enseñanzas y colaboración en los estudios de acoplamiento molecular.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, de la Facultad de Química, UNAM, por el apoyo en la realización de los experimentos de potencial antioxidante y de determinación de glucógeno hepático.

Al Dr. Pierre S. Haddad, de la Universidad de Montreal en Canadá, por darme todas las facilidades en su grupo de trabajo, donde se establecieron los mecanismos de acción antidiabéticos en líneas celulares hepáticas y musculares.

A la Dra. Myrna Déciga Campos, de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, por sus enseñanzas y asesoría en la determinación del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas, IR y RMN.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124 de la Facultad de Química, por su cooperación y sugerencias en el trabajo cotidiano.

A Simón y María del Refugio, Myriam y Emmanuel, por ser y estar siempre conmigo.

A Aldo, por nuestras Historias de Cronopios y de Famas.

A mis padres, por el nombre.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 Generalidades sobre <i>Swietenia humilis</i> Zucc. (Meliaceae)	3
1.1.1 Aspectos taxonómicos y distribución geográfica.....	3
1.1.2 Aspectos etnofarmacológicos.....	4
1.1.3 Constituyentes químicos y actividad biológica.....	5
1.2 Limonoides con potencial en el tratamiento de la obesidad y la diabetes	7
1.3 Generalidades sobre la homeostasis de la glucosa	9
1.3.1 Secreción de la insulina.....	10
1.3.1.1 Efectos metabólicos de la insulina.....	12
1.3.2 AMPK: regulador de la homeostasis.....	13
1.4 Generalidades sobre diabetes mellitus	13
1.4.1 Complicaciones.....	14
1.4.1.1 Neuropatía diabética periférica.....	15
1.4.2 Tratamiento farmacológico de la DMT2.....	16
1.4.2.1 Biguanidas.....	16
1.4.2.2 Sulfonilureas y meglitinidas.....	17
1.4.3.3 Tiazolidinedionas (Glitazonas).....	18
1.4.3.4 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas.....	18
1.4.3.5 Miméticos de incretinas e inhibidores de DPP-4.....	19
1.5 De la polifarmacia a la polifarmacología: el papel de las plantas medicinales en el tratamiento de la DMT2	19
1.5.1 Sinergia: Plantas medicinales y tratamiento alopático.....	22
1.6 Modelos para la evaluación de la actividad hipogluceante y antihiperalgésica de plantas medicinales	24
1.6.1 Modelos <i>in vivo</i>	24
1.6.1.1 Inducción química de hiperglucemia.....	25
1.6.1.2 Síndrome metabólico inducido por fructosa.....	26
1.6.1.3 Modelos animales de hiperalgnesia.....	26
1.6.2 Modelos <i>in vitro</i> basados en células.....	27
1.6.3 Modelos <i>in silico</i>	28
II. HIPÓTESIS	29

III. OBJETIVOS	29
IV. PARTE EXPERIMENTAL	30
4.1 Material vegetal y preparación de extractos	30
4.2 Análisis cromatográficos	30
4.3 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados	31
4.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural	32
4.5 Desarrollo de un método por CLAE para la cuantificación de mexicanólidas	35
4.5.1 Condiciones cromatográficas.....	35
4.5.2 Preparación de las muestras.....	35
4.5.3 Cuantificación de las mexicanólidas en las semillas de <i>S. humilis</i>	36
4.6 Evaluación farmacológica <i>in vivo</i>	36
4.6.1 Preparación y administración de las muestras.....	37
4.6.2 Evaluación de la toxicidad aguda.....	37
4.6.3 Evaluación del potencial hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante.....	38
4.6.3.1 Determinación de la glucemia en ensayos de tipo agudo	38
4.6.3.2 Modelos en ratón.....	39
4.6.3.3 Inducción experimental de hiperglucemia	39
4.6.3.4 Efecto hipoglucemiante agudo de preparados y compuestos	39
4.6.3.5 Efecto antihiper glucémico de DSH y compuestos: pruebas de tolerancia a carbohidratos.....	40
4.6.3.5.1 Prueba de tolerancia a la glucosa oral.....	40
4.6.3.5.2 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral	41
4.6.3.6 Prueba de tolerancia a la insulina.....	41
4.6.4 Establecimiento del posible mecanismo de acción antihiper glucémico de <i>S. humilis</i> ... 41	
4.6.4.1 Construcción de curvas dosis – respuesta.....	41
4.6.4.2 Experimentos de activación y antagonismo: participación de los canales K_{ATP} y/o de receptores serotoninérgicos en el efecto de los compuestos 12 y 3	42
4.6.5 Interacción entre la mexicanólida 12 , DSH, MTF y GLI	43
4.6.6 Modelos en rata	43
4.6.6.1 Inducción experimental de síndrome metabólico en ratas Sprague Dawley (SM-IF) 43	
4.6.6.2 Tolerancia a la glucosa oral.....	44
4.6.6.3 Efecto de la administración diaria de DSH en ratas SM-IF	44
4.6.6.4 Determinación de parámetros bioquímicos, niveles de insulina y glucógeno hepático 44	
4.6.7 Evaluación del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de <i>S. humilis</i>	45
4.6.7.1 Modelo de formalina	45
4.6.7.2 Establecimiento del posible mecanismo de acción como antihiperalgésico de la mexicanólida 12	46
4.7 Análisis estadístico de las evaluaciones <i>in vivo</i>	47
4.8 Evaluación farmacológica <i>in vitro</i>	47
4.8.1 Potencial antioxidante	47
4.8.2 Ensayos basados en células.....	47
4.8.2.1 Citotoxicidad.....	48
4.8.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en células H1IE4. 49	
4.8.2.3 Ensayo de captación de glucosa en células C2C12.....	49
4.8.2.4 Efecto de las mexicanólidas 12 , 3 y 15 sobre la activación de la proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato (AMPK) en células C2C12	50
4.8.2.4.1 Obtención y cuantificación de proteínas.....	50

4.8.2.4.2	Preparación y análisis de las proteínas	51
4.9	Estudios teóricos de modelado molecular	52
4.9.1	Preparación de las estructuras	52
4.9.2	Modelado por homología del receptor serotoninérgico 5-HT _{2C}	52
4.9.3	Preparación de las estructuras para el modelado molecular	53
4.9.4	Estudios de acoplamiento molecular	53
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
5.1	Parámetros de composición: estudio fitoquímico y perfiles cromatográficos de <i>S. humilis</i>	54
5.1.1	Aislamiento y elucidación estructural de las humilinólidas G (13) y H (15)	55
5.1.2	Desarrollo de un método por CLAE para la cuantificación de las mexicanólidas de <i>S. humilis</i>	66
5.2	Evaluación farmacológica: seguridad y eficacia antidiabética de <i>S. humilis</i>	68
5.2.1	Seguridad: Toxicidad aguda en ratones	69
5.2.2	Eficacia antidiabética en ratones	69
5.2.2.1	Efecto hipoglucemiante agudo	70
5.2.2.2	Efecto antihiper glucémico agudo: tolerancia a la glucosa y a la sacarosa orales.....	73
5.2.2.3	Tolerancia a la insulina intraperitoneal	78
5.2.3	Eficacia antihiper glucémica, hipoglucemiante e hipolipemiante en ratas con síndrome metabólico	79
5.2.4	Aproximación <i>in vivo</i> al mecanismo de acción antidiabético de <i>S. humilis</i>	81
5.2.4.1	Activación y antagonismo.....	82
5.2.5	Estudio de acoplamiento molecular de las mexicanólidas de <i>S. humilis</i>	84
5.2.6	Aproximación <i>in vitro</i> al mecanismo de acción antidiabético de <i>S. humilis</i>	89
5.2.6.1	Potencial antioxidante	90
5.2.6.2	Ensayos basados en células	90
5.2.6.2.1	Ensayo de citotoxicidad.....	91
5.2.6.2.2	Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa en células HIIE4.....	92
5.2.6.2.3	Ensayo de captación de glucosa en células C2C12.....	93
5.2.6.2.4	Efecto de las mexicanólidas 12 , 3 y 15 en la fosforilación de AMPK en células C2C12	94
5.3	Interacciones planta medicinal-fármaco alopático: el caso de <i>S. humilis</i>	95
5.4	Eficacia antinociceptiva y antihiperalgésica de <i>S. humilis</i>	98
5.4.1	Establecimiento del modelo de hiperalgnesia	98
5.4.2	Efecto de DSH y de la mexicanólida 12 en el modelo de la formalina	99
5.4.3	Mecanismo de acción antihiperalgésico de la mexicanólida 12 en la prueba de la formalina.....	101
VI.	CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS	121

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Swietenia humilis</i> Zucc.	4
Figura 2. Origen y clasificación de los limonoides de las Meliáceas.	6
Figura 3. Limonoides con propiedades reductoras de peso e hipoglucemiantes	8
Figura 4. Espectros de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN de la Humilinólida G (13).	58
Figura 5. Correlaciones selectas del espectro bidimensional HMBC de la Humilinólida G (13).	59
Figura 6. Principales correlaciones observadas en los experimentos HMBC y COSY para la Humilinólida G (13).	59
Figura 7. Estructura tridimensional de la Humilinólida G (13) resuelta por difracción de rayos X.	60
Figura 8. Espectros de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN de la Humilinólida H (15).	62
Figura 9. Correlaciones selectas del espectro bidimensional HMBC de la Humilinólida H (15).	63
Figura 10. Principales correlaciones observadas en los experimentos HMBC y COSY para la Humilinólida H (15).	63
Figura 11. Principales correlaciones observadas en el espectro bidimensional NOESY de la Humilinólida H (15).	64
Figura 12. Espectros de dicroísmo circular de las humilinólidas G (13) y H (15).	64
Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE de la decocción de <i>S. humilis</i> con las mexicanólidas 1-3, 6, 12-15 identificadas.	66
Figura 14. Efecto hipoglucemiante agudo de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	71
Figura 15. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto hexánico de <i>S. humilis</i> (HSH) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	71
Figura 16. Efecto hipoglucemiante agudo de las mexicanólidas 12 y 3 de <i>S. humilis</i> en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	72
Figura 17. Prueba de tolerancia a la glucosa de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	74
Figura 18. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida 12 en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	75
Figura 19. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida 1 en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos	76
Figura 20. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida 3 en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	76
Figura 21. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH) en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	78
Figura 22. Prueba de tolerancia a la insulina de la mexicanólida 12 en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.	79
Figura 23. Panel A. Tolerancia a la glucosa oral en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa (SM-IF) y en ratas sin síndrome metabólico (dieta chow). Panel B. Tolerancia a la glucosa oral de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH) en ratas SM-IF.	81
Figura 24. Establecimiento del posible mecanismo de acción de los compuestos 12 y 3	83
Figura 25. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del receptor cristalizado 5-HT _{2B} y del receptor 5-HT _{2C}	84
Figura 26. Diagramas de Ramachandran (casos generales) del receptor 5-HT _{2C} (Panel A) y del receptor 5-HT _{2B} (Panel B)	85
Figura 27. Modelos para el acoplamiento de la serotonina, ketanserina y las mexicanólidas (1-3, 6, 12-15).	87

Figura 28. Modelos para el acoplamiento de las mexicanólidas 12 (A), 3 (B), 1 (C), 4 (D), 13 (E), 6 (F), 14 (G), y 15 (H) con el receptor serotoninérgico 5-HT _{2C}	88
Figura 29. Ensayo LDH. Panel A, células H4IIE, y Panel B, células C2C12, de la decocción de <i>S. humilis</i> y de las mexicanólidas 12 , 3 y 15	91
Figura 30. Ensayo de inhibición de la enzima G6Pasa en células hepáticas H4IIE de la decocción de <i>S. humilis</i> y de las mexicanólidas 12 , 3 y 15	92
Figura 31. Ensayo de captación de glucosa en células musculares C2C12 de la decocción de <i>S. humilis</i> y de las mexicanólidas 12 , 3 , y 15	93
Figura 32. Efecto de las mexicanólidas 12 , 3 y 15 en la expresión de p-AMPK en células C2C12.....	94
Figura 33. Curvas dosis-respuesta del efecto antihiper glucémico de la mexicanólida 12 , glibenclamida, metformina, y la decocción de <i>S. humilis</i>	96
Figura 34. Efecto en la glucemia del compuesto 12 , de la glibenclamida, de la metformina, de la decocción de <i>S. humilis</i> , y combinaciones, durante un experimento de interacción.....	97
Figura 35. Curso temporal del comportamiento nociceptivo inducido por una inyección s.c. de una solución diluida de formaldehído (formalina) a ratones normoglucémicos (2%) e hiper glucémicos (1%).....	99
Figura 36. Efecto antinociceptivo de la decocción de <i>S. humilis</i> en ratones normoglucémicos durante las fases 1 (Panel A), 2 (Panel B) y área bajo la curva total (Panel C), y efecto antihiper algésico de la decocción de <i>S. humilis</i> en ratones hiper glucémicos durante las fases 1 (Panel D), 2 (Panel E), y área bajo la curva total (Panel F) en la prueba de la formalina.....	100
Figura 37. Efecto antihiper algésico de la mexicanólida 12 ratones hiper glucémicos durante las fases 1 (Panel A), 2 (Panel B), y área bajo la curva total (Panel C) en la prueba de la formalina.....	101
Figura 38. Curso temporal del efecto antihiper algésico de la mexicanólida 12 en ratones hiper glucémicos.....	101
Figura 39. Posible mecanismo de acción antihiper algésico de la mexicanólida 12 en ratones hiper glucémicos. Modulación serotoninérgica (Paneles A y C) y GABAérgica (Paneles B y C).....	103
Figura 40. Posible mecanismo de acción antihiper algésico de la mexicanólida 12 en ratones hiper glucémicos. Modulación opioide.....	104
Figura 41. Posible mecanismo de acción antihiper algésico de la mexicanólida 12 en ratones hiper glucémicos. Modulación nitrérgica.....	107
Figura 42. Posible mecanismo de acción antihiper algésico de la mexicanólida 12 en ratones hiper glucémicos. Modulación vía guanilato ciclasa y canales K _{ATP}	108

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Limonoides de <i>Swietenia humilis</i>	7
Cuadro 2. Posible mecanismo de acción de metabolitos hipoglucemiantes selectos.....	21
Cuadro 3. Resultado de la combinación entre metabolitos secundarios y fármacos hipoglucemiantes.....	23
Cuadro 4. Limonoides aislados de <i>Swietenia humilis</i> en la presente investigación.....	55

Lista de Tablas

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN de las humilinólidas G y H (compuestos 13 y 15) en CDCl ₃ [¹ H (400 MHz), ¹³ C (100 MHz)].	65
Tabla 2. Parámetros de regresión, límites de detección, cuantificación, precisión y exactitud para la mexicanólida metil-2-hidroxi-3-β-tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (3) en <i>S. humilis</i> .	67
Tabla 3. Resultado de la cuantificación por CLAE de las mexicanólidas de <i>S. humilis</i> .	68
Tabla 4. Toxicidad aguda de la droga cruda y de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH).	69
Tabla 5. Efecto de la decocción de <i>S. humilis</i> (DSH) en ratas Sprague Dawley con síndrome metabólico inducido por fructosa (SM-IF) en algunos parámetros metabólicos	80
Tabla 6. Parámetros de acoplamiento molecular de las mexicanólidas de <i>S. humilis</i> , serotonina y ketanserina calculados con Autodock Vina.	89

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ABC	Área bajo la curva
AICAR	Ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida
ACA	Acarbosa
AcOEt	Acetato de etilo
ARG	L-arginina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ANADEVA	Análisis de varianza
BKF	Buffer de Krebs-fosfatos
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
DL ₅₀	Dosis letal media
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DSH	Decocción de <i>Swietenia humilis</i>
DZX	Diazóxido
EEM	Error estándar de la media
EM-IE	Espectroscopía de masas-impacto electrónico
FBS	Suero fetal bovino
FLU	Flumazenilo
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GBP	Gabapentina
G6Pasa	Enzima glucosa-6-fosfatasa
GC	Enzima guanilato ciclasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GLI	Glibenclamida
HS	Suero de caballo
HSH	Extracto hexánico de <i>Swietenia humilis</i>
ICH	International Conference on Harmonisation
K _{ATP}	Canales de potasio sensibles a ATP
KET	Ketanserina
L-NAME	Éster metílico de L-nitroarginina
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
MTF	Metformina
NA	Nicotinamida
NO	Óxido nítrico
NLX	Naloxona

ODQ	1- <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-ona,
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Buffer de fosfatos salino
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
PTSO	Prueba de tolerancia a la sacarosa oral
SIN-1	3-morfolinosisidnonimina
STZ	Estreptozotocina
t_R	Tiempo de retención
VEH	Vehículo
5-HT	Receptor serotoninérgico

Resumen

El presente trabajo describe los estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a las semillas de *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae), una especie empleada tradicionalmente en México para el tratamiento de la diabetes y otras afecciones metabólicas. Estos estudios ayudaron a establecer su eficacia como agente antidiabético, y de generar algunos parámetros de calidad y seguridad.

En primera instancia, la investigación química condujo al aislamiento de ocho limonoides del tipo mexicanólida: humilina B (**1**), metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**2**), metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**), humilinólida C (**6**), acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**), metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**13**), humilinólida G (**14**) y humilinólida H (**15**), caracterizados todos ellos mediante la aplicación de técnicas espectrométricas y espectroscópicas. Las humilinólidas G (**14**) y H (**15**) son nuevas entidades químicas y la mexicanólida **12** se reporta por primera vez para la especie.

La obtención del perfil cromatográfico de la decocción de las semillas, el preparado consumido de forma tradicional, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) permitió desarrollar y validar un método analítico por esta técnica. Con dicho método se cuantificaron las mexicanólidas presentes en las semillas de *S. humilis*. Las condiciones optimizadas fueron las siguientes: columna Synergi™ 4 μ m Hydro-RP 80 Å (150 \times 4.6 mm, *d.i.* 4 μ m; Phenomenex), elución de tipo gradiente [fase móvil CH₃OH-H₂O (A) (30:70) y CH₃CN (B) de 45% B (0 min), a 55% B (10 min), a 100% B (30 min)], velocidad de flujo de 0.4 ml min⁻¹; longitud de onda de detección de 208.7 nm. El contenido total de mexicanólidas fue de 330.19 \pm 40.4 mg por gramo de semilla de *S. humilis*.

Las evaluaciones preclínicas comenzaron con el establecimiento de la inocuidad de *S. humilis* en roedores empleando el método de Lorke. El estudio toxicológico de la droga cruda y de la decocción mostró que los preparados no son tóxicos; la dosis letal media (DL₅₀) de ambos fue superior a 5 g/kg.

La eficacia antidiabética de *S. humilis* se evaluó en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (nicotinamida-estreptozotocina, 50-130 mg/kg). Los resultados obtenidos en

experimentos hipoglucemiantes agudos revelaron que la decocción (100 mg/kg) es un mejor agente hipoglucemiante respecto a un extracto hexánico (100 mg/kg) y a las mexicanólidas **12** y **3** (31.6 mg/kg). Asimismo, la decocción (100–316 mg/kg) y las mexicanólidas **12**, **1** y **3** (3.16–31.6 mg/kg) demostraron un efecto antihiper glucémico significativo en la prueba de tolerancia a la glucosa oral, tanto en ratones normoglucémicos como en hiper glucémicos, lo que evidenció el potencial de la especie para reducir la glucemia postprandial. Los resultados generados en la prueba de tolerancia a la sacarosa en animales normoglucémicos permitieron descartar la inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales como mecanismo de acción antihiper glucémico de la especie. La mexicanólida **12** actuó como sensibilizadora a la acción de la insulina (2 y 10 mg/kg) en los animales de experimentación.

La administración durante una semana de la decocción a ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa provocó cambios metabólicos que se correlacionaron con el uso de la especie como “depurativa de la sangre”. Este preparado (100 mg/kg) demostró efectos antihiper glucémicos, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, de reducción de grasa abdominal y de ácido úrico, así como un importante incremento en el glucógeno hepático en los animales tratados. Por otra parte, la decocción no modificó los niveles de insulina.

Una vez comprobada la eficacia antidiabética de *S. humilis*, se seleccionó a la mexicanólida **12** para establecer sus posibles mecanismos de acción *in vivo* en ratones hiper glucémicos. Los experimentos diseñados permitieron determinar que es muy probable que **12** interactúe tanto con los canales K_{ATP} de las células β pancreáticas en un sitio distinto al sulfonilurea, como con receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} a nivel sistémico. Respecto a esta última propuesta, los estudios teóricos de acoplamiento molecular realizados para las mexicanólidas **1–3**, **6**, y **12–15** con un receptor 5-HT_{2C} construido por homología sugieren que la interacción entre las mexicanólidas y este tipo de receptores es posible.

Con la finalidad de profundizar en los mecanismos de acción de *S. humilis*, se realizaron evaluaciones con la decocción y las mexicanólidas **12**, **1**, **3** y **15** en modelos *in vitro*. La decocción, y los compuestos **12**, **1** y **3** tuvieron una actividad antioxidante moderada. En modelos celulares se demostró que la decocción y las mexicanólidas **12**, **3** y **15** inhibían a la enzima glucosa-6-fosfatasa hepática, resultado que explica el moderado efecto hipoglucemiante de la especie. Las mismas mexicanólidas promovieron la captación de glucosa en cultivos de células musculares, sustentando así el efecto antihiper glucémico de *S. humilis*.

Otra línea de investigación preclínica de la especie estuvo encaminada a analizar las interacciones *in vivo* entre la decocción y la mexicanólida **12** con los fármacos glibenclamida y metformina. La combinación decocción-glibenclamida y **12**-glibenclamida resultó en la abolición del efecto antihiper glucémico; por otro lado, la asociación de la decocción y de **12** con metformina aumentó el efecto antihiper glucémico.

Finalmente, se analizó el potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de *S. humilis* en ratones empleando el modelo de formalina. La decocción mostró eficacia antinociceptiva en ratones normoglucémicos ($CE_{50} = 44.4 \mu\text{g/pata}$) y antihiperalgésica en animales hiper glucémicos ($CE_{50} = 130.4 \mu\text{g/pata}$). Puesto que la mexicanólida **12** también tuvo un efecto antihiperalgésico significativo ($CE_{50} = 2.91 \mu\text{g/pata}$), se evaluaron los posibles mecanismos de acción involucrados. Así, los resultados de estos experimentos sugieren que **12** ejerce su efecto antihiperalgésico a través de la modulación central de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C}, los receptores GABA_A, y los receptores opioides. Los efectos periféricos de **12**, entonces, parecieran estar relacionados con la participación de las vías nitrérgicas, las cuales pueden activarse como resultado del efecto central de **12** sobre las vías serotoninérgicas, GABAérgicas y opioides.

En síntesis, los hallazgos de esta investigación, además de su importancia científica *per se* al generar conocimiento inédito desde los puntos de vista químico y farmacológico, constituyen un aporte importante para sustentar el uso racional de *S. humilis* en las prácticas médicas alternativas de México. Además, el trabajo proporciona herramientas para propiciar la regulación oficial de los recursos fitoterapéuticos en nuestro país.

Abstract

This dissertation describes the phytochemical and pharmacological studies conducted in order to establish the antidiabetic efficacy as well as some safety and quality parameters of the seeds of *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae), a species used in Mexican Traditional Medicine for treating type 2 diabetes mellitus and other metabolic diseases.

Chemical investigation of the seeds allowed the isolation of eight limonoids of the mexicanolides type, identified by spectrometric and spectroscopic techniques as, humilin B (**1**), methyl-2-hydroxy-3- β -isobutyroxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**2**), methyl-2-hydroxy-3- β -tigloyloxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**3**), humilinolide C (**6**), 2-hydroxy-destigloyl-6-deoxyswietenine acetate (**12**), methyl-2-hydroxy-3- β -isobutyoyl-8 α ,30 α -epoxy-1-oxomeliacate (**13**), humilinolide G (**14**), and humilinolide H (**15**), Compounds **14** and **15** are new chemical identities, and **12** is described for the first time for the species.

A chromatographic profile of the decoction of the seeds obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) led to the development and validation of an analytical method for quantifying the mexicanolides present in the seeds. The optimized conditions were: a Synergi™ 4 μ m Hydro-RP 80 Å (150 \times 4.6 mm, *i.d.* 4 μ m; Phenomenex) column, a gradient elution mode [mobile phase CH₃OH-H₂O (A) (30:70) and CH₃CN (B); from 45% B (0 min), to 55% B (10 min), to 100% B (30 min)], a flow of 0.4 ml min⁻¹; detection wavelength of 208.7 nm. The total content of mexicanolides in the seeds was 330.19 \pm 40.4 mg *per* gram.

As first step in the preclinical evaluations, acute toxicity studies of the seeds and their decoction were conducted in mice following the method of Lorke. According to this protocol, the preparations were not toxic; the medium lethal doses (LD₅₀) of both were higher than 5 g/kg.

The antidiabetic efficacy of *S. humilis* was evaluated in normoglycemic and hyperglycemic mice (nicotinamide-streptozotocin, 50-130 mg/kg). The results obtained in acute hypoglycemic assays revealed that the decoction (100 mg/kg) is a better hypoglycemic agent than a hexanic extract (100 mg/kg) or the mexicanolides **12** and **3** (31.6 mg/kg). Furthermore, the decoction (100–316 mg/kg) and the mexicanolides **12**, **1**, and **3** (3.16–31.6 mg/kg) exhibited a significant antihyperglycemic effect when evaluated in an oral glucose tolerance test, demonstrating the capacity of the species to lower postprandial glycemia. In

addition, the outcomes of an oral sucrose tolerance test conducted with the decoction ruled out the inhibition of the intestinal α -glucosidases enzymes as a possible antihyperglycemic mechanism of action. Mexicanolide **12** acted as an insulin sensitizer (2 and 10 mg/kg) in the experimental animals according to an insulin tolerance test.

In a rat model of fructose-induced metabolic syndrome, the decoction (100 mg/kg) exhibited significant antihyperglycemic, hypoglycemic, and hypolipidemic effects; it also diminished abdominal fat, uric acid levels, and produced an important augmentation of hepatic glycogen content without affecting the insulin levels. These findings correlated with the traditional use of the species as “blood depurative”.

Then, we explored the possible *in vivo* mechanisms of action of mexicanolide **12** using hyperglycemic mice. The results suggested that **12** interacted with the β -pancreatic K_{ATP} channels in a non-sulfonylurea site, and with 5-HT_{2A/C} receptors. Theoretical studies of molecular docking of mexicanolides **1-3**, **6**, and **12-15** with a 5-HT_{2C} receptor built by homology modeling predicted that the binding of mexicanolides with this type of receptors is possible.

Further analyses of the possible *in vitro* antidiabetic mechanisms of action of *S. humilis* showed that the decoction and compounds **12**, **1**, and **3** had a moderated antioxidant capacity. When using cell-based models, it was demonstrated that the decoction and mexicanolides **12**, **3**, and **15** inhibited the hepatic glucose-6-phosphatase enzyme; these compounds also enhanced glucose uptake in muscle cells. These results explained both the hypoglycemic and the antihyperglycemic effect of the species.

In other series of experiments, the interactions between the decoction and mexicanolide **12**, with glibenclamide or metformin were analyzed. Co-administration of these treatments with glibenclamide resulted in the abolition of their pharmacological effect. In contrast, the antihyperglycemic effect of the decoction and **12** were augmented upon combination with metformin.

Finally, the antinociceptive and antihyperalgesic potential of *S. humilis* were assessed using the formalin model. The decoction exhibited significant antinociceptive effect in normoglycemic mice ($EC_{50} = 44.4 \mu\text{g/paw}$), and antihyperalgesic action in hyperglycemic mice ($EC_{50} = 130.4 \mu\text{g/paw}$). Compound **12** also had a significant antihyperalgesic effect ($EC_{50} =$

2.91 $\mu\text{g/paw}$). The possible mechanism of action was established using the same model, and the results revealed the involvement of 5-HT_{2A/C}, GABA_A, and opioid receptors in the central effect of **12**, while its peripheral action could be attributed to the activation of the nitrenergic pathways triggered by its central serotonergic, GABAergic and opioid modulation.

In summary, the pharmacological and chemical findings of this work are relevant not only from the scientific point of view but also because they will support the rational use of *S. humilis* in Mexican alternative practices. Furthermore, this research provides useful tools that could be applied in the official regulation of herbal medicines in Mexico.

Introducción

La prevalencia mundial de desórdenes metabólicos como la obesidad, las dislipidemias, la hipertensión arterial y la diabetes, ha incrementado dramáticamente en la última década. En particular, la diabetes ha acaparado la atención no sólo de los profesionales de la salud sino del público en general debido a su alta tasa de incidencia entre todos los sectores poblacionales. De hecho, los informes más recientes emitidos tanto por la Federación Internacional de Diabetes como por la Organización Mundial de la Salud (OMS), revelan que aproximadamente 415 millones de personas están afectadas por algún tipo de diabetes mellitus, siendo la más frecuente la tipo 2 (DMT2; 90% de los casos), y que en el transcurso de las próximas dos décadas, la cifra alcanzará los 640 millones (IDF, 2015; OMS, 2015). Los índices de morbilidad y mortalidad asociados a esta enfermedad son elevados en los países pobres y en los de economías emergentes. Esto lo confirma la Encuesta Nacional de Salud de 2012 para México, donde el 10% de los mexicanos vive con diabetes, y las complicaciones asociadas como infartos, neuropatía diabética, amputaciones, daño renal, y ceguera, conducen a la reducción de la calidad y de la expectativa de vida de quienes la padecen (ENSANUT, 2012).

La prevención es una de las propuestas centrales de la OMS para frenar la diabetes; sin embargo, las campañas que promueven un estilo de vida más saludable, como modificaciones en la dieta y el incremento de actividad física, no han tenido el éxito esperado (OMS, 2015). Por lo tanto, los sistemas de salud enfrentan la diabetes con diversas estrategias farmacológicas que incluyen el incremento de los niveles de insulina, la sensibilización de los tejidos a ésta, y la reducción de la cantidad de carbohidratos absorbidos en el tracto gastrointestinal, entre otras (Krentz, y Bailey, 2005; Lorenzati *et al.*, 2010). Los pacientes diabéticos están sometidos a regímenes medicamentosos complejos que con frecuencia conllevan el riesgo de hipoglucemia y de aumento de peso, lo cual supone altibajos en el tratamiento. Es entonces comprensible que quienes viven con DMT2 demanden terapias más eficaces, que además no sean onerosas y que sean fácil adquisición (Israili, 2011).

Ante este panorama, las personas diabéticas recurren con frecuencia a alternativas terapéuticas, entre las que destacan las plantas medicinales. En nuestro país, éstas cuentan con arraigo histórico en las prácticas médicas y muy buena aceptación entre la población. Sin embargo, de las más de 380 especies reportadas en México como antidiabéticas, únicamente

un tercio posee estudios químicos y/o farmacológicos que sustentan su seguridad y eficacia (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2013).

Es conveniente recalcar que la investigación de plantas medicinales no sólo permite la obtención de principios activos que pudiesen servir como cabezas de serie para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la diabetes, como fue el caso de la metformina, sintetizada a partir de una guanidina aislada de *Galega officinalis* (Calixto, 2000; Witters, 2001), sino que da pauta a la preparación de fitomedicamentos polifarmacológicos capaces de reducir los niveles de glucosa y de atenuar otros trastornos asociados a la diabetes (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

Nuestro grupo de investigación ha dedicado más de una década a la generación de información científica de algunas de las especies medicinales con reputación hipoglucemiante de mayor uso, como el copalchi (*Hintonia latiflora* y *Hintonia standleyana*), la prodigiosa (*Brickellia cavanillesii*), el chuchupate (*Ligusticum porteri*), el estafiate (*Artemisia ludoviciana*), el simonillo (*Conyza filaginoides*), entre otras (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014; Cristians *et al.*, 2009; Guerrero-Analco, *et al.*, 2007; Escandón-Rivera *et al.*, 2012; Mata *et al.*, 2013; Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015). El eje del estudio de estas especies son los lineamientos emitidos por la OMS para la generación de monografías científicas, documentos que conjuntan información confiable sobre identidad, composición química y eficacia de las plantas medicinales de mayor uso a nivel mundial (OMS, 2011).

El presente trabajo busca aportar información fitoquímica y farmacológica que demuestre de manera preclínica la seguridad y eficacia de un extracto acuoso y de compuestos puros obtenidos de la especie *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae), como agentes capaces de reducir la hiperglucemia, la hipertrigliceridemia y la hiperalgesia en modelos *in vivo* e *in vitro* selectos, con la finalidad de contribuir al establecimiento de las bases del uso racional de esta especie para tratar la diabetes mellitus.

I. Antecedentes

1.1 Generalidades sobre *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae)

1.1.1 Aspectos taxonómicos y distribución geográfica

Las especies pertenecientes a la familia Meliaceae se emplean en todo el mundo por sus maderas de alta calidad y como fuente de recursos terapéuticos. Las meliáceas presentan diversidad morfológica en flores y frutos, y en su composición química, lo cual ha dado pauta a que se clasifiquen en cuatro subfamilias: Swietenioideae, Melioideae, Quivisianthoideae y Capuronianthoideae. A la primera subfamilia pertenece el género *Swietenia*, cuyos miembros más representativos son la caoba de la India (*S. mahagoni* Jacq.), la caoba sudamericana (*S. macrophylla* King), y la caobilla (*S. humilis* Zucc.) (Da Silva *et al.*, 1984; Da Silva *et al.*, 2008).

En México se encuentran dos especies del género *Swietenia*: *Swietenia mahagoni* y *Swietenia humilis* (*Swietenia cirrhata* Blake o *Swietenia bijuga* Preuss) (CONAFOR, 2007). *Swietenia humilis* es un árbol de altura media (15-20 m) que crece en altitudes desde los 200 hasta 1500 msn, en las áreas de manglar y de bosques tropicales y caducifolios, así como asociado a plantaciones, en los estados de Guerrero, Michoacán, Colima, Sinaloa y Chiapas, donde los árboles se encuentran como individuos aislados. Es conocido como caobilla y caoba del Pacífico; sus denominaciones populares son zopilote, zopilopatli, sopilocuahuitli, cóbano, palo de zopilohuite, gateado, zapatón, flor de venadillo (Nayarit), kiniam, tson tendo kind (Oaxaca), y zopilocoahuit (Michoacán) (Standley, 1926; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). El fruto del árbol es una cápsula lisa ovoide de color café grisáceo, de 8-20 cm de longitud y 10-12 cm de diámetro. Las semillas, de color amarillo claro y de 6-9 cm de longitud, se emplean en las prácticas médicas populares en forma de *horchata* (suspensión acuosa de las semillas molidas), decocción o infusión (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). *Swietenia humilis* (**Figura 1**) se encuentra en diversas listas que la señalan como especie en riesgo con necesidad de conservación (CONAFOR, 2007).



Figura 1. *Swietenia humilis* Zucc. Temixco, Morelos. Abril, 2012. (A. Tapia, 2012)

1.1.2 Aspectos etnofarmacológicos

Los primeros reportes de los usos medicinales de las semillas de *S. humilis* se encuentran en la obra del siglo XVI de Francisco Hernández *Historia de las Plantas de la Nueva España*. En ella, se relatan los usos de la especie como antitumoral, antitusígeno, astringente, y suavizante de la piel (Hernández, 1959):

CAPITULO CLXVIII. *Del TZOPILOTLTZONTECOMATL o cabeza de aura*

El TZOPILOTLTZONTECOMATL o *tzopilotl* es un árbol grande con hojas largas y angostas y fruto grande y oblongo que encierra unos huesos planos, amargos, buenos para el pecho y de sabor parecido al de las almendras amargas, aunque dejan al fin olor de almizcle y sabor fétido. Son éstos calientes casi en tercer grado, y manan cierto líquido oleaginoso y emoliente. Parecen tener propiedades semejantes a las del aceite de almendras amargas, y así disuelven los tumores, curan la tos, suavizan el pecho, introducidos en la nariz limpian la cabeza, y alivian las úlceras. Además, el aceite sacado de este fruto suaviza y limpia el rostro de las mujeres. Nace en *Hoitzoco* por todas partes, pero principalmente en las colinas.

Tzopiltzontecomatl: de *tzopilo* (*tl*), *zopilote*, y *tzontecomatl*, cabeza. Cabeza de *zopilote*.

En el estudio del siglo XIX *Sinonimia vulgar y científica de las plantas de la Nueva España*, M. Sessé y J. Mociño identifican como *tzopilotzonte* a *Swietenia mahagoni* L. (*S. mahagoni* Jacq.), aunque las revisiones posteriores sugieren que tal vez la especie descrita es *S. humilis* (Standley, 1926; Martínez, 1989). En las descripciones etnofarmacológicas actuales, las semillas de *S. humilis* se emplean solas o bajo la forma de decocción para aliviar trastornos del aparato digestivo, (disentería, diarrea, enfermedades parasitarias, empacho), o en combinación con hierbabuena (*Mentha x piperita*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), o apio

(*Apium graveolens*). Otros reportes recientes señalan que las semillas ingeridas en forma de horchata son *depurativas de la sangre*, y que las decocciones o infusiones de las semillas son útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Romero-Cerecero *et al.*, 2009).

1.1.3 Constituyentes químicos y actividad biológica

Las familias Meliaceae, Rutaceae y Cneoraceae son las fuentes principales de limonoides, tetranorterpenoides con alto grado de oxigenación que tienen como precursores biogénicos triterpenoides de tipo tirucalano (H-20 α) o eufano (H-20 β), cuya cadena lateral da origen al furano en la posición 17 β , tan común en estos compuestos. La pérdida de cuatro carbonos durante este proceso dio origen al nombre de tetranortriterpenoides. Tras la formación del esqueleto base, se dan múltiples rearrreglos y oxidaciones que conducen a diversas clases de limonoides (**Figura 2**) (Roy y Saraf, 2006; Tan y Luo, 2011). En el género *Swietenia* se ha reportado la presencia de limonoides con esqueleto intacto, B,D-*seco*-limonoides, limonoides tipo fragmalina y mexicanólidas (Da Silva *et al.*, 2008).

A partir de las semillas de *Swietenia humilis* se han aislado la humilina B (**1**) metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oximeliac-8(30)-enato (**2**), el metil-2-hidroxi-3- β -tigloil-1-oximeliac-8(30)-enato (**3**), así como las humilinólidas A-F (**4-9**), la swietenina C (**10**) y la swietemahonina C (**11**) (**Cuadro 1**) (Jimenez *et al.*, 1998; Okorie y Taylor, 1971; Segura-Correa *et al.*, 1993). De manera adicional, Pérez-Rubio y colaboradores (2012), reportaron la naturaleza de los ácidos grasos de un aceite obtenido de las semillas de la especie, siendo los más abundantes el linoléico y linolénico (48%), seguido del oleico (30%), y el palmítico y estearico (18%) (Pérez-Rubio *et al.*, 2012).

Los limonoides se han empleado en la industria agrícola como pesticidas, pues regulan el crecimiento de malezas e interfieren con el ciclo de alimentación de insectos que parasitan cultivos de relevancia económica. Estudios previos biodirigidos de *S. humilis* demostraron la capacidad de un extracto metanólico y de algunos limonoides de las semillas para inhibir el crecimiento de las raíces de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. y de *Amaranthus hypochondriacus* L. Ese extracto también presentó actividad antialimentaria y sobre el crecimiento larvario de *Tenebrio molitor* (Segura-Correa *et al.*, 1993). Jiménez y colaboradores (1998) evaluaron las humilinólidas A-F sobre diversos parámetros del ciclo de vida del

gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hubner); la humilinólida F presentó actividad comparable con el control positivo toosendanina (Jimenez *et al.*, 1998)

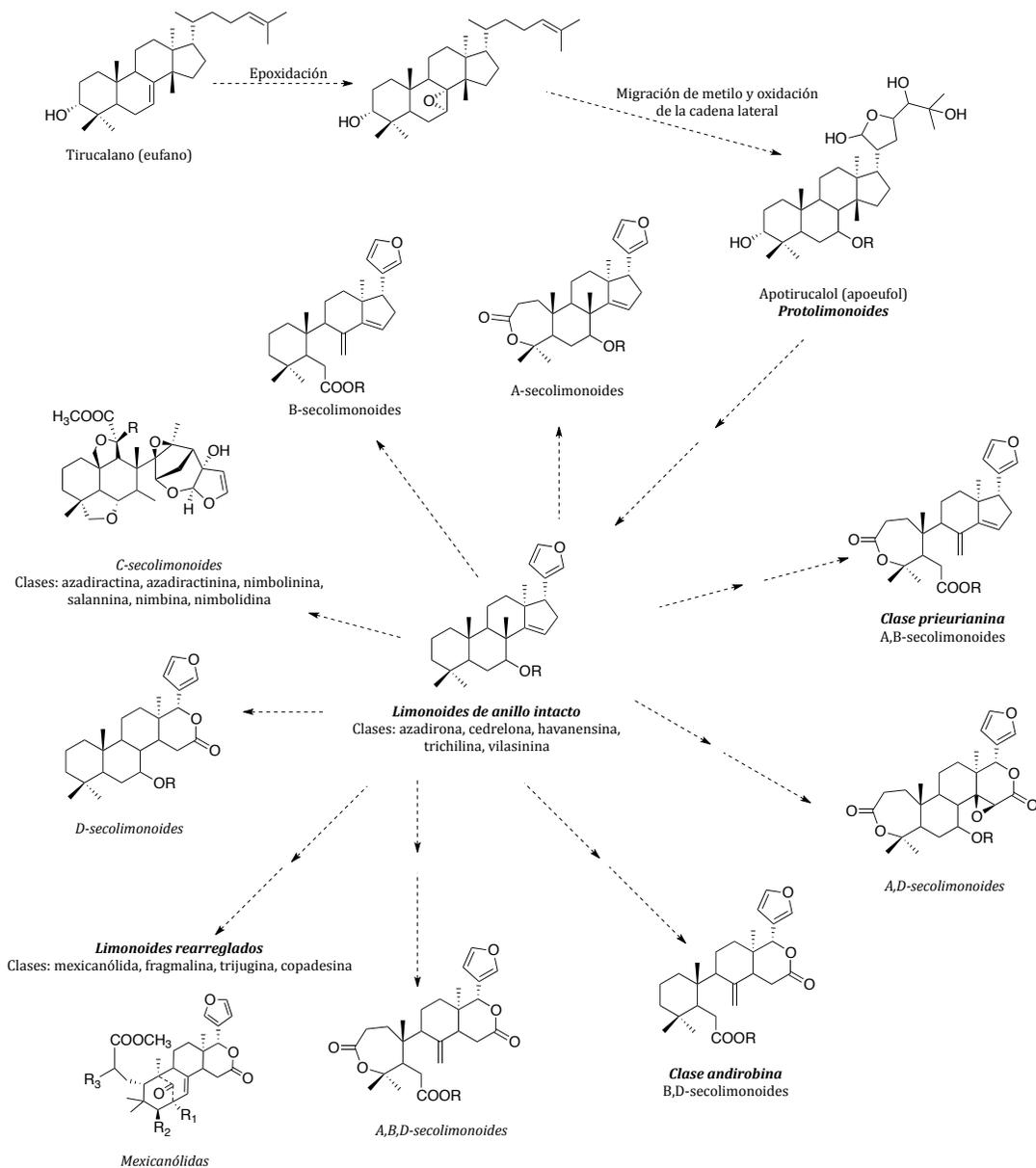
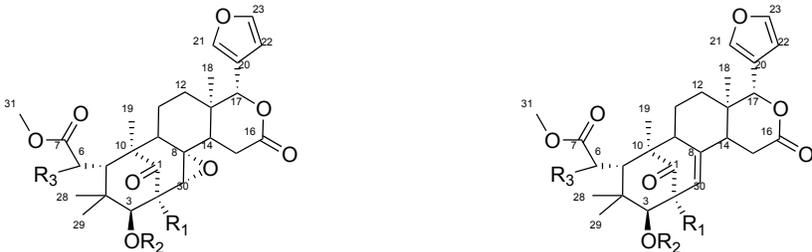


Figura 2. Origen y clasificación de los limonoides de las Meliáceas (Modificado de Tan y Luo, 2011).

Por otra parte, Camacho y colaboradores (2003) evaluaron un extracto metanólico de corteza de *S. humilis* contra promastigotes de *Leishmania donovani* y contra tripomastigotes de *Trypanosoma brucei brucei*. La actividad antileishmania y tripanocida encontrada se asoció a la citotoxicidad que el extracto presentó en un modelo de células KB humanas (Camacho *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Limonoides de *Swietenia humilis*.

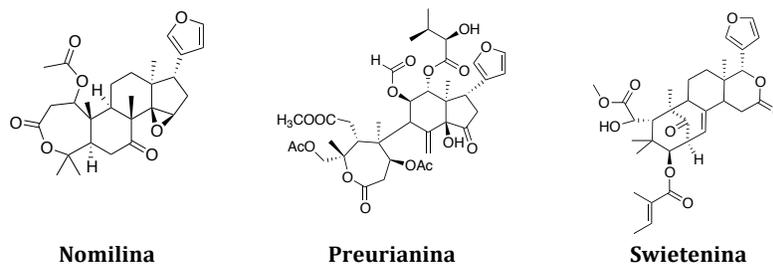


	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
1	OH		H	2	OH		H
4	OH		OH	3	OH		H
5	OH			6			H
9				7	OH		
11	H			8	OH		
				10	OH		OH

Referencias: Jiménez *et al.*, 1998; Okorie y Taylor, 1971; Segura-Correa *et al.*, 1993

1.2 Limonoides con potencial en el tratamiento de la obesidad y la diabetes

Algunos reportes de los usos terapéuticos contemporáneos de los limonoides hacen referencia a sus propiedades para bajar de peso y para tratar la diabetes. Tres compuestos poseen estudios farmacológicos relacionados con esos efectos: el A,D-secolimonoide nomilina (género *Citrus*), el A,B-secolimonoide preurianina (*Trichilia spp*), y la mexicanólida swietenina (*Swietenia macrophylla*) (Figura 3).



Nomilina

Preurianina

Swietenina

Figura**Figura 3.** Limonoides con propiedades reductoras de peso e hipoglucemiantes

La administración crónica de una dieta alta en grasa que contenía 0.2% *p/p* de nomilina a ratones produjo la reducción de peso, de la hiperinsulinemia y de la intolerancia a la glucosa de estos animales. La explicación de tales efectos se evaluaron en modelos basados en células, donde la nomilina actuó como un agonista del receptor TRG5, un receptor metabotrópico que incrementa los niveles de AMPc, y que induce la producción del péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) (Ono *et al.*, 2011; Sato, 2013). La preurianina administrada diariamente a ratones obesos por vía *i.p.* (3 y 5 mg/kg) durante tres semanas tuvo efectos anoréxicos y de reducción de peso; en cultivos de adipocitos, este limonoide inhibió la proliferación y diferenciación celular (Kablan *et al.*, 2010). Dosis únicas de swietenina (25 y 50 mg/kg, *p.o.*) administradas a ratas Wistar diabéticas (estreptozotocina) provocaron un efecto hipoglucemiante agudo significativo; la administración durante cinco días del limonoide en este mismo modelo animal causó una disminución de los niveles de colesterol total y triglicéridos séricos, además de la normalización en el contenido de glucógeno hepático (Dewanjee *et al.*, 2009). Por otra parte, si bien no se determinó la composición química, la administración durante 21 días a ratas Wistar diabéticas de un extracto hidrometanólico de las semillas de *Swietenia mahagoni* (L.), (1 g/kg, *p.o.*) presentó efectos hipoglucemiante e hipolipemiante significativos, así como la reducción del glucógeno hepático (De *et al.*, 2011).

1.3 Generalidades sobre la homeostasis de la glucosa

La glucosa es la principal fuente de energía en los eucariontes, y por tanto juega un papel primordial en el metabolismo. En organismos superiores, este carbohidrato funciona como molécula señalizadora y es clave en la homeostasis energética. Asimismo, puede regular la transcripción de genes, la actividad enzimática, la secreción de hormonas y la actividad de neuronas glucorregulatorias (Thorens y Mueckler, 2010). A pesar de las variaciones entre los periodos de ingesta de alimentos y de ayuno, los niveles plasmáticos de glucosa se mantienen constantes en rangos que van de los 72 a los 120 mg/dl en humanos sanos (OMS, 2015). La homeostasis de la glucosa depende de la capacidad de varios tejidos para detectar la abundancia o escasez de este monosacárido, de modo que pueda ser movilizado de los sitios de almacenamiento o ser sintetizado a partir de varias fuentes. De esta manera, la glucemia es controlada por tres procesos: la absorción de glucosa a través del intestino delgado, la producción de glucosa hepática, y la captación y metabolismo de glucosa en los tejidos periféricos. El desequilibrio agudo de los niveles de glucosa tiene consecuencias severas; la hipoglucemia puede provocar convulsiones, pérdida de conciencia y daño celular irreversible, en tanto que la hiperglucemia puede conducir a la glucotoxicidad, un fenómeno que a largo plazo desencadena en ceguera, daño renal y cardiaco, enfermedades microvasculares y neuropatías (Leturque *et al.*, 2009; Saltiel y Kahn, 2001; Scheepers *et al.*, 2004).

Los monosacáridos de la dieta se absorben en el duodeno y en la parte superior del yeyuno en el intestino delgado. La glucosa y la galactosa emplean un mecanismo de co-transporte dependiente de sodio para acceder a las células epiteliales intestinales, mientras que la fructosa se absorbe mediante difusión facilitada independiente de sodio. Estos azúcares llegan al torrente sanguíneo siguiendo gradientes de concentración, y hacia los capilares sanguíneos por difusión. Durante el ayuno la glucosa sanguínea está regulada por dos fenómenos hepáticos: la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de fuentes distintas a carbohidratos) y/o la glucogenólisis (producción de glucosa a partir de una fuente polimérica). El equilibrio entre estos dos procesos está dado por la mediación de varias hormonas, como el glucagón, la adrenalina, el cortisol y la insulina (Leto y Saltiel, 2012; Saltiel y Kahn, 2001; Scheepers *et al.*, 2004).

Una vez en la sangre, los monosacáridos deben atravesar las membranas plasmáticas celulares empleando proteínas transportadoras de glucosa. Hay dos familias de proteínas que median la transferencia de glucosa y de otros monosacáridos a través de la membrana

lipídica: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras de transporte de glucosa (GLUT). Dos subtipos de los primeros (SGLT1 y SGLT2) se expresan en el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal. Los GLUT se encuentran como alguno de sus 14 subtipos (GLUT1–GLUT13 y HMIT) en todas las células del organismo, siendo los más estudiados GLUT2 (células β pancreáticas e intestinales) y GLUT4 (tejido muscular y adiposo). La existencia de múltiples isoformas de los transportadores, con diferentes propiedades cinéticas y mecanismos de expresión en las superficies celulares, mantiene el fino control de la concentración de glucosa y de la generación de señales que preservan la homeostasis energética. La presencia de los transportadores de glucosa GLUT4 requiere de la acción de la insulina, la hormona hipoglucemiante producida y almacenada en las células β del páncreas, cuya secreción depende de varios factores estimulatorios e inhibitorios (Bryant *et al.*, 2002; Huang y Czech, 2007; Leney y Tavaré, 2009; Scheepers *et al.*, 2004; Thorens y Mueckler, 2010).

1.3.1 Secreción de la insulina

El estímulo químico primario para la secreción de insulina por las células β pancreáticas es la glucosa, y el modelo más generalizado para este fenómeno se basa en la actividad secuencial de tres elementos: la enzima glucocinasa, los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) y los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC). Tras ingresar a las células β pancreáticas a través de los transportadores GLUT2, la glucosa se fosforila mediante la catálisis de la enzima glucocinasa y se metaboliza vía glucólisis, lo cual genera cambios en la concentración citosólica de nucleótidos de adenina, en particular el incremento del trifosfato de adenosina (ATP) y la disminución del difosfato de adenosina (ADP). El cambio en la relación ATP/ADP lleva al bloqueo de los canales K_{ATP} , estructuras membranales formadas por la interacción de dos tipos de subunidades: un canal de corriente rectificadora de potasio (Kir6.1 o Kir6.2), y una subunidad regulatoria donde se encuentra el receptor sulfonilurea (SUR1 o SUR2). El bloqueo origina la despolarización de la membrana hasta el potencial umbral en que se abren los canales de Ca^{2+} , permitiendo así la entrada de este ion a las células β . El incremento en la concentración citosólica de calcio origina el movimiento de los gránulos que contienen insulina y de los fenómenos de fusión de éstos con la membrana celular, conduciendo a la liberación de la hormona hacia el torrente sanguíneo (Henquin, 2009; Henquin *et al.*, 2009). La secreción de insulina estimulada por glucosa es un proceso bifásico;

la primera fase corresponde a un incremento rápido pero transitorio de los niveles de insulina que se mantiene entre 4 y 8 minutos. Posteriormente, tras un periodo de meseta, surge la segunda fase, que si bien es menos intensa, es de mayor duración. En la regulación de esta fase participa el glucagón, una hormona secretada por las células α pancreáticas que induce la producción de glucosa hepática (Henquin, 2009; Polakof *et al.*, 2011).

Otros mecanismos participan en la secreción de insulina. Así, el aumento en la actividad vagal provoca un estado de hiperinsulinemia por la estimulación de receptores M2 de las células β pancreáticas; en contraparte, el agonismo β -adrenérgico conduce a hipoinsulinemia (Ahrén, 2000; Kahn *et al.*, 2006; Rodriguez-Diaz *et al.*, 2011). En la liberación de insulina también están involucradas las incretinas, un tipo de hormonas secretadas por las células K y L del intestino delgado en respuesta a la ingesta de glucosa y otros nutrientes. Las dos incretinas mejor descritas son el polipéptido inhibidor gástrico y el polipéptido 1 similar a glucagón (GIP y GLP-1, por sus siglas en inglés, respectivamente). Tanto GIP como GLP-1 incrementan la secreción de insulina dependiente de glucosa; GLP-1 también reduce el vaciamiento gástrico y la sensación de hambre mediante la activación de neuronas glucorreguladoras en el hipotálamo (Buhmann *et al.*, 2014; Yabe y Seino, 2011).

Este último efecto de las incretinas pone de manifiesto la existencia de vínculos entre el sistema nervioso central (SNC) y los órganos periféricos que controlan la homeostasis energética. El SNC integra la información proveniente de órganos periféricos, de modo que participa en la regulación de la producción de glucosa hepática y la captación de la misma (Lam *et al.*, 2009; Sandoval *et al.*, 2009). Uno de los neurotransmisores más estudiados por su implicación en la saciedad y el hambre es la serotonina. Ésta es una amina sintetizada tanto en el sistema nervioso central como en el entérico, y que posee múltiples funciones biológicas, entre ellas, el metabolismo de lípidos y de glucosa. Diversos reportes en la literatura proponen que la serotonina participa en la liberación de insulina estimulada por glucosa, ya sea mediante el agonismo de receptores membranales en las células β pancreáticas, o bien a través de un proceso intracelular denominado serotonilación. Existe evidencia adicional que relaciona las deficiencias en la producción de serotonina con la obesidad y la diabetes (Paulmann *et al.*, 2009; Pytliak *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2007).

1.3.1.1 Efectos metabólicos de la insulina

Una vez secretada, la insulina se distribuye por todo el organismo y alcanza sus órganos blanco. Los tejidos muscular y adiposo captan y metabolizan la glucosa como resultado de la activación de receptores y cascadas de señalización particulares, entre las que destaca la vía canónica PI3K/Akt. El receptor de insulina (RI) es un heterotetrámero con dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembranales que contienen dominios de tipo tirosina cinasa. La insulina estimula la autofosforilación del RI, hecho que induce la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1). Esta molécula fosforilada se une a la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K). El complejo resultante induce un aumento de otros factores dependientes de inositol trifosfato (IP_3) que participan en la activación de la enzima Akt. Esta cinasa es la responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina. A través de esta vía, la insulina regula la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno hepático y muscular; todo ello debido a la expresión membranal de los transportadores GLUT4 (Bedinger y Adams, 2015).

La insulina aumenta la captación de glucosa en músculo y grasa al inducir la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en las superficies celulares. Aproximadamente 90% de la captación de glucosa estimulada por insulina se da en el músculo esquelético. GLUT4 es un transportador con alta afinidad por la glucosa que en ausencia de insulina se encuentra internalizado en vesículas especializadas que son producidas en el aparato de Golgi. El proceso de movilización de GLUT4 hacia la superficie celular se da tras cinco minutos de exposición a la insulina. De igual manera, el ejercicio induce la translocación de estos receptores en músculo esquelético, pues la contracción muscular conduce a un incremento en las concentraciones de calcio intracelular y en la relación AMP/ATP, lo cual favorece la expresión de GLUT4. Estos fenómenos están asociados con la activación de varias isoformas de cinasas de calmodulina (CaMKII o CaMKK α/β), que a su vez, estimulan alguna de las vías de señalización de la proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato (AMPK); la AMPK es considerada el sensor energético por excelencia (Huang y Czech, 2007; Leto y Saltiel, 2012; Saltiel y Kahn, 2001).

1.3.2 AMPK: regulador de la homeostasis

La AMPK es una enzima heterotrimérica que contiene una subunidad catalítica ($\alpha 1$ o $\alpha 2$) y dos subunidades regulatorias ($\beta 1$ o $\beta 2$ y $\gamma 1$ o $\gamma 2$ o $\gamma 3$). Las isoformas de AMPK son activadas por dos señales distintas: el calcio a través de CaMKK β , y el AMP, mediante LKB1. Estas cinasas fosforilan el residuo Thr172 en la subunidad α de la AMPK, lo cual activa a la enzima. La forma activada de AMPK es responsable de la fosforilación de múltiples sustratos que intervienen en la homeostasis energética, como las enzimas glucógeno sintasa (síntesis de glucógeno), acetil-CoA carboxilasa (oxidación de ácidos grasos), o TBC1D1 (promotor de la translocación de GLUT4). En términos generales, AMPK disminuye las vías anabólicas (uso de ATP) e incrementa las vías catabólicas (producción de ATP). El mantenimiento de altas concentraciones de ATP es clave para el balance energético, por ello la activación farmacológica de AMPK representa una alternativa terapéutica para incrementar la sensibilidad a la insulina, reducir la síntesis de colesterol y la gluconeogénesis en pacientes diabéticos. Un ejemplo de esta aseveración es la metformina, el fármaco hipoglucemiante más recetado, puesto que uno de sus mecanismos de acción es la activación de AMPK (Jalving *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013).

1.4 Generalidades sobre diabetes mellitus

La diabetes no es una enfermedad de reciente aparición. Los primeros reportes en la literatura médica sobre este padecimiento se encuentran en el papiro de Ebers, un compendio que data del año 1550 a. C. Desde entonces, la comprensión de las causas y la búsqueda de tratamientos han sido constantes en el quehacer médico. La diabetes es una patología compleja, pero prácticamente todos los pacientes comparten en mayor o menor medida deficiencias en la secreción de insulina y resistencia de los tejidos a la acción de esta hormona; como consecuencia, se presenta hiperglucemia crónica. Los niveles elevados de glucosa conducen a la glucotoxicidad que genera la apoptosis de las células β ; por ende, disminuye la transcripción génica, y la síntesis y secreción de insulina (Bilous y Donnelly, 2010; O’Rahilly, 2009).

La clasificación más generalizada de la diabetes mellitus es por tipos. La tipo 1 (DMT1) es provocada por la destrucción autoinmune de la mayoría de las células β pancreáticas, lo cual ocasiona deficiencias casi absolutas de esta hormona; la tipo 2 (DMT2) resulta por la

secreción insuficiente y resistencia de los órganos periféricos a los efectos de la insulina. La DMT2 es la más frecuente (9 de cada 10 casos de diabetes); la prevalencia del tipo 2 aumenta rápidamente en todo el mundo, y ha dejado de ser considerada una afección de personas de edad avanzada. Si bien la mayoría de los pacientes con DMT2 son obesos o con sobrepeso, y esto conduce en gran medida a la resistencia a la insulina, también existen factores genéticos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, como se ha descrito recientemente para la población mexicana (Bilous y Donnelly, 2010; Kahn *et al.*, 2006; Pérez-Fuentes *et al.*, 2014). Quienes presentan obesidad, hiperglucemia, concentraciones bajas de colesterol HDL, hipertrigliceridemia, e hipertensión arterial padecen síndrome metabólico. De hecho la obesidad y tres más de los signos antes señalados son suficientes para diagnosticar el síndrome, el cual constituye una condición de riesgo para sufrir DMT2 y accidentes vasculares a mediano plazo (Aguilar-Salinas y Rojas-Martínez, 2012).

Según las recomendaciones de la OMS y los criterios definidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, el diagnóstico de diabetes se basa en los valores de glucemia en ayuno y postprandiales. Niveles altos de glucosa en ayuno y la presencia de intolerancia a la glucosa son considerados como estados metabólicos intermedios entre la homeostasis normal de glucosa y la diabetes. La primera condición está definida por niveles de glucosa en ayuno entre 110 y 126 mg/dl; la segunda corresponde a valores de glucemia entre 140 y 200 mg/dl luego de 2 h de la administración de una solución con 75 g de glucosa. Si una persona presenta valores de glucemia superiores en ayuno o tras la ingesta de glucosa, valores de hemoglobina glucosilada (HbA1c) superiores a 6.5%, y alguno de los síntomas de la enfermedad (poliuria, polidipsia o polifagia) es diagnosticada como diabética (OMS, 2015; SSA, 2010).

1.4.1 Complicaciones

La hiperglucemia crónica provoca entre muchas otras, complicaciones microvasculares, en particular en la retina, en el mesangio renal y en las células de Schwann en la glía nerviosa. Esto sucede porque las células y tejidos son incapaces de limitar el transporte de glucosa, por lo que se activan rutas metabólicas que generan productos que resultan nocivos. Una de estas vías es la de los polioles, en que la glucosa es reducida a sorbitol, el cual induce estrés osmótico y oxidativo. Como resultado del metabolismo, se da la activación de la proteína

cinasa C (PKC) y la síntesis de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Los AGEs se originan por la reacción de la glucosa con proteínas y con ácidos nucleicos. Estas especies pueden formar enlaces con el colágeno de la microvasculatura, provocando el engrosamiento de los vasos, la reducción de la permeabilidad y de la elasticidad. Además, los AGEs se unen a receptores específicos en monocitos, macrófagos y células endoteliales, produciendo especies reactivas de oxígeno y la liberación de mediadores inflamatorios. Dichos fenómenos conducen a isquemia y a la reducción del suministro de nutrientes en la microvasculatura, y por ende a daños en los órganos que irrigan, originando retinopatías, nefropatías y neuropatías, condiciones que al evolucionar incapacitan a quienes las padecen (Bilous y Donnelly, 2010).

1.4.1.1 Neuropatía diabética periférica

La neuropatía diabética periférica (NDP) es una de las complicaciones más comunes y heterogéneas de la diabetes; sin embargo, los mecanismos que la provocan no están del todo caracterizados, pero el daño en los vasos sanguíneos de las fibras C y la disfunción talámica contribuyen de manera significativa a su desarrollo. Las manifestaciones de la NDP son diversas. En algunos pacientes, la neuropatía se presenta como pérdida de sensibilidad en los dedos hallus de los pies, que se extiende luego en forma ascendente. Cuando la neuropatía se encuentra en estados avanzados, la insensibilidad se presenta también en las manos e incluso en la cabeza y la cara. Sin embargo, otros pacientes experimentan síntomas como cosquilleos, sensación de quemazón o de pinchazos en los pies, dolor al tacto (alodinia), o respuestas exacerbadas a estímulos nocivos (hiperalgesia). Hay quienes no presentan ningún síntoma, y la primera manifestación de la neuropatía es el descubrimiento de úlceras en los pies que no se perciben como dolorosas (Bilous y Donnelly, 2010).

Los pacientes con neuropatía diabética sufren dolor no localizado que es más severo por las noches y que ocasiona periodos de insomnio y por ende fatiga que interfiere con sus actividades cotidianas. El dolor neuropático es resultado de lesiones o cambios funcionales provocados por los AGEs en las neuronas encargadas de la transducción, transmisión, modulación y percepción de los estímulos nociceptivos. De esta manera, en el sistema nervioso periférico se genera la alodinia al tacto por cambios en las fibras A β , A δ y C; en la

médula espinal se integra la información que ocasiona las respuestas de alodinia al frío, y en el sistema nervioso central se generan señales dolorosas espontáneas (Obrosova, 2009).

Si bien el tratamiento del dolor neuropático comienza con el control de la hiperglucemia, la reducción de los niveles de glucosa *per se* no reduce las manifestaciones dolorosas. Las estrategias farmacológicas para el tratamiento son variadas y se basan en el tratamiento sintomático, pero son poco eficaces debido a sus efectos secundarios y altos costos; como primera línea se encuentran los antidepresivos tricíclicos (amitriptilina o imipramina), los inhibidores de la recaptura de serotonina-noradrenalina (duloxetina), y anticonvulsivantes (gabapentina, pregabalina, carbamazepina), y en segunda instancia los opioides (tramadol, tapentadol, oxicodona), antioxidantes (ácido α -lipoico), y tratamientos tópicos a base de capsaicina. También existen terapias alternativas como acupuntura, estimulación eléctrica transcutánea y de la médula espinal (Bilous y Donnelly, 2010; Obrosova, 2009; Tesfaye, 2015).

1.4.2 Tratamiento farmacológico de la DMT2

De forma ideal, la selección de la terapia para la diabetes mellitus debe ser integral y personalizada, planteando en primera instancia cambios en el estilo de vida del paciente y considerando los posibles efectos secundarios de la administración de medicamentos hipoglucemiantes. La estrategia farmacológica puede basarse en la administración de insulina, o bien, en la de un único agente o la combinación de medicamentos hipoglucemiantes orales pertenecientes a los siguientes grupos: biguanidas, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de las enzimas α -glucosidasas, miméticos de incretinas, e inhibidores de DPP-4 (Krentz y Bailey, 2005).

1.4.2.1 Biguanidas

Las biguanidas tienen su origen en el metabolito galegina aislado de *Galega officinalis*, una planta usada en la Edad Media para tratar la diabetes. En la década de los veinte del siglo pasado se sintetizaron los hipoglucemiantes metformina y fenformina, sin embargo su uso quedó relegado debido al incremento en las prescripciones de insulina. En 1960 las biguanidas hicieron su reaparición, aunque sólo la metformina permaneció en el mercado, ya

que la fenformina provocaba acidosis láctica. La metformina se consolidó desde ese entonces como el medicamento de primera línea para el tratamiento de la DMT2, pues reduce la producción hepática de glucosa y aumenta su captación en los tejidos muscular y adiposo, sin riesgos considerables de hipoglucemia o acidosis láctica. La literatura refiere varios mecanismos por los cuales la metformina ejerce su acción hipoglucemiante. A nivel mitocondrial, esta biguanida inhibe al complejo I de la cadena respiratoria, produciendo un incremento en las proporciones ADP/ATP y AMP/ATP, los cuales activan a la AMPK a través de la cinasa hepática LKB1. Los efectos metabólicos de esta activación son la inhibición de la gluconeogénesis, la translocación de los transportadores GLUT4 en músculo esquelético y tejido adiposo, y la reducción de la oxidación de ácidos grasos. También se ha propuesto un mecanismo independiente de AMPK que involucra a la adenilato ciclasa y a la proteína cinasa A, que actúan inhibiendo la gluconeogénesis (Foretz *et al.*, 2014; Hardie, 2013; Jalving *et al.*, 2010).

1.4.2.2 Sulfonilureas y meglitinidas

La primera generación de sulfonilureas comenzó a comercializarse en 1960; pertenecían a este grupo la tolbutamida, la acetoxamida, tolazamida y clorpropamida. Entre 1970 y 1990 se desarrolló la segunda generación que incluye a la glibenclamida (gliburida), glicazida, glipizida y glimepirida. El sitio de acción de las sulfonilureas se encuentra en el canal K_{ATP} de las células β pancreáticas y se denomina receptor sulfonilurea (SUR1). La interacción de estos fármacos con su receptor bloquea los canales K_{ATP} , induce la despolarización membranal y la entrada de calcio, fenómenos que favorecen la secreción bifásica de insulina. Las sulfonilureas pueden provocar hipoglucemia severa porque no requieren de concentraciones elevadas de glucosa para ser efectivas.

La repaglinida y la nateglinida son otros fármacos secretagogos; pertenecen a la categoría de meglitinidas, aprobadas hace casi 20 años. Al igual que las sulfonilureas bloquean los canales K_{ATP} , pero su sitio de unión es distinto al SUR1 y la duración de su efecto es menor. Además, el riesgo de hipoglucemia con estos productos es menor que con las sulfonilureas ya que requieren la presencia de la glucosa posprandial para inducir la secreción de insulina (Israili, 2011).

1.4.3.3 Tiazolidinedionas (Glitazonas)

Las tiazolidinedionas pioglitazona y rosiglitazona fueron aprobadas en 1999 como alternativas terapéuticas para pacientes diabéticos con resistencia a la insulina. El blanco farmacológico de las glitazonas son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Los PPAR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que forman heterodímeros con el receptor retinoide X, por lo que su activación conduce a la transcripción de genes involucrados en la síntesis y translocación de GLUT4, en la adipogénesis y en el metabolismo de lípidos. La isoforma PPAR γ tiene predominio en el tejido adiposo, las células β pancreáticas, el endotelio y los macrófagos; en pacientes diabéticos y obesos se encuentra también expresada en músculo esquelético. El receptor PPAR α se distribuye en hígado, corazón, músculo esquelético y vasos sanguíneos. La rosiglitazona es un agonista PPAR γ puro, mientras que la pioglitazona posee actividad sobre ambas isoformas. Puesto que las glitazonas mejoran también el perfil lipídico, fueron consideradas como candidatas idóneas para tratar la diabetes y las dislipidemias. Sin embargo, desde 2010 su uso se ha visto limitado, pues en ese año, la Unión Europea retiró de la venta a la rosiglitazona en respuesta a reportes que la asociaban con el desarrollo de isquemia coronaria y con el incremento de accidentes cardiovasculares. A finales de 2015, las autoridades sanitarias de Estados Unidos eliminaron las restricciones de prescripción de esta glitazona, y en nuestro país este fármaco se encuentra en los listados de farmacovigilancia (COFEPRIS, 2010; El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Lorenzati *et al.*, 2010; Nature Newsblog, 2013).

1.4.3.4 Inhibidores de las enzimas α -glucosidasas

En los años 1990, la acarbosa fue el primer fármaco inhibidor de las enzimas α -glucosidasas intestinales en venta, y los miembros más recientes de este tipo de agentes son la voglibosa y el miglitol. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las enzimas α -glucosidasas presentes en las microvellosidades de los enterocitos del intestino delgado, reduciendo así la conversión de carbohidratos complejos a monosacáridos y la hiperglucemia posprandial. En consecuencia, este tipo de medicamentos reduce la secreción de insulina y de incretinas, en particular de GIP. Además, como la absorción de carbohidratos se da en partes más distales del intestino producen diarrea, efecto secundario que ha limitado su uso (Israili, 2011).

1.4.3.5 *Miméticos de incretinas e inhibidores de la enzima dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4)*

La exenatida, un análogo semisintético proveniente del péptido exedin-4, aislado de la saliva del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*), fue comercializada en 2005 como el primer mimético de incretinas. La exenatida resiste más tiempo que la incretina GLP-1 la inactivación enzimática de la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4), enzima que degrada a las incretinas endógenas. Al unirse con el receptor de GLP-1, la exenatida aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa, suprime la secreción de glucagón, retrasa el vaciado gástrico, reduce la sensación de hambre, y contribuye a la normalización del funcionamiento de las células β pancreáticas. Los inconvenientes en el uso de la exenatida son los siguientes: su elevado precio, provoca náuseas, vómito y diarrea, y en casos aislados, puede producir pancreatitis (Lorenzati *et al.*, 2010). Otra estrategia farmacológica relacionada con las incretinas ha sido la administración de fármacos inhibidores de la DPP-4, los cuales incrementan las concentraciones de GLP-1 y de GIP. La sitagliptina, vidagliptina y saxagliptina son inhibidores de la DPP-4 que se emplean solos o en combinación con metformina, una sulfonilurea o una glitazona. Entre los principales efectos secundarios de este tipo de medicamentos están la migraña, las infecciones urinarias y faríngeas, así como dolor de espalda y de extremidades (El-Kaissi y Sherbeeni, 2011; Israili, 2011).

1.5 **De la polifarmacia a la polifarmacología: el papel de las plantas medicinales en el tratamiento de la DMT2**

En todo el mundo se usan plantas medicinales para tratar la diabetes mellitus tipo 2, ya sea como primera alternativa o como complemento a la medicación convencional. La actitud respecto a su inclusión en la terapia enfrenta un cambio de paradigma, ya que un sector de la comunidad médica considera que sólo las personas de bajo estrato socioeconómico y/o educativo recurren a las plantas medicinales; en cambio, en países como Alemania o Estados Unidos, son los profesionales de la salud quienes prescriben algún preparado a base de plantas medicinales para complementar el tratamiento de la diabetes.

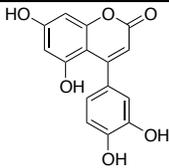
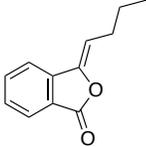
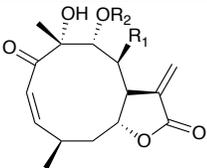
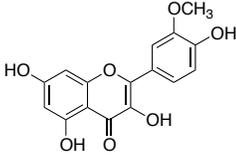
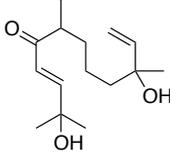
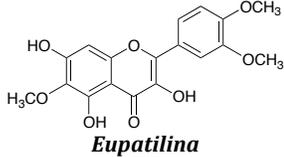
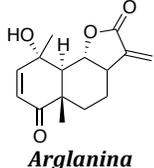
Entre las razones para utilizar terapias a base de plantas para tratar la DMT2 se encuentran la falta de acceso a la medicación convencional, la pertenencia a un determinado sistema de creencias, o bien la preferencia por “lo natural” como sinónimo de seguro, pues

quienes padecen la enfermedad buscan reducir los efectos secundarios de los medicamentos que consumen (Argáez-López *et al.*, 2003).

Diversos reportes etnobotánicos sugieren que en México son pocos los pacientes diabéticos que no consumen plantas medicinales, puesto que tras ser diagnosticados, la mayoría recurre a los curanderos o a los vendedores de herbolaria por algún “remedio” (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Las revisiones más recientes sobre plantas medicinales revelan que en nuestro país se emplean por lo menos 383 especies para tratar la diabetes, siendo el nopal (*Opuntia* sp, Cactaceae), la prodigiosa (*Brickellia cavanillesi*, Asteraceae) y la tronadora (*Tecoma stans*, Bignoniaceae) las de mayor uso entre la población (Mata *et al.*, 2013; Romero-Cerecero *et al.*, 2009). Existen investigaciones sobre la eficacia hipoglucemiante preclínica de extractos y/o compuestos puros de un centenar de estas plantas, así como de los mecanismos de acción de algunas especies. A este último respecto, nuestro grupo de trabajo ha establecido el efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas, la participación de los canales K_{ATP} , y la activación de la AMPK, como posibles mecanismos de acción de varios metabolitos hipoglucemiantes aislados de especies medicinales selectas (**Cuadro 2**) (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014; Guerrero-Analco, 2007; Mata *et al.*, 2013).

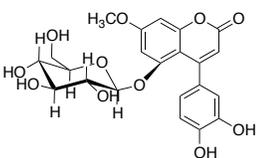
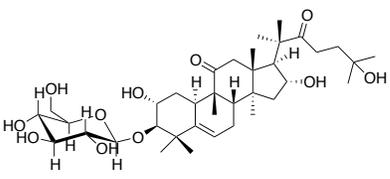
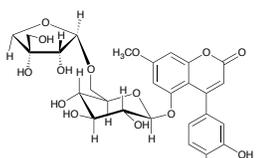
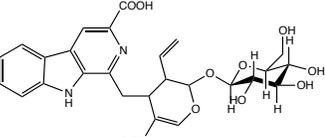
Es de suma importancia recalcar dos características de los preparados a base de plantas medicinales: la polivalencia y la sinergia. Por lo general, los metabolitos secundarios no poseen un único mecanismo de acción, sino que interactúan con más de un blanco molecular (Mammen *et al.*, 1998). Así, los compuestos aislados de plantas medicinales actúan de modo polifarmacológico porque pueden tanto bloquear canales K_{ATP} en las células β pancreáticas, como favorecer la translocación de transportadores GLUT4, y captar radicales libres. Se ha demostrado que el efecto terapéutico de extractos íntegros suele ser superior a dosis equivalentes de compuestos puros, ya que el efecto observado resulta de la sinergia entre los componentes de las plantas, es decir, de las acciones farmacológicas conjuntas de los compuestos individuales (Prabhakar *et al.*, 2014). Estas propiedades resultan ideales para el tratamiento de enfermedades metabólicas porque representan una alternativa para el desarrollo de medicamentos a base de plantas que sean capaces de contrarrestar la hiperglucemia, las dislipidemias e incluso, la hipertensión arterial, empleando un único preparado (Williamson, 2001).

Cuadro 2. Posible mecanismo de acción de metabolitos hipoglucemiantes selectos.

Metabolito	Especie (Familia)	Posible mecanismo de acción
 <p>4-Fenilcumarina</p>	<i>Hintonia latiflora</i> (Rubiaceae)	
 <p>Z-3-butildenftálida</p>	<i>Ligusticum porteri</i> (Apiaceae)	
 <p>Caleína C</p>	<i>Brickellia cavanillesii</i> (Asteraceae)	Inhibición de enzimas α -glucosidasas intestinales
 <p>Isorhamnetina</p>		
 <p>Salvinina</p>	<i>Artemisia ludoviciana</i> (Asteraceae)	
 <p>Eupatilina</p>		
 <p>Arglanina</p>	<i>Artemisia ludoviciana</i> (Asteraceae)	Bloqueo de canales K_{ATP}

Referencias: Anaya Eugenio *et al.*, 2014; Mata *et al.*, 2013.

Cuadro 2 (Continuación). Posible mecanismo de acción de metabolitos hipoglucemiantes selectos.

Metabolito	Especie (Familia)	Posible mecanismo de acción
 <p>Glucósido de 4-fenilcumarina</p>	<p><i>Hintonia latiflora</i> (Rubiaceae)</p>	<p>Activación de la AMPK</p>
 <p>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F</p>		
 <p>5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina</p>		
 <p>Ácido desoxicordifolínico</p>		

Referencias: Guerrero-Analco, 2007

1.5.1 Sinergia: Plantas medicinales y tratamiento alopático

Las combinaciones de plantas medicinales y medicamentos hipoglucemiantes se han hecho de forma empírica, partiendo de la experiencia en el uso de las primeras y de la eficacia comprobada de los segundos, en espera que el resultado final sea benéfico. Existen pocos reportes del efecto *in vitro* entre metabolitos de plantas medicinales y fármacos hipoglucemiantes; el **Cuadro 3** presenta algunos de estos ejemplos.

Cuadro 3. Resultado de la combinación entre metabolitos secundarios y fármacos hipoglucemiantes

Metabolitos	Fármaco hipoglucemiante	Efectos
Arecolina Ácido cafeico Ácido clorogénico Ácido cumárico Berberina Eugenol	<i>Metformina</i> <i>Tiazolidinediona</i>	Incremento de la captación de glucosa <i>in vitro</i> por miotubos L6
Ácido ferúlico	<i>Metformina</i> <i>Tiazolidinediona</i>	Incremento de la captación de glucosa <i>in vitro</i> por miotubos L6 y adipocitos 3T3-L1 Regeneración de células β pancreáticas

Referencias: Prabhakar y Doble, 2009; Prabhakar y Doble, 2011; Prabhakar *et al.*, 2014

El resultado de tales asociaciones (adición, atenuación o sinergia) entre los metabolitos de las plantas y los fármacos hipoglucemiantes, puede describirse con los modelos cuantitativos de la relación dosis–respuesta empleados en la terapia alopática, entre los que destacan el análisis isoblográfico y el índice de combinación (Tallarida, 2000; Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

El método isoblográfico se vale de la construcción de una gráfica con pares de dosis o concentraciones de las sustancias que producen un nivel determinado de efecto cuando se administran de forma individual (dosis o concentraciones equiefectivas). Con la construcción de esta gráfica o isoblograma, se puede establecer de forma rigurosa el tipo de interacción entre dos sustancias activas, definiendo si existe adición, atenuación o sinergismo entre ellas. En el eje de las abscisas se grafican las dosis/concentraciones del compuesto menos activo y en el de las ordenadas las del más activo. Los interceptos corresponden a las dosis/concentraciones equiefectivas seleccionadas, y la línea que los une es denominada línea de aditividad. Cada uno de los puntos de ésta representa el par de dosis/concentraciones teóricas a combinar para obtener el mismo nivel de efecto. Si se requieren dosis/concentraciones experimentales menores que las teóricas para alcanzar un efecto dado, entonces existe un efecto sinérgico entre los compuestos; por otra parte, si las dosis/concentraciones experimentales requeridas son mayores a las teóricas, existe un efecto sub-aditivo (Navarrete *et al.*, 2003; Tallarida, 2000).

Otro método para explicar la interacción de dos compuestos se basa en el cálculo de una constante denominada índice de combinación (CI), que resulta de la relación $CI = [(C_a/IC_a) \times (C_b/IC_b)]$, donde C_a y C_b son las concentraciones de los compuestos A y B que se usan en combinación para alcanzar un efecto determinado, IC_a e IC_b son las concentraciones de A y B que se requieren individualmente para alcanzar el mismo efecto. Los efectos sinérgicos, aditivos o sub-aditivos de las combinaciones se determinan cuando los valores de CI son mayores, iguales o menores a 1, respectivamente (Zhao *et al.*, 2004).

Tras el establecimiento de relaciones sinérgicas entre plantas medicinales y fármacos alopáticos, los mecanismos subyacentes pueden describirse en términos de polifarmacología y modificaciones de parámetros farmacocinéticos, así como por la reducción de los efectos secundarios asociada a la disminución de las dosis empleadas (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

1.6 Modelos para la evaluación de la actividad hipoglucemiante y antihiperalgésica de plantas medicinales

La investigación farmacológica de nuevas sustancias activas se basa en bioensayos que modelan en diversos grados las enfermedades humanas. Las unidades de experimentación pueden ser animales íntegros, órganos o tejidos aislados, la sangre y sus componentes, cultivos celulares o tisulares, o estructuras celulares particulares. En general, la elección del bioensayo a utilizar depende de los recursos disponibles. Sin embargo, para obtener un panorama integral, resultaría idóneo obtener datos de experimentos *in vivo* e *in vitro*, evaluando los preparados o compuestos en dosis y/o concentraciones seleccionadas en escalas numéricas determinadas, incluyendo controles negativos y positivos adecuados (Lukačínová *et al.*, 2013; Verspohl, 2002; Wojcikowski y Gobe, 2014).

1.6.1 Modelos *in vivo*

Una gran cantidad de pruebas farmacológicas emplea animales que manifiestan comportamientos estereotipados y cuantificables, o que poseen alteraciones en ciertos parámetros bioquímicos comparables a los de las patologías humanas. Los modelos animales pueden clasificarse como: *a)* espontáneos, *b)* de inducción química o quirúrgica, y *c)*

genéticamente modificados. Los roedores son las unidades de experimentación preferidas en la investigación, pues presentan ventajas de tamaño, disponibilidad, y costos, además que existen múltiples reportes sobre técnicas estandarizadas que los involucran (Srinivasan y Ramarao, 2007). Es de suma importancia que quienes trabajan con modelos animales favorezcan la aplicación de las “3Rs” propuestas por Rusell y Burch: reemplazo (sustituir los animales por modelos alternativos), reducción (disminuir el número de animales por experimento), y refinamiento (proveer el mejor cuidado a los animales) (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009).

1.6.1.1 Inducción química de hiperglucemia

La mayoría de las evaluaciones del potencial hipoglucemiante *in vivo* de productos naturales emplean modelos por inducción química; la estreptozotocina y el aloxan son los agentes diabetogénicos más utilizados. Hay múltiples protocolos en roedores que difieren en las vías de administración y dosis de tales compuestos; nuestro grupo de investigación emplea un modelo de hiperglucemia en ratón inducida por nicotinamida y estreptozotocina (NA-STZ). La STZ accede a las células β pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT2. A nivel nuclear, la STZ provoca la alquilación del ADN; este daño conduce a la activación de la poli (ADP-ribosa) sintetasa, enzima encargada de la reparación del ADN. Este fenómeno conlleva la depleción del NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), lo cual induce la necrosis de las células β pancreáticas, y por ende la reducción en la síntesis de insulina. La nicotinamida suministrada en este modelo atenúa la citotoxicidad porque contribuye a la reserva de NAD; los animales tratados con esta combinación de fármacos desarrollan hiperglucemia crónica e intolerancia a la glucosa, dos características distintivas de la DMT2 (Masiello *et al.*, 1998; Szkudelski, 2001; Tahara *et al.*, 2008).

La glucemia es el parámetro más sencillo de cuantificar en los modelos de inducción química de hiperglucemia, y para las mediciones se emplean con frecuencia glucómetros comerciales que ofrecen un grado confiable de precisión. Si bien la determinación de cambios en los niveles sanguíneos de glucosa constituye el punto de partida para la búsqueda de agentes hipoglucemiantes, resulta conveniente medir otros parámetros bioquímicos, como insulina, colesterol y triglicéridos, así como proponer modelos alternativos para establecer los mecanismos de acción hipoglucemiantes (Fröde y Medeiros, 2008; Verspohl, 2002).

1.6.1.2 Síndrome metabólico inducido por fructosa

Además de poseer propiedades hipoglucemiantes, los metabolitos de plantas medicinales podrían reducir otros parámetros bioquímicos asociados a la DMT2, como los niveles de colesterol, triglicéridos, o la resistencia a la insulina. Algunos modelos animales de síndrome metabólico (SM) se caracterizan por el desarrollo simultáneo de obesidad, hipertensión arterial, dislipidemias, insulinoresistencia e hiperglucemia, por lo que pueden emplearse para una evaluación más completa de las plantas medicinales. Los modelos de SM más populares reportados en la literatura consisten de animales genéticamente modificados y/o que reciben dietas de formulación específica, sin embargo, sus costos de adquisición y mantenimiento los vuelven inaccesibles para la mayoría de los investigadores de los países en vías de desarrollo. Afortunadamente, la inducción de SM en animales sin modificaciones genéticas puede lograrse mediante la administración diaria de carbohidratos, en particular, de fructosa. Las especies preferidas para este tipo de inducción son ratas de las cepas Wistar y Sprague-Dawley (individuos jóvenes y adultos), y la cantidad de fructosa suministrada varía dependiendo de la forma de consumo. Algunos ejemplos son la administración diaria de cargas de 8 g/kg *p.o.*, la dieta basada en pellets de composición 60% *p/p* de fructosa, y soluciones de concentración 10-15% *p/v* como agua de consumo *ad libitum*, con periodos de inducción de hasta 16 semanas. A pesar del tiempo de desarrollo, los modelos de síndrome metabólico inducido por fructosa son una alternativa viable para la evaluación de plantas medicinales que se usan en el tratamiento de la DMT2 (Ferreira de Moura *et al.*, 2009; Wilson y Islam, 2012).

1.6.1.3 Modelos animales de hiperalgesia

El uso de animales en la investigación del dolor permite comprender los mecanismos de la nocicepción y de las sustancias con potencial antinociceptivo en condiciones controladas, modificando diversos parámetros que no serían posibles o justificables en humanos (Chapman *et al.*, 1985). Los modelos de nocicepción deben ser supervisados y aprobados por comités que garanticen el bienestar animal, la reducción del número de unidades biológicas por experimento, y que favorezcan los experimentos de corta duración. Los modelos de nocicepción analizan comportamientos estereotipados de los animales de experimentación cuando son sometidos a un estímulo nociceptivo determinado (eléctrico, térmico, mecánico o

químico), por lo que los efectos provocados por estos agentes deben describirse de forma puntual (Le Bars *et al.*, 2001). La búsqueda de agentes para condiciones como la neuropatía diabética implica la adaptación de los modelos de nocicepción convencionales al uso de animales que presenten hiperglucemia. La hiperalgesia y la reducción de ésta pueden evaluarse a nivel térmico, mecánico o químico, empleando pruebas como la de placa caliente, la de inmersión de cola, la de retirada de pata o el modelo de formalina (Bektas *et al.*, 2014).

Los animales con hiperglucemia crónica presentan procesos de sensibilización relacionados con el incremento de la producción de prostaglandina E2, lo cual conduce al desarrollo de hiperalgesia. La prueba de la formalina en este tipo de animales constituye entonces un modelo adecuado para establecer el potencial antihiperalgésico de las plantas medicinales y de sus metabolitos porque permite analizar efectos centrales y periféricos de las sustancias evaluadas (Calcutt *et al.*, 1996; Freshwater *et al.*, 2002; Hao y Ogawa, 1998).

1.6.2 Modelos *in vitro* basados en células

Los modelos en cultivos celulares son herramientas complementarias a los experimentos *in vivo* que permiten determinar los posibles mecanismos de acción de sustancias hipoglucemiantes o antinociceptivas, y que contribuyen a la reducción en el uso de animales de experimentación. Además, en este tipo de modelos se pueden obtener proteínas para analizarlas en búsqueda de marcadores específicos de vías de señalización de interés.

En la evaluación antidiabética de plantas medicinales y sus metabolitos se prefiere el uso de cuatro tipos de células (humanas o murinas): β pancreáticas secretoras de insulina (RIN, HIT, β -TC, MIN6, e INS-1), hepáticas (HIIE4 y HepG2), musculares (C2C12 y L6), y adiposas (3T3-L1). Por otra parte, existen modelos nociceptivos vanguardistas basados en células neuronales humanas y murinas que expresan nociceptores particulares, como los TRPV1, además de la evaluación de la activación de la enzima ciclooxigenasa 1 y la producción de prostaglandinas (Fröde y Medeiros, 2008; Hajializadeh *et al.*, 2014).

1.6.3 Modelos *in silico*

Los estudios *in silico* se valen de herramientas computacionales que integran los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* para construir modelos teóricos útiles en el descubrimiento y optimización de moléculas activas, así como para la predicción de las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas de las mismas. Este tipo de métodos también se usa para el modelado de la unión de ligandos a receptores proteínicos a través de estudios de acoplamiento molecular, pues existen reportes en la literatura de un gran número de proteínas de relevancia terapéutica cristalizadas, en particular de enzimas, receptores nucleares y algunos receptores acoplados a proteínas G. Cuando no se cuenta con la estructura tridimensional del receptor de interés, se aplican técnicas de modelado por homología, algoritmos matemáticos que emplean el conocimiento previo sobre la naturaleza de la conservación de las secuencias de aminoácidos y de las conformaciones que adoptan. En todos los casos, los modelos *in silico* son sujetos a procesos de validación, de manera que los estudios teóricos reportados puedan contribuir a la racionalización de las observaciones hechas en modelos farmacológicos experimentales (Ekins *et al.*, 2007a, 2007b; Hillisch *et al.*, 2004).

II. Hipótesis

Los reportes etnobotánicos de la especie *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae) como agente antidiabético y *depurativo de la sangre*, así como los estudios fitoquímicos y farmacológicos de otras especies del género, sugieren la presencia en la planta de compuestos hipoglucemiantes e hipolipemiantes.

III. Objetivos

Objetivo general: Establecer la eficacia preclínica de *S. humilis* como agente hipoglucemiante mediante estudios farmacológicos adecuados, con la finalidad de contribuir al uso racional de la especie y de descubrir principios activos útiles para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la diabetes y de sus complicaciones.

Los objetivos particulares de esta investigación fueron:

1. Generar los perfiles cromatográficos de la especie mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) con el objeto de contribuir a los parámetros de composición de la especie.
2. Establecer de manera preliminar la inocuidad de la especie mediante la evaluación de la toxicidad aguda de la droga cruda y del extracto acuoso de la planta empleando la metodología de Lorke en roedores.
3. Determinar el potencial antidiabético del extracto acuoso de la especie tanto en ratones normoglucémicos como en hiperglucémicos, así como los niveles séricos de triglicéridos, ácido úrico, colesterol, e insulina, y de la cantidad de glucógeno hepático en ratas con síndrome metabólico, con el propósito de relacionar la modificación de dichos parámetros con el uso popular de la planta como *depurativo de la sangre*.
4. Aislar y caracterizar los principios activos de *S. humilis* a través de la aplicación de procedimientos fitoquímicos convencionales, estableciendo sus posibles mecanismos de acción en modelos *in vivo* o *in vitro* selectos.
5. Determinar el efecto antihiperalgésico de la especie y los posibles mecanismos de acción subyacentes en ratones hiperglucémicos, a fin de describir el potencial de la especie para atenuar la neuropatía diabética, una de las complicaciones de la diabetes mellitus.

IV. Parte experimental

4.1 Material vegetal y preparación de extractos

Las semillas de *Swietenia humilis* Zucc. se recolectaron en Santa Úrsula, Temixco, Morelos, México (18° 53'29.87 N, 99°16'43.24 W, 1519 mnsn) en abril de 2012. Una muestra de referencia se encuentra en el Herbario Nacional (MEXU 1355304). El material vegetal se fragmentó (2 mm) en un molino de cuchillas Thomas Wiley Model 4 (Thomas Scientific, E.U.A.). Para el estudio fitoquímico se preparó un extracto orgánico mediante maceración. En primera instancia, un kilogramo de semillas molidas fue desgrasado 4 veces con 7 litros de *n*-hexano. Posteriormente, el material desgrasado se sometió a maceración exhaustiva a temperatura ambiente con una mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1; 11 litros) durante diez días. Al cabo de ese tiempo, el extracto orgánico resultante se filtró por gravedad y se concentró a presión reducida. Se generaron 112 g de un residuo amarillo. Para las pruebas biológicas se preparó un extracto acuoso mediante la decocción de 15 g de semillas con 300 ml de agua destilada durante una hora. El extracto acuoso se filtró para descartar el material vegetal y se concentró a sequedad en un rotaevaporador adaptado a una bomba de vacío. Se obtuvieron 0.75 g de un extracto color café rojizo. Este proceso se repitió varias veces hasta obtener 10 g de extracto acuoso seco. De manera adicional se generó un preparado que consistió en la droga cruda molida suspendida en solución salina isotónica, y un extracto hexánico (1.0 g) preparado mediante la maceración (24 horas) de 50 g del material vegetal con 300 ml de hexano en refrigeración (4 °C); este último extracto se obtuvo al descartar el disolvente mediante presión reducida.

4.2 Análisis cromatográficos

El análisis de fracciones de *S. humilis* mediante cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck® (malla de 3.5 – 7.0 ASTM) de diferentes dimensiones, utilizando diversos sistemas de elución. Como agente cromógeno se empleó solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico. Para el aislamiento de compuestos se usó cromatografía en columna abierta (CCA) sobre gel de sílice 60 Merck® (70 – 230 mesh) con sistemas de elución de polaridad creciente; se usaron mezclas de *n*-hexano, AcOEt, CH₂Cl₂ y CH₃OH.

El establecimiento de perfiles cromatográficos y la purificación de compuestos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa (CLAE), empleando un cromatógrafo Waters® equipado con un detector de UV 996 con arreglo de fotodiodos y una bomba cuaternaria. El control del equipo, la adquisición y procesamiento de los datos se realizó con el software Empower v. 2.0 (Millipore Corp., E.U.A.). Los perfiles cromatográficos de fracciones se generaron empleando la columna Symmetry® C-18 (250 mm × 4.6 mm *d.i.*, 5 µm; Waters), con un modo de elución de tipo gradiente (fase móvil CH₃CN:H₂O 65:35 a 70:30 en 15 min, o CH₃CN:H₂O 80:20 a 75:25 en 10 min) y velocidad de flujo 1.0 ml min⁻¹. Los compuestos se purificaron mediante cromatografía semi-preparativa empleando una columna Symmetry Prep™ C-18 (300 mm × 7.8 mm, *d.i.* 7 µm; Waters), elución gradiente (fase móvil CH₃CN:H₂O, 65:35 a 70:30 en 15 min, o 80:20 a 75:25 en 10 min), con una velocidad de flujo de 3.45 ml min⁻¹. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 205, 254 y 280 nm. Todas las muestras se disolvieron en mezclas de CH₃CN:H₂O (6:4), y se filtraron a través de una membrana Acrodisc® de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de espesor antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

4.3 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos aislados

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y se presentan sin corrección. El registro de los espectros fue realizado por personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un equipo Perkin-Elmer 1605 (4000 a 400 cm⁻¹). Los experimentos de resonancia magnética nuclear (¹H, ¹³C, HMBC, HSQC, COSY y NOESY) se registraron en CDCl₃ en un espectrómetro Varian Unity Plus 400 a 400 MHz (¹H) y 100 MHz (¹³C); se empleó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de masa se obtuvieron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas usando un cromatógrafo Agilent 6890N, un espectrómetro de masas con un detector de tiempo de vuelo LECO y una energía de ionización de 70 eV. En el Instituto de Química se realizaron los análisis de rotación óptica en un polarímetro Jasco P-1030 a 25 °C, a la longitud de onda de la línea D-sodio (589 nm) en CH₃OH, y los análisis de difracción de rayos X en un difractorómetro Bruker Smart Apex CCD.

4.4 Aislamiento, purificación y elucidación estructural

El extracto orgánico de *S. humilis* (100 g) fue fraccionado por cromatografía en columna (2.0 kg de gel de sílice), empleando para su elución mezclas de polaridad creciente de hexano y CH₂Cl₂ (80:20→20:80). Se generaron 10 fracciones primarias (F_I–F_X). La fracción F_{VII} (22 g) fue sometida a un fraccionamiento secundario (850 g de sílice) usando hexano–AcOEt (100:0→0:100) y AcOEt–CH₃OH (100:0→80:20); se obtuvieron 10 fracciones secundarias (F_{VII-1}–F_{VII-10}). De la fracción F_{VII-5} cristalizaron 1.2 g del acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**) (Mulholland y Taylor, 1988).

Acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (12): sólido cristalino, p.f. 248–250°C; IR (FTIR) ν_{\max} : 3459, 2973, 1720, 1227 cm⁻¹; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 215.0, 174.0, 171.0, 169.4, 143.0, 142.0, 136.6, 129.3, 120.8, 109.9, 85.0, 77.3, 77.1, 56.5, 52.4, 49.6, 45.1, 41.8, 39.2, 36.9, 34.4, 32.9, 30.2, 22.2, 22.1, 20.6, 20.4, 19.8, 15.9 (todos s); ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.81 (*m*, 1H), 7.42 (*t*, 1.71; 1H), 6.47 (*d*, 1.47; 1H), 5.70 (*s*, 1H), 5.39 (*t*, 2.10; 1H), 4.88 (*s*, 1H), 4.07 (*s*, -OH), 3.73 (*s*, 3H), 3.29 (*dd*, 8.20, 3.50; 1H), 2.90 (*m*, 2H), 2.37 (*m*, 2H), 2.26 (*dd*, 5.10, 2.40; 1H), 2.13 (*s*, 3H), 1.69 (*dd*, 6.10, 2.60; 2H), 1.65 (*dd*, 5.30, 3.00; 1H), 1.42 (*m*, 1H), 1.24 (*s*, 3H), 1.10 (*s*, 3H), 0.81 (*s*, 3H), 0.77 (*s*, 3H); EM-IE (C₂₉H₃₆O₉) *m/z* (int. rel.): 528 (1, [M]⁺), 77 (20), 95 (100).

La resolución de la fracción F_{VII-4} (6 g) mediante CCA (320 g de gel de sílice), usando como fase móvil mezclas binarias de hexano–AcOEt (100:0→0:100) generó siete fracciones terciarias (F_{VII-4a}–F_{VII-4g}). La fracción F_{VII-4d} (3.6 g) se lavó exhaustivamente con una mezcla fría de hexano–AcOEt (99.5:0.5); de este tratamiento precipitaron 2.8 g de un polvo blanco. Un gramo de este polvo fue purificado empleando CLAE semi-preparativa (fase móvil CH₃CN:H₂O 65:35 a 70:30 en 15 min; velocidad de flujo 3.45 ml min⁻¹). Se obtuvieron los compuestos humilina B (**1**, 60 mg), metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**2**, 180 mg), y metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**, 500 mg) (Segura-Correa *et al.*, 1993).

Humilina B (1): polvo blanco; IR (FTIR) ν_{\max} : 3454, 2955, 1726, 1223, 1026, 763 cm⁻¹; ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 213.3, 174.2, 171.8, 169.7, 143.5, 141.5, 120.3, 110.3, 84.9, 78.9, 78.8, 67.9, 63.0, 55.3, 52.6, 49.1, 45.7, 42.5, 39.9, 32.4, 32.3, 31.9, 26.6, 26.2, 22.0, 20.9, 20.4, 20.2, 19.6, 15.9; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.53 (*m*, 1H), 7.43 (*t*, 1.72; 1H), 6.46 (*dd*, 1.02, 1.07; 1H), 5.25 (*s*, 1H), 5.10 (*s*, 1H), 3.73 (*s*, 3H), 3.53 (*s*, 1H), 3.48 (*dd*, 16.69, 3.46; 1H), 3.14 (*dd*, 8.45, 3.02; 1H), 2.83 (*dd*, 16.26, 4.98; 1H), 2.33

(*dd*, 5.81, 4.57; 2H), 2.28 (*s*, 6H; señal traslapada), 1.91 (*dd*, 3.23, 1.47; 1H), 1.79 (*m*, 1H), 1.66 (*m*, 1H), 1.16 (*s*, 3H), 1.02 (*s*, 3H), 0.78 (*s*, 3H), 0.76 (*s*, 3H); EM-IE (C₂₉H₃₆O₁₀) *m/z* (int. rel.): 484 (1), 121 (40), 95 (100).

Metil-2-hidroxi-3-β-isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (2): polvo blanco; IR (FTIR) ν_{\max} : 3453, 2974, 2949, 1721, 1649, 1436, 1256, 1132, 756 cm⁻¹; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_c (ppm): 215.0, 176.6, 173.8, 169.1, 142.9, 141.9, 136.6, 128.9, 120.5, 109.7, 84.5, 76.9, 56.6, 53.5, 52.2, 49.4, 44.9, 41.4, 39.4, 36.8, 34.4, 33.9, 32.7, 29.8, 21.9, 21.8, 21.7, 20.4, 19.8, 19.1, 15.7; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.81 (*d*, 1.70; 1H), 7.43 (*t*, 1.80; 1H), 6.47 (*d*, 2.30; 1H), 5.68 (*s*, 1H), 5.39 (*dd*, 4.80, 2.50; 1H), 4.89 (*s*, 1H), 3.72 (*s*, 3H), 3.33 (*m*, 1H), 2.89 (*m*, 2H), 2.68 (*m*, 1H), 2.37 (*dd*, 6.10, 4.01; 2H), 2.27 (*dd*, 6.40, 2.00; 1H), 2.24 (*dd*, 5.10, 2.01; 1H), 1.76 (*m*, 1H), 1.69 (*m*, 1H), 1.65 (*dd*, 6.80, 3.71; 1H), 1.45 (*d*, 3.50; 1.20 (*s*, 3H), 1H), 1.42 (*d*, 4.10; 1H), 1.24 (*s*, 3H), 1.19 (*s*, 3H), 1.11 (*s*, 3H), 0.82 (*d*, 2.3; 3H), 0.77 (*d*, 3.7; 3H); EM-IE (C₃₁H₄₀O₉) *m/z* (int. rel.): 226 (20), 71 (82), 57 (100).

Metil-2-hidroxi-3-β-tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (3): polvo blanco; IR (FTIR) ν_{\max} : 3452, 2974, 2949, 1721, 1649, 1436, 1256, 1132, 756 cm⁻¹; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_c (ppm): 215.0, 174, 169, 167.5, 143.2, 142.0, 140.1, 137.0, 129.2, 120.8, 109.8, 85.0, 77.4, 76.7, 56.8, 52.4, 49.5, 45.1, 41.5, 39.6, 37.1, 34.5, 32.8, 29.7, 22.2, 21.8, 20.7, 19.9, 15.9, 14.8, 12.1; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.83 (*d*, 2.09; 1H), 7.42 (*t*, 1.71; 1H), 6.95 (*m*, 1H), 5.63 (*s*, 1H), 5.35 (*t*, 2.09; 1H), 4.91 (*s*, 1H), 3.72 (*s*, 3H), 3.39 (*dd*, 9.00, 2.69; 1H), 2.83 (*dd*, 6.00, 3.94; 2H), 2.36 (*dd*, 9.95, 6.86; 2H), 2.22 (*d*, 2.30; 1H), 2.21 (*d*, 2.01; 1H), 2.13 (*m*, 1H), 2.06 (*dd*, 6.00, 2.38; 1H), 1.84 (*m*, 3H), 1.75 (*dd*, 7.04, 1.22; 3H), 1.67 (*m*, 1H), 1.63 (*m*; 1H), 1.23 (*s*, 3H), 1.09 (*s*, 3H), 0.83 (*s*, 3H), 0.78 (*s*, 3H); EM-IE (C₃₂H₄₀O₉) *m/z* (int. rel.): 568 (1, [M]⁺), 95 (20), 83 (100).

A partir del fraccionamiento secundario de 8 g de la fracción **F_{VI}** en CCA (410 g de gel de sílice) empleando mezclas de polaridad creciente de hexano-AcOEt (100:0 → 50:50), se obtuvieron 10 fracciones secundarias (**F_{VI-1}** – **F_{VI-10}**). La purificación mediante CLAE semi-preparativa de la 600 mg de la fracción **F_{VI-4}** (fase móvil CH₃CN:H₂O 80:20 a 77:23 en 3 min, y 77:23 a 75:25 en 10 min; velocidad de flujo 3.45 ml min⁻¹) condujo al aislamiento de una nueva mexicanólida a la cual se denominó humilinólida G (**13**, 15 mg) (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015b), así como de la humilinólida C (**6**, 15 mg) (Segura-Correa *et al.*, 1993).

Humilinólida G (13): cristal incoloro; p.f. 245 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -124.77 (c. 1.0, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{\max} (log ϵ): 208 (0.728) nm; IR (FTIR) ν_{\max} : 3604, 2976, 2951, 1725, 1504, 1470, 1434, 1293, 1221, 1197 cm⁻¹; los datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN (CDCl₃) están en la Tabla 1; EM-IE m/z (C₃₃H₄₂O₁₀) (int. rel.): 598 (3, [M]⁺), 71 (100), 95 (96), 134 (30), 379 (15). Los datos cristalográficos de este compuesto se encuentran en el **Anexo 3**, Tablas **A1 – A6**, Figura **A1**.

Humilinólida C (6): polvo blanco; IR (FTIR) ν_{\max} : 3453, 2977, 2950, 1750, 1726, 1505, 1475, 1430, 1293, 1229, 1015 cm⁻¹; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 208.2, 174.1, 169.3, 169.0, 166.8, 143.2, 142.1, 139.9, 137.7, 127.5, 125.9, 120.8, 109.8, 85.3, 79.4, 77.0, 56.6, 52.4, 50.4, 45.3, 41.6, 40.7, 37.0, 34.5, 32.8, 29.8, 22.3, 21.9, 21.7, 20.9, 20.6, 15.8, 14.8, 12.1; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.82 (*m*, 1H), 7.43 (*t*, 1.73; 1H), 6.92 (*m*, 1H), 6.47 (*dd*, 1.91, 0.68; 1H), 5.68 (*s*, 3H), 5.65 (*s*, 1H), 5.37 (*t*, 2.03; 1H), 3.71 (*s*, 1H), 3.38 (*dd*, 9.88, 1.82; 1H), 2.88 (*t*, 3.90; 2H), 2.42 (*m*, 1H), 2.33 (*m*, 1H), 2.28 (*m*, 2 H), 2.25 (*m*, 1H), 2.13 (*s*, 3H), 2.06 (*m*, 1H), 1.83 (*m*, 3H), 1.76 (*m*, 3H), 1.66 (*m*, 2H), 1.42 (*m*, 1H), 1.22 (*s*, 3H), 1.10 (*s*, 3H), 1.00 (*s*, 3H), 0.75 (*s*, 3H); EM-IE m/z (C₃₄H₄₂O₁₀) (int. rel.): 568 (1), 95 (16), 83 (100).

El fraccionamiento terciario por CCA (200 g) de la fracción F_{VII-3} (3 g) usando mezclas de hexano–AcOEt (100:0→60:40) produjo seis fracciones (F_{VII-3a} – F_{VII-3f}). La fracción F_{VII-3c} (1.2 g) fue resuelta empleando cromatografía de argentación en columna abierta (Cardoso-Taketa *et al.*, 2004; Morris, 1966), empleando como fase móvil mezclas de polaridad creciente de hexano-AcOEt (90:10→70:30). Este proceso condujo a la generación de tres grupos de fracciones (100 mg) que fueron analizadas y purificadas mediante CLAE semi-preparativa (fase móvil CH₃CN:H₂O 65:35 a 70: 30 en 15 min; velocidad de flujo 3.45 ml min⁻¹). Se obtuvieron 11 mg de la mexicanólida metil-2-hidroxi-3 β -isobutioil-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliacato (**14**) descrita anteriormente en una mezcla (Okorie y Taylor, 1971).

Metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (14): polvo blanco; IR (FTIR) ν_{\max} : 3452, 2974, 2949, 1721, 1649, 1436, 1256, 1132, 756 cm⁻¹; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 213.3, 175.9, 174.1, 171.7, 143.3, 141.1, 120.2, 110.3, 84.5, 79.0, 78.3, 67.6, 63.2, 55.4, 52.6, 49.2, 45.7, 42.5, 40.0, 36.5, 34.3, 33.7, 33.4, 33.0, 26.4, 21.8, 20.5, 19.6, 19.5, 19.1, 16.2; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7.50 (*m*, 1H), 7.43 (*t*, 1.71; 1H), 6.45 (*dd*, 1.85, 0.83; 1H), 5.19 (*s*, 1H), 5.12 (*s*, 1H), 3.97 (*s*, -OH), 3.72 (*s*, 1H), 3.58 (*d*, 13.69; 1H), 3.55 (*s*, 1H), 3.15 (*dd*, 8.34, 3.12; 1H), 2.86 (*dd*, 16.16, 5.0; 1H),

2.79 (*m*, 1H), 2.33 (*m*, 2H), 1.97 (*m*, 2H), 1.88 (*dd*, 5.68, 3.61; 1H), 1.81 (*m*, 2H), 1.63 (*dd*, 13.67, 5.01; 1H), 1.30 (*d*, 4.93; 3H), 1.28 (*d*, 4.81; 3H), 1.16 (*s*, 3H), 1.01 (*s*, 3H), 0.79 (*s*, 3H), 0.75 (*s*, 3H); EM-IE (C₃₁H₄₀O₁₀) *m/z* (int. rel.): 572 (30[M]⁺), 164 (80), 71 (82), 122 (100).

Finalmente, del fraccionamiento secundario de la fracción **F_V** (10 g) en CCA (510 g de gel de sílice) usando mezclas de hexano-AcOEt (100:0→60:40), se obtuvieron seis fracciones secundarias (**F_{V-1}** – **F_{V-6}**). A partir de la separación mediante CLAE semi-preparativa (elución isocrática, fase móvil CH₃CN:H₂O 73:27 en 10 min; velocidad de flujo 4.0 ml min⁻¹) de 60 mg de la fracción **F_{V-5}**, se los obtuvieron los compuestos **13** (10 mg), **6** (15 mg), y la nueva mexicanólida humilinólida H (**15**, 15 mg) (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015b).

Humilinólida H (15): polvo blanco; p.f. 203 – 204 °C; [α]_D²⁵ -104.27 (c. 1.0, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} (log ε): 207.6 (0.609) nm; IR (FTIR) ν_{max}: 3444, 2950, 1725, 1506, 1139 cm⁻¹; los datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN (CDCl₃) están en la Tabla 1; EM-IE *m/z* (C₃₃H₄₂O₁₁) (int. rel.): 614 (6, [M]⁺), 367 (63), 237(100).

4.5 Desarrollo de un método por CLAE para la cuantificación de mexicanólidas

4.5.1 Condiciones cromatográficas

Los perfiles cromatográficos de *S. humilis* se obtuvieron en una columna Synergi™ 4 μm Hydro-RP 80 Å (150 × 4.6 mm, *d.i.* 4 μm; Phenomenex), mediante elución de tipo gradiente [fase móvil CH₃OH-H₂O (A) (30:70) y CH₃CN (B) de 45% B (0 min), a 55% B (10 min), a 100% B (30 min)] con una velocidad de flujo de 0.4 ml min⁻¹. La longitud de onda seleccionada para la detección fue 208.7 nm. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

4.5.2 Preparación de las muestras

Se prepararon seis réplicas de una fracción orgánica de AcOEt del extracto acuoso de *S. humilis* como se describe a continuación. Se obtuvo el extracto acuoso mediante la decocción de 15 g de semillas molidas con 300 ml de agua durante 1 hora. El extracto se filtró y concentró a presión reducida hasta la obtención de un residuo color café rojizo. Se disolvió el extracto seco (0.5 g) en H₂O destilada (20 ml) y se desgrasó 3 veces con hexano (20 ml). La

fracción acuosa se sometió a un proceso de reparto con AcOEt (20 ml, 3 veces). La fracción orgánica generada se concentró a presión reducida hasta obtener un residuo amarillo. Quince miligramos de este extracto se disolvieron en 5 ml of AcOEt y se sometieron a reparto con H₂O desionizada (20 ml, 3 veces). Un miligramo de la fracción orgánica resultante se disolvió en una mezcla 1:1 de CH₃CN:CH₃OH-H₂O (100:30-70), y se filtró a través de una membrana GHP de 0.45 mm (Millipore, E.U.A.). Esta solución se denominó matriz de trabajo. Todas las matrices de trabajo fueron analizadas con el método descrito en el inciso anterior; los picos de los cromatogramas fueron identificados por coelución con las mexicanólidas **1-3**, **6**, y **12-15**.

4.5.3 Cuantificación de las mexicanólidas en las semillas de *S. humilis*

El compuesto **3** fue seleccionado como compuesto de referencia para la cuantificación de las mexicanólidas identificadas en el extracto acuoso de *S. humilis*. La especificidad del método y las curvas de calibración del compuesto **3** se obtuvieron siguiendo las guías de la ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) y EURACHEM (ICH, 2005; Eurachem, 1998). La especificidad del método se basó en el registro de los espectros UV del compuesto **3** puro y de éste en las matrices de trabajo. Por su parte, las curvas de calibración se construyeron a través de la preparación por dilución a partir de soluciones independientes de **3** (1 mg/ml). Se utilizaron siete concentraciones del compuesto **3** en el rango de 5 – 280 µg/ml (seis réplicas por nivel de concentración). Se graficaron las áreas bajo la curva (ABC) del pico correspondiente a **3** de las diferentes réplicas con respecto a la concentración de referencia de cada solución. El análisis estadístico de la relación entre las ABC y la concentración de **3** se realizó mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. La interpolación de los valores del ABC de cada pico de las mexicanólidas identificadas en la ecuación de la regresión lineal de **3** condujo a la concentración de las mexicanólidas **1**, **2**, **6**, y **12-15** en las semillas de *S. humilis*.

4.6 Evaluación farmacológica *in vivo*

Todos los ensayos biológicos se realizaron en ratones macho de la cepa ICR (20 – 30 g de peso), o en ratas macho de la cepa Sprague Dawley (200 – 260 g de peso) adquiridos comercialmente al Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.). Los animales se

mantuvieron bajo condiciones de laboratorio estándar, observando los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), en temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo de 12 h/12 h luz/oscuridad, además de tener acceso a alimento estándar (2018S, Teklad Laboratories, E.U.A) y agua simple *ad libitum*, antes de todos los experimentos. Las evaluaciones se desarrollaron de acuerdo a guías internacionales para reducir el número de animales empleados en cada evaluación, y para refinar los procedimientos experimentales (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Zimmerman, 1983). El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, aprobó los protocolos experimentales aquí descritos (FQ/CICUAL/084/14, FQ/CICUAL/085/14, y FQ/CICUAL/086/14). Al concluir los experimentos, los animales fueron sacrificados mediante hipoxia en una cámara de CO₂.

4.6.1 Preparación y administración de las muestras

En las evaluaciones de toxicidad aguda, y potencial hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante, tanto los fármacos que fungieron como controles positivos como las muestras (extractos o compuestos puros), se suspendieron en el vehículo (solución salina isotónica, NaCl 0.9% – Tween 80 al 0.05%) y se administraron por vía intragástrica (*p.o.*) usando sondas de acero inoxidable (3.0 × 0.3" o 5.9 × 0.3") a razón de 0.2 ml/10 g de peso para ratones, y 0.2 ml/100 g de peso para ratas. En las evaluaciones del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico, los fármacos de referencia, extractos y compuestos puros a evaluar, se disolvieron en un vehículo constituido por solución salina isotónica con DMSO al 0.05%, y se administraron por vía subcutánea (*s.c.*) en el dorso de la extremidad posterior derecha empleando una jeringa hipodérmica (0.5 ml; 31G × 8 mm), a razón de 40 µl por pata.

4.6.2 Evaluación de la toxicidad aguda

La determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso (DSH) y de una suspensión de la droga cruda fragmentada de *S. humilis* se basó en el método descrito por Lorke (1983). Los tratamientos se administraron por vía intragástrica (*p.o.*) en dos etapas independientes;

en ambas se usaron doce ratones divididos en cuatro grupos ($n = 3$). En la primera etapa, las dosis administradas fueron 10, 100 y 1000 mg/kg; en la segunda, 1600, 2900 y 5000 mg/kg. El grupo control sólo recibió vehículo (solución salina isotónica – 0.05 % Tween). En las dos fases, los animales se observaron durante 1 h posterior al tratamiento para identificar efectos tóxicos agudos, cambios en los patrones de comportamiento o muertes. Durante catorce días, el peso y/o muertes de los animales se registraron diariamente. Transcurrido este tiempo, los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se procedió a la obtención de corazón, hígado, pulmones, hígado y riñones para un análisis macroscópico en busca de lesiones. El protocolo de Lorke establece el cálculo de la DL₅₀ mediante una media geométrica entre la dosis donde se presente el deceso de algún animal y la dosis donde no haya muerte alguna de roedores. En caso de no existir mortalidad se estima que la DL₅₀ del preparado evaluado es mayor a 5000 mg/kg de peso.

4.6.3 Evaluación del potencial hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante

Las pruebas biológicas conducentes a establecer la eficacia preclínica de *S. humilis* como agente hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante se basaron en modelos ampliamente descritos en la literatura empleando ratones normoglucémicos e hiper glucémicos (nicotinamida-estreptozotocina), así como ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Srinivasan y Ramarao, 2007; Verspohl, 2002; Wilson y Islam, 2012).

4.6.3.1 Determinación de la glucemia en ensayos de tipo agudo

Se realizó una pequeña incisión en la cola de los animales para la recolección de las muestras sanguíneas de la vena caudal. Los valores de glucemia (mg/dl) se obtuvieron mediante un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, E.U.A.) a los tiempos señalados en cada protocolo. Con los datos generados se calcularon *a*) el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales, o *b*) el porcentaje de variación de glucemia, o bien *c*) el incremento de los valores de glucosa y el ABC.

4.6.3.2 Modelos en ratón

Cada grupo experimental se formó con $n = 6$ ratones, que previo a cada procedimiento se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento, y que fueron privados de alimento entre 0 y 4 horas antes de cada evaluación; durante el desarrollo de los experimentos no recibieron agua. Las pruebas se realizaron en animales normoglucémicos e hiperglucémicos (nicotinamida-estreptozotocina).

4.6.3.3 Inducción experimental de hiperglucemia

Los ratones normoglucémicos se mantuvieron ayuno durante 4 horas. Posteriormente, recibieron por vía intraperitoneal (*i.p.*) nicotinamida (NA, 50 mg/kg; Sigma Aldrich, E.U.A.) disuelta en solución salina isotónica inyectable. Treinta minutos después, todos los animales fueron tratados con una dosis única de estreptozotocina (STZ, 130 mg/kg; Sigma Aldrich, E.U.A.) *i.p.* disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH = 4.5). El volumen de administración de ambas soluciones fue de 0.1 ml/10 g de peso (Juárez-Reyes *et al.*, 2015; Masiello *et al.*, 1998; Szkudelski, 2001). Los ratones se emplearon a los 7, a los 10, o a los 14 días después de la inducción química de hiperglucemia, dependiendo del protocolo.

4.6.3.4 Efecto hipoglucemiante agudo de preparados y compuestos

La decocción de las semillas de *S. humilis* (DSH), el extracto hexánico (HSH), y los compuestos **3** y **12** se evaluaron en un modelo hipoglucemiante empleando ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (7 días). Los animales no se sometieron a proceso de ayuno sino hasta el inicio y durante el desarrollo del experimento. En todos los experimentos se registraron los valores de glucemia basal (tiempo 0 h). Los extractos (DSH y HSH) fueron administrados a tres grupos de animales a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg, *p.o.* ($n = 6$). Por su parte, las dosis evaluadas de los compuestos **12** y **3** fueron 3.16, 10 y 31.6 mg/kg, *p.o.* ($n = 6$). Los grupos controles consistieron en un vehículo (VEH, solución salina isotónica - Tween 0.05 %; $n = 6$) y glibenclamida (GLI, 15 mg/kg *p.o.*; $n = 6$; Sigma Aldrich, E.U.A.) como control positivo. Los niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) se determinaron a las 1.5, 3, 5, 7 y 9 h posteriores a la administración de los tratamientos.

Con los valores de glucemia se calculó el área bajo la curva de los cursos temporales, como se describe en la **Fórmula 1**:

$$ABC [(mg \times h)/dl] = \sum_{t_0}^{t_n} \left(\frac{G_0 + G_i}{2} \right) (t_i - t_0) + \left(\frac{G_i + G_j}{2} \right) (t_j - t_i) + \dots$$

Fórmula 1: Cálculo del área bajo la curva empleando el método de los trapezoides

donde los subíndices 0, *i*, *j*, *n*, etc., representan los valores de glucemia (*G*) a las 0, 1.5, 3, *n* horas de medición (*t*).

4.6.3.5 Efecto antihiper glucémico de DSH y compuestos: pruebas de tolerancia a carbohidratos

4.6.3.5.1 Prueba de tolerancia a la glucosa oral

La decocción de las semillas de *S. humilis* (DSH), y los compuestos **12**, **1** y **3** se evaluaron en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (NA-STZ, 7 días). Como primer paso, los animales fueron privados de alimento 4 h antes de la evaluación. Luego, se obtuvieron los valores de glucemia basal (tiempo 0 h). La decocción de *S. humilis* (DSH) se administró a tres grupos de animales a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg, *p.o.* (*n* = 6). Los compuestos **12**, **1** y **3** se evaluaron a las dosis de 3.16, 10 y 31.6 mg/kg, *p.o.* (*n* = 6). El grupo vehículo fue solución salina isotónica - Tween 0.05 % (VEH; *n* = 6), y como control positivo se administró metformina (200 mg/kg, *p.o.*; *n* = 6; Sigma Aldrich, E.U.A.). Después de treinta minutos de la administración de los tratamientos, todos los ratones recibieron una carga de 1 g/kg *p.o.* de glucosa (Sigma Aldrich, E.U.A.). Los niveles de glucemia (mg/dl) se midieron a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos luego de la administración del carbohidrato. Con estos niveles se calculó el porcentaje de variación de glucemia de cada tiempo de medición, como se muestra en la **Fórmula 2**:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = (G_t - G_i) / G_i \times 100$$

Fórmula 2: Cálculo del porcentaje de variación de glucemia

donde *G_i* es la glucemia basal, y *G_t* corresponde a cada tiempo de medición de glucemia.

4.6.3.5.2 Prueba de tolerancia a la sacarosa oral

La decocción de *S. humilis* (DSH; dosis 31.6, 100 y 316 mg/kg, *p.o.*) se evaluó en una prueba de tolerancia a la sacarosa. La metodología fue idéntica que la descrita en el inciso anterior, salvo que como control positivo se usó acarbosa (ACA, 5 mg/kg *p.o.*; Sigma Aldrich, E.U.A.), y como carbohidrato de prueba sacarosa (2 g/kg *p.o.*; Sigma Aldrich, E.U.A.). Se calculó el porcentaje de variación de glucemia con la **Fórmula 2**.

4.6.3.6 Prueba de tolerancia a la insulina

La mexicanólida **12** se evaluó en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos en un modelo de tolerancia a la insulina. Los animales se mantuvieron sin alimento 4 h antes del experimento. Se midió la glucemia basal y los tratamientos se administraron por vía intragástrica. En ratones normoglucémicos se evaluaron las dosis de 2 y 10 mg/kg *p.o.*; en hiperglucémicos se evaluó sólo la dosis de 2 mg/kg *p.o.* Como fármaco de referencia se utilizó metformina (200 mg/kg, *p.o.* en ratones normoglucémicos, y 57.75 mg/kg *p.o.* en hiperglucémicos). Treinta minutos después, los animales recibieron una dosis de insulina *i.p.* (Humulin ®, Lilly, E.U.A.; 1 U/kg). En animales normoglucémicos, se midió la glucemia a los 15, 30, 45 y 120 min luego de la administración de insulina; en los hiperglucémicos, se midió hasta los 45 min. Se calculó el cambio de glucemia como se describe en la **Fórmula 3** (ver sección siguiente).

4.6.4 Establecimiento del posible mecanismo de acción antihiperglucémico de *S. humilis*

4.6.4.1 Construcción de curvas dosis – respuesta

Para la generación de las curvas dosis – respuesta de la mexicanólida **12**, del extracto acuoso de *S. humilis*, y de los fármacos de referencia metformina y glibenclamida, se utilizaron ratones hiperglucémicos (NA-STZ, 10 días), que fueron privados de alimento 4 h antes de la administración de los tratamientos. Transcurrido ese tiempo se midió la glucemia basal a todos los animales, los cuales fueron divididos en grupos de $n = 6$. El grupo control recibió solución salina isotónica – Tween 0.05 % (VEH). La mexicanólida **12** se administró en el rango de dosis de 0.5 a 31.6 mg/kg *p.o.*, y el extracto acuoso de *S. humilis* (DSH) en dosis entre los 10

y los 562 mg/kg *p.o.*; la metformina (MTF) se evaluó en el rango de los 30 a los 300 mg/kg *p.o.*, y la glibenclamida (GLI) en dosis entre 1 y 20 mg/kg *p.o.* Todas las dosis se seleccionaron de forma logarítmica de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (Fröde y Medeiros, 2008; Kecskemeti *et al.*, 2002; Wojcikowski y Gobe, 2014).

El tiempo 0 min correspondió al tiempo de administración de los tratamientos. Treinta minutos después, todos los ratones recibieron una solución de glucosa (1 g/kg; *p.o.*). Se midió la glucemia a los 30 y 60 min después de la administración del carbohidrato. Se calculó el incremento de glucemia como se indica en la **Fórmula 3**, y el área bajo la curva del pico postprandial con la **Fórmula 4**.

$$\Delta_{30glu} = G_{t_{30}} - G_{t_0} \text{ y } \Delta_{60glu} = G_{t_{60}} - G_{t_0}$$

Fórmula 3: Cálculo del incremento de glucemia (Δ_{glu})

donde los subíndices 0, 30 y 60, representan los valores de glucemia (G) basal, y a los 30 y 60 min después de la administración de la carga de glucosa.

$$ABC [(mg \times min)/dl] = \left(\frac{\Delta_{30glu}}{2} \right) (30) + \left(\frac{\Delta_{30glu} + \Delta_{60glu}}{2} \right) (30)$$

Fórmula 4: Cálculo del área bajo la curva del pico postprandial

donde los subíndices Δ_{30glu} y Δ_{60glu} representan el incremento de glucemia a los 30 y 60 min luego de la administración de glucosa. Con los valores de ABC se calculó el porcentaje de efecto antihiper glucémico de los tratamientos de todas las dosis evaluadas, y se estandarizó este porcentaje al efecto máximo observado.

4.6.4.2 Experimentos de activación y antagonismo: participación de los canales K_{ATP} y/o de receptores serotoninérgicos en el efecto de los compuestos 12 y 3

En los experimentos de activación y antagonismo *in vivo* se emplearon ratones hiperglucémicos (NA-STZ, 10 días). Los animales fueron privados de alimento 4 h antes de la evaluación. Al cabo de ese tiempo, se midió la glucemia basal a todos los ratones. En dos ensayos independientes, tres grupos de ratones hiperglucémicos se pre-trataron con el activador de canales K_{ATP} diazóxido (DZX, 2 mg/kg, *i.p.*; Sigma Aldrich, E.U.A.), y tres grupos se pre-trataron con el antagonista serotoninérgico 5-HT_{2A/C} ketanserina (KET, 2.5 mg/kg, *i.p.*;

Sigma Aldrich, E.U.A.). Treinta minutos después, cada uno de los grupos pre-tratados con DZX recibieron *p.o.* o el vehículo (VEH; solución salina isotónica – Tween 0.05 %), o el compuesto **12** (2 mg/kg), o glibenclamida (GLI; 9.47 mg/kg). Por otra parte, cada uno de los grupos pre-tratados con KET recibieron *p.o.* o VEH, o compuesto **12** (2 mg/kg) o compuesto **3** (31.6 mg/kg). Transcurridos 30 min, todos los ratones recibieron una carga de glucosa (1 g/kg; *p.o.*). La glucemia se determinó a los 30 y 60 min luego de la administración de glucosa. Se calcularon los valores de incremento de glucemia y área bajo la curva con las **Fórmulas 3 y 4**.

4.6.5 Interacción entre la mexicanólida **12**, DSH, MTF y GLI

De las curvas dosis – respuesta de todos los tratamientos se seleccionaron dosis equiefectivas del compuesto **12**, del extracto acuoso (DSH), metformina (MTF) y glibenclamida (GLI), que fueron evaluadas solas y en combinación (Tallarida, 2000). De esta manera, dosis de **12** (2 mg/kg, *p.o.*), DSH (864 mg/kg, *p.o.*), MTF (57.75 mg/kg, *p.o.*) y GLI (9.47 mg/kg, *p.o.*), y combinaciones de **12** + MTF (1 mg/kg + 28.875 mg/kg, *p.o.*), **12** + GLI (1 mg/kg + 4.735 mg/kg, *p.o.*), DSH + MTF (432 mg/kg + 28.875 mg/kg, *p.o.*), DSH + GLI (432 mg/kg + 4.735 mg/kg, *p.o.*), y MTF + GLI (28.875 mg/kg + 4.735 mg/kg, *p.o.*), se evaluaron como se describió en la sección **4.6.3.5.1**. Con los valores de glucemia medidos se calcularon los incrementos de glucemia y áreas bajo la curva con las **Fórmulas 3 y 4**.

4.6.6 Modelos en rata

4.6.6.1 Inducción experimental de síndrome metabólico en ratas Sprague Dawley (SM-IF)

Las ratas se dividieron en cuatro grupos de seis y se colocaron por pares en cajas de acrílico. Cada caja de animales tuvo acceso a 250 g de alimento estándar (pellets 2018S: 44.2 % carbohidratos, 18 % proteínas, 6.2 % grasa; 3.1 kcal/g; Teklad Global Diets, E.U.A.), los cuales fueron pesados cada tercer día para obtener por diferencia la cantidad de alimento consumida. Se colocaron bebederos de 500 ml a cada caja, donde se suministró al grupo I agua simple, y a los grupos II – IV una solución de fructosa al 10 % *p/v* (Savien®, México). Cada tercer día se midió el volumen de las soluciones y se calculó la ingesta calórica diaria promedio. Los animales fueron pesados y medidos (longitud de la nariz al ano) al inicio y al

final del experimento. Con estos parámetros se calculó el índice de Lee, dividiendo la raíz cúbica del peso final (g) entre la longitud final (cm) y multiplicando por 1000 (Ferreira de Moura *et al.*, 2009). El periodo de inducción de síndrome metabólico fue de 12 semanas, y las ratas se mantuvieron con la administración de la solución de fructosa hasta las 15 semanas.

4.6.6.2 Tolerancia a la glucosa oral

Las ratas con síndrome metabólico (12 semanas, SM-IF) se dividieron en cuatro grupos ($n = 6$). Se midió la glucemia basal (tiempo 0 min). El grupo control recibió vehículo (solución salina isotónica – Tween 0.05 %), en tanto que el correspondiente al control positivo recibió metformina (200 mg/kg, *p.o.*). Dos grupos fueron tratados con la decocción (DSH; 100 mg/kg y 316 mg/kg, *p.o.*). Treinta minutos después, los animales recibieron una carga de glucosa (2 g/kg, *p.o.*). La glucemia se determinó en intervalos de 30 min hasta los 120 min posteriores a la administración de glucosa. Se calculó el porcentaje de variación con la **Fórmula 2**.

4.6.6.3 Efecto de la administración diaria de DSH en ratas SM-IF

Dos grupos de ratas SM-IF (14 semanas, $n = 6$) recibieron diariamente durante una semana la decocción de *S. humilis* (DSH) a las dosis de 100 y 316 mg/kg, *p.o.*; un tercer grupo de ratas ($n = 6$) fungió como control y recibió *p.o.* solución salina isotónica – Tween 0.05 %. En el transcurso del experimento, las ratas tuvieron acceso a alimento estándar y a la solución de fructosa al 10%. Al término de la semana de tratamiento (semana 15), las ratas fueron privadas de alimento durante 4 h con acceso a agua simple, y anestesiadas con ketamina-xilazina (80 mg/kg-10 mg/kg *i.p.*; Sigma Aldrich, E.U.A.) para obtener 1.5 ml de sangre por punción retro-orbital. Se separó el suero del paquete celular mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se obtuvieron el hígado y la grasa abdominal. La grasa abdominal fue pesada y descartada. El suero y el tejido hepático fueron almacenados a -80 °C hasta que se realizó la determinación de parámetros bioquímicos.

4.6.6.4 Determinación de parámetros bioquímicos, niveles de insulina y glucógeno hepático

Se realizó la determinación colorimétrica de glucosa, triglicéridos, colesterol total y ácido úrico séricos empleando reactivos comerciales (Randox Laboratories, E.U.A.). Los

niveles de insulina sérica se estimaron con un kit comercial (ALPCO Rat Insulin ELISA, E.U.A.). El glucógeno hepático fue cuantificado de acuerdo a un método descrito en la literatura (Cristians *et al.*, 2009), en el cual 50 mg de tejido fueron homogenizados en buffer de citratos frío (0.1 M, pH 4.2), y diluidos hasta obtener una solución de concentración igual a 5 mg de tejido/ml. A diez microlitros de esta solución se adicionaron 10 μ l de una solución de la enzima amiloglucosidasa (exo-1,4- α -glucosidasa, EC 3.2.1.3; 1 mg/ml; Sigma Aldrich, E.U.A.); la mezcla se dejó a temperatura ambiente por 2 h. Se cuantificó la glucosa hepática mediante el método de glucosa oxidasa (Glucosa TR, Spinreact, España), relacionado la glucosa presente en el homogenado, y la cuantificada en la mezcla de éste con la amiloglucosidasa. El contenido de glucógeno se expresó como mg de glucosa/mg de tejido hepático.

4.6.7 Evaluación del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de *S. humilis*

Los efectos antinociceptivo y antihiperalgésico de *S. humilis* (DSH) se establecieron mediante el modelo de formalina, usando ratones normoglucémicos e hiperglucémicos (NA-STZ, 50-130 mg/kg), respectivamente (Hunnskaar y Hole, 1987). Los animales hiperglucémicos se emplearon tras 14 días del tratamiento con NA-STZ.

4.6.7.1 Modelo de formalina

El dispositivo donde se desarrolló el experimento consistió en un cilindro de acrílico de 20 \times 40 cm con dos espejos de 40 \times 40 cm situados de forma perpendicular a la base; el dispositivo se mantuvo a 25 °C. Los ratones fueron colocados individualmente dentro del cilindro durante 15 min. Luego de la adaptación al dispositivo, los animales recibieron en la pata posterior derecha por vía subcutánea (*s.c.*), 40 μ l de soluciones de la decocción de *S. humilis*, DSH (10, 25, 31.6, 80 y 100 μ g en ratones normoglucémicos, o 10, 31.6, 56.2, 100 y 177 μ g en ratones hiperglucémicos) o soluciones de mexicanólida **12** (0.5, 1, 2, 3 y 3.5 μ g en ratones hiperglucémicos); los animales fueron devueltos al cilindro. Todas las concentraciones utilizadas se seleccionaron en escalas logarítmicas (Fröde y Medeiros, 2008; Wojcikowski y Gobe, 2014). Tras quince minutos, los ratones recibieron 40 μ l de una solución de formaldehído (2% para ratones normoglucémicos, y 1% para hiperglucémicos) en la misma pata que los tratamientos. La respuesta bifásica inducida por la solución de

formaldehído (lamer la pata inyectada) se cuantificó cada 5 min durante 30 min. Como control positivo se usó gabapentina (GBP, 30 µg/pata; Sigma Aldrich, E.U.A.). Se calculó el área bajo la curva de los cursos temporales para la fase 1, la fase 2 y el área bajo la curva total con la **Fórmula 5**.

$$ABC (seg \times min) = \sum_{t_0}^{t_n} \left(\frac{t_0 + t_i}{2} \right) (5) + \left(\frac{t_i + t_j}{2} \right) (5) + \dots$$

Fórmula 5: Cálculo del área bajo la curva empleando el método de los trapezoides

donde los subíndices 0, *i*, *j*, *n*, representan los tiempos de lamida (*t*) a los 0, 5, 10, *n* minutos de medición. Para la fase 1, el periodo de tiempo considerado fue de los 0 a los 10 min, para la fase 2 de 10 a 30 min; el área total comprendió de los 0 a los 30 min luego de la administración de la solución de formaldehído.

4.6.7.2 Establecimiento del posible mecanismo de acción como antihiperalgésico de la mexicanólida 12

Los ratones hiperglucémicos fueron asignados a grupos (*n* = 12) que recibieron por vía subcutánea alguno de los siguientes fármacos: ketanserina (KET, antagonista 5-HT_{2A/2C}; 6 µg/pata), flumazenilo (FLU, antagonista GABA_A/BDZ; 6 µg/pata), naloxona (NLX, antagonista opioide; 3 µg/pata), glibenclamida (GLI, bloqueador de canales K_{ATP}; 50 µg/pata), 1-*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (ODQ, inhibidor reversible de la guanilato ciclasa; 75 µg/pata), éster metílico de L-nitroarginina (L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintasa; 150 µg/pata), L-arginina (ARG, precursor en la síntesis de óxido nítrico; 50 µg/pata), o 3-morfolinosidnonimina (SIN-1, donador de óxido nítrico; 200 µg/pata). Quince minutos después de los pre-tratamientos, los ratones recibieron en la misma pata o el vehículo (40 µl; *n* = 6) o la mexicanólida **12** (3 µg/pata; *n* = 6); los animales fueron devueltos al cilindro por 15 min adicionales. Al cabo de ese tiempo, los ratones recibieron s.c. 40 µl de una solución de formaldehído al 1%; se registró el tiempo de lamida como se indicó en la sección anterior, y se calcularon las ABC total y de las fases 1 y 2 con la **Fórmula 5**.

4.7 Análisis estadístico de las evaluaciones *in vivo*

Los resultados de los experimentos del potencial hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante, están expresados como el promedio \pm error estándar de la media (EEM) del área bajo la curva, o del porcentaje de variación de glucemia, o del incremento de glucemia de grupos de animales de $n = 6$. Los resultados de la evaluación antinociceptiva y antihiperalgésica están expresados como el promedio \pm EEM del área bajo la curva de grupos de $n = 6$, para las fases 1, 2 y área total. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos se calcularon con el programa GraphPad Prism (versión 6.0; GraphPad Inc., E.U.A.), usando análisis de varianza (ANADEVA) y alguna prueba *post hoc* (Dunnett o Tukey), o bien, mediante un ANADEVA de dos vías seguido de una prueba Bonferroni.

4.8 Evaluación farmacológica *in vitro*

4.8.1 Potencial antioxidante

Para determinar la capacidad de atrapamiento de radicales peroxilo de la decocción de *S. humilis* (DSH) y de los compuestos **12**, **1** y **3**, se realizó el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) según lo descrito en la literatura (De la Rosa *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2002). En este ensayo, 25 μ l de las muestras [agua, solución estándar de Trolox, DSH (2.5 mg/ml), **12**, **1**, y **3** (1.25 mg/ml)] se mezclaron con 25 μ l de una solución 153 mM del generador de radicales peroxilo AAPH [diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] y con 150 μ l de una solución 50 nM de fluoresceína (sonda fluorescente). Las mezclas resultantes se incubaron a 37 °C por 10 min. Se midió la fluorescencia cada minuto durante 35 min empleando filtros de 485 nm y 520 nm, y un lector de microplacas (BioRad Benchmark Plus, BioRad Laboratories, Inc., E.U.A.). Los valores ORAC se calcularon a partir del área total de las curvas de decaimiento de fluorescencia. Los resultados se expresaron como el promedio \pm EEM de los μ mol equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($n = 4$).

4.8.2 Ensayos basados en células

Se emplearon células H4IIE (hepatocitos de rata) y C2C12 (mioblastos de ratón) adquiridas a The American Type Culture Collection (ATCC, E.U.A.), que fueron cultivadas en

placas de 12 o 24 pozos con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con antibióticos (0.5 %; penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml) suplementado con suero fetal bovino (FBS, 10%) para los hepatocitos, o con FBS 10% y suero de caballo (HS, 10%) para mioblastos, a 37 °C en una atmósfera 95%-5% CO₂-aire humidificada. Cuando los hepatocitos alcanzaron un 90% de confluencia se trataron con las soluciones de las muestras a evaluar contenidas en DMEM libre de FBS. Los mioblastos fueron cultivados hasta que alcanzaron un 60% de confluencia, y luego fueron diferenciados a miotubos durante 6 días con medio de diferenciación (DMEM con 2% HS y antibióticos). El día 6, los miotubos fueron tratados con las muestras a evaluar contenidas en medio de diferenciación (Shang *et al.*, 2015).

En todos los ensayos, las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo vehículo (DMSO) se obtuvieron con el programa GraphPad Prism (versión 6.0; GraphPad Inc., E.U.A.), mediante un ANADEVIA de una vía seguido de un prueba Dunnett ($p < 0.05$).

4.8.2.1 Citotoxicidad

Se establecieron las concentraciones óptimas no tóxicas de la decocción de *S. humilis* (DSH) y de los compuestos puros **12**, **15** y **3** mediante una prueba de citotoxicidad basada en la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Nachar *et al.*, 2013). Los hepatocitos o los miotubos fueron tratados entre 16 y 18 h con concentraciones geométricas de DSH (20 – 200 µg/ml) o de los compuestos **12**, **15**, o **3** (1.25 – 15 µg/ml). El grupo control recibió DMSO al 0.1%. Al cabo de ese tiempo, los medios fueron recolectados en tubos Eppendorf y mantenidos en hielo hasta el momento del análisis (LDH liberada). Luego, las células se lisaron con 500 µl de DMEM libre de FBS adicionado con Triton X-100 al 1%. Tras 10 min de incubación sobre hielo, las células lisadas fueron desprendidas por raspado de las placas de cultivo y colocadas en tubos Eppendorf (LDH celular). Todas las muestras se centrifugaron a 1000 rpm a 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron analizados usando un kit comercial (LDH Colorimetric kit; Roche, Alemania), midiendo su absorbancias a 492 nm. Los resultados del ensayo de citotoxicidad están expresados como el promedio ± EEM del porcentaje de muerte correspondiente a la proporción entre la LDH liberada respecto a la total (LDH liberada + LDH celular) de dos o tres experimentos independientes ($n = 6$ o $n = 9$).

4.8.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) en células H1IE4

El ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa se realizó de acuerdo lo descrito en la literatura (Nachar *et al.*, 2013). Los hepatocitos se trataron durante 16 h con DSH (100 y 200 µg/ml), o con las mexicanólidas **12**, **15**, y **3** (5 µg/ml). Como grupo control se utilizó DMSO al 0.1%; el grupo control positivo se trató con insulina (100 nM). Transcurrido el tiempo del tratamiento, las células se lavaron con una solución salina buffer HEPES (pH 7.4). Posteriormente, se adicionaron 200 µl de buffer de un kit para la determinación de glucosa (Autokit Glucose, Wako, E.U.A.) y 50 µl buffer de una solución de Triton X-100 (0.05%). A continuación, se adicionaron a las células tratadas o 25 µl de agua desionizada ultrafiltrada o 25 µl de una solución 200 mM de D-glucosa-6-fosfato (Sigma Aldrich, E.U.A.). Las células se incubaron durante 40 min de acuerdo a las instrucciones de un kit comercial a 37 °C en una atmósfera 95%-5% CO₂-aire. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 200 µl del reactivo de desarrollo de color del kit; las células se incubaron 5 min más en las condiciones descritas. Al finalizar esta incubación, la mezcla de reacción fue centrifugada a 10 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia de los sobrenadantes se determinó a 505 nm. Los resultados de este ensayo están expresados como el promedio ± EEM del porcentaje de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa de tres experimentos independientes ($n = 6$).

4.8.2.3 Ensayo de captación de glucosa en células C2C12

El experimento de captación de glucosa en miotubos C2C12 se desarrolló de acuerdo a reportes previos (Martineau *et al.*, 2006). En su sexto día de diferenciación, las células se trataron durante 18 h con soluciones de la decocción de *S. humilis* (200 µg/ml) o de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** (10 µg/ml); se empleó metformina (400 µM) como uno de los controles positivos; el grupo control recibió DMSO al 0.1%. Tras este periodo, las células se lavaron tres veces con una solución buffer de Krebs-fosfatos, pH 7.4, a 37 °C (BKF; HEPES 20 mM, Na₂HPO₄ 4.05 mM, NaH₂PO₄ 0.95 mM, NaCl 136 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, y glucosa 5 mM). Luego del lavado, algunos pozos de células fueron tratados con 500 µl de una solución de insulina 100 nM en BKF durante 30 min a 37 °C en una atmósfera 95%-5% CO₂-aire; el resto de los pozos se mantuvo sólo con BKF en las mismas condiciones. Al término de esta incubación, las células se lavaron por triplicado con BKF sin glucosa (37 °C) y se trataron con una solución 10 µM de 2-deoxi-D-[1-³H]-glucosa (0.5 µCi/ml). Algunos pozos

fueron tratados con BKF sin glucosa con 2-deoxi-D-[1-³H]-glucosa y citocalasina B (10 μM), un inhibidor del transporte de glucosa no específico. Las células se incubaron exactamente 10 min a 37 °C en una atmósfera 95%-5% CO₂-aire. Luego, las placas fueron colocadas sobre hielo y las células se lavaron tres veces con BKF frío. Posteriormente, se adicionaron a las células 500 μl de una solución de NaOH 0.1 M. Tras 30 minutos se obtuvo el lisado celular, el cual se adicionó a 4 ml de líquido de centelleo (Ready-Gel 586601; Beckman Coulter, E.U.A.). La radioactividad incorporada en cada muestra se midió en un contador de centelleos Perkin Elmer (LKB Wallac 1219, Canadá). Los resultados de esta evaluación están presentados como el promedio ± EEM del porcentaje de captación de 2-deoxi-D-[1-³H]-glucosa de cinco experimentos independientes ($n = 10$).

4.8.2.4 Efecto de las mexicanólidas **12, **3** y **15** sobre la activación de la proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato (AMPK) en células C2C12**

La evaluación de la capacidad de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** para activar a la cinasa AMPK en células musculares, se realizó mediante la cuantificación de expresión de las formas total y fosforilada de esta enzima empleando la técnica de Western blot (Nachar *et al.*, 2013; Shang *et al.*, 2015).

4.8.2.4.1 Obtención y cuantificación de proteínas

Las células C2C12 se trataron durante 18 h con DMSO (0.1%), metformina (400 μM), o con las mexicanólidas **12**, **3** y **15** (10 μg/ml) el sexto día de diferenciación. Luego de este periodo, algunos pozos con células fueron incubados durante 30 min con 25 μl de una solución 2 μM de AICAR (ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida). Posteriormente, las células se colocaron en hielo y se lavaron tres veces con buffer de fosfatos salino frío, pH 7.4 (PBS, KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137 mM, y Na₂HPO₄ 8.09 mM). Después, las células se lisaron con el amortiguador de lisado RIPA, pH 7.4 (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM, glicerol 5%, Triton X-100 1%, y dodecilsulfato de sodio, SDS 0.2%), que contenía además una combinación comercial de inhibidores de proteasas (Complete Mini; Roche, Alemania), adicionado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo, y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio 100 μM, pirofosfato de sodio

1 mM, y fluoruro de sodio 10 mM). Los lisados celulares se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min. La cuantificación de las proteínas en los sobrenadantes se realizó empleando un kit comercial, usando albúmina sérica bovina como estándar (Bio-Rad Protein Assay reagent; Bio-Rad Laboratories, E.U.A.). Las proteínas obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

4.8.2.4.2 Preparación y análisis de las proteínas

Las muestras proteicas se diluyeron a una concentración final de 1.0 µg/µl, y se colocaron a ebullición en un buffer reductor, pH 6.8 (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, y azul de bromofenol 0.01%) durante tres minutos. Las muestras se separaron por electroforesis durante 100 min en un aparato Mini Trans-Blot Cell (Bio-rad, Bio-Rad Laboratories, E.U.A.), usando geles de poliacrilamida al 10% de SDS, y un buffer de migración (Tris base 24.8 mM, glicina 0.192 M, SDS 3.46 mM). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.045 µm; Bio-Rad Laboratories, Alemania) empleando una solución amortiguadora de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Luego, se evaluó la transferencia de las proteínas a la membrana empleando la tinción de rojo Ponceau S. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con buffer Tris salino-Tween, pH 7.6 (TBST; Tris base 200 mM, NaCl 1.37 mM, y Tween-20 al 0.1%). A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en TBST por 1.5 h. Tras el bloqueo y lavado con TBST, las membranas se incubaron a 4 °C en agitación durante 18 h con los anticuerpos primarios fosfo-AMPKα (Thr172), 1:250, y AMPKα, 1:500 (Cell Signaling, E.U.A.). Luego del periodo de incubación, las membranas se lavaron con TBST y se expusieron durante 1 h a temperatura ambiente a un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anti-conejo, 1:20000; Jackson, E.U.A.). Seguido de este proceso, las membranas se lavaron nuevamente con TBST y las bandas se detectaron empleando un kit de quimioluminiscencia (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer Inc., E.U.A.). La adquisición de las imágenes de las bandas se hizo en el sistema ImageQuant LAS4000 (General Electric Healthcare Life Sciences, E.U.A.). La cuantificación de las bandas detectadas se efectuó en el programa NIH Image J software (v. 1.49, National Institutes of Health, E.U.A.). Los resultados se presentan como el promedio ± EEM de la expresión relativa de p-AMPK/AMPK total de tres experimentos independientes.

4.9 Estudios teóricos de modelado molecular

4.9.1 Preparación de las estructuras

Las estructuras de las mexicanólicas **1-3**, **6**, y **12-15**, de la ketanserina, y la serotonina se construyeron usando el programa Spartan'10 (Wavefunction Inc., E.U.A.). La búsqueda de la conformación más estables se realizó en el mismo programa de modelado usando un campo de fuerza *MMFF*. Las estructuras de mínima energía se optimizaron geoméricamente usando teoría de funcionales de la densidad (DFT) con un campo de fuerza B3LYP/DGDZVP con el programa Gaussian 09 (Gaussian Inc., E.U.A.). Las estructuras optimizadas sirvieron como base para los estudios teóricos de acoplamiento molecular.

4.9.2 Modelado por homología del receptor serotoninérgico 5-HT_{2C}

Debido a que a la fecha la estructura cristalográfica del receptor 5-HT_{2C} no se encuentra reportada en el Protein Dat Bank (PDB, RCSB), se realizó un modelado por homología del mismo usando el programa Modeller 9.14. La secuencia de aminoácidos para el receptor 5-HT_{2C} se obtuvo de la base de datos UniProt (www.uniprot.org, ID P28335). La búsqueda de secuencias homólogas se realizó usando el servidor en línea Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). La secuencia con mayor porcentaje de identidad (54.03%) correspondió a la estructura cristalizada del receptor 5-HT_{2B} humano en complejo con la ergotamina (código PDB: 4NC3, resolución de 2.80Å). Se generaron 100 modelos del receptor con el programa Modeller; el mejor modelo se optimizó geoméricamente y refinó con el programa HyperChem 8 (Laskowski *et al.*, 1993). Finalmente, se realizó una evaluación de la calidad del modelo del receptor 5-HT_{2C} usando la herramienta en línea QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Benkert *et al.*, 2009), así como con la revisión de la conformación de su estructura secundaria a través de la obtención de sus diagramas de Ramachandran usando la herramienta en línea MolProbit (<http://molprobit.biochem.duke.edu>) (Lovell *et al.*, 2003).

4.9.3 Preparación de las estructuras para el modelado molecular

Para los estudios teóricos de acoplamiento molecular, las estructuras de mínima energía de las mexicanólicas se prepararon con la asignación de cargas de Gasteiger-Marsilli, la adición de hidrógenos no polares y de números de torsión, usando el programa Autodock Tools package v1.5.4 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>) (Morris *et al.*, 2009). Los hidrógenos (polares y no polares), cargas Kollman y parámetros de solvatación del receptor se seleccionaron a partir de las características preestablecidas del programa Autodock.

4.9.4 Estudios de acoplamiento molecular

Los estudios de acoplamiento molecular (docking) se realizaron con el programa AutoDock Vina v1.1.2 (Trott y Olson, 2010). Inicialmente, se llevó a cabo un docking ciego con la finalidad de establecer un sitio común de interacción de las mexicanólicas con los dominios transmembranales de receptor 5-HT_{2C} (5-HT_{2C}-TM). Se construyó una caja de reconocimiento molecular de 58 × 38 × 60 Å en las dimensiones *x*, *y* y *z*, con un espacio de 1.0 Å y con el receptor en el centro de la caja. Posteriormente, se realizó un refinamiento con un tamaño de caja menor (20 × 38 × 60 Å), dejando fijos los residuos de aminoácido comunes en todas las posiciones de acoplamiento de las mexicanólicas (Trp130, Val208, Leu209, Glu347, Leu350 y Asn351). Las posiciones de acoplamiento obtenidas se analizaron con el programa ADT; de manera adicional, se identificaron las interacciones de tipo puente de hidrógeno y van der Waals entre el sitio activo de los 5-HT_{2C}-TM y los ligandos. Se eligieron como complejos de acoplamiento predichos (proteína – ligando) aquellas conformaciones que tuvieran menores energías de unión. Las constantes de inhibición (K_i) estimadas se calcularon a partir de la energía de acoplamiento mostrada por AutoDock Vina con la ecuación $K_i = \exp(\Delta G \times 1000 / RT)$, donde ΔG es la energía de acoplamiento, R es la constante universal del gas ideal (1.98719 cal K⁻¹ mol⁻¹), y T es la temperatura (298.15 K). La preparación de las figuras se hizo con la herramienta de visualización del programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC) (Seeliger y De Groot, 2010).

V. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación se discutirán en cuatro secciones. En la primera se describe la contribución relacionada con el desarrollo de pruebas de identidad y composición de la droga cruda de *Swietenia humilis*. La segunda sección contiene los resultados de las evaluaciones sobre el potencial tóxico, hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante, del extracto acuoso y de mexicanólidas selectas; en este apartado también se resumen los resultados de la exploración de los posibles mecanismos de acción antidiabéticos en modelos *in vivo* e *in vitro* y un estudio teórico de acoplamiento molecular de las mexicanólidas aisladas de las semillas de la planta con un receptor serotoninérgico construido por homología. Posteriormente, se analizan los resultados de la interacción del preparado tradicional de *S. humilis* y de uno de sus productos mayoritarios, la mexicanólida acetato de 2-hidroxi-6-desoxi-destigloilswietenina (**12**), con los fármacos metformina y glibenclamida. Finalmente, se presentan y discuten los resultados *in vivo* de la acción antinociceptiva y antihiperalgésica de un extracto acuoso y de la mexicanólida **12**.

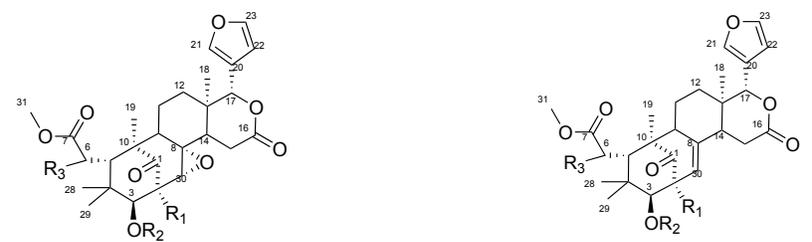
5.1 Parámetros de composición: estudio fitoquímico y perfiles cromatográficos de *S. humilis*

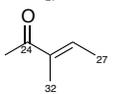
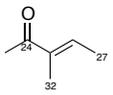
El establecimiento de la composición química de una especie medicinal empleando técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas, constituye la base para el aseguramiento de la calidad tanto de las drogas crudas como de los preparados a base de ellas; la seguridad y la eficacia de las plantas medicinales se sustenta en la identificación y cuantificación de sus metabolitos marcadores (activos o no) (Ciésła y Waksmundzka-Hajnos, 2009). En esta sección se describen los resultados del estudio fitoquímico de las semillas de *S. humilis*, así como la detección y cuantificación de sus principios activos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

5.1.1 Aislamiento y elucidación estructural de las humilinólidas G (**13**) y H (**15**)

Con la finalidad de obtener los metabolitos presentes en las semillas de *S. humilis* se preparó un extracto de naturaleza orgánica [CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1)]. Éste se sometió a varios fraccionamientos sucesivos mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. La purificación de los metabolitos de las semillas se logró empleando CLAE en fase reversa. Al cabo de estos procedimientos se aislaron ocho mexicanólidas (**Cuadro 4**); un grupo presenta una doble ligadura entre los carbonos C-8 y C-30 (compuestos **12**, **2**, **3**, **13**, y **6**) y las otras poseen una función epóxido en las mismas posiciones (compuestos **1**, **14** y **15**). Los productos **1**, **2**, **3**, **6**, y **14**, se identificaron por la aplicación de métodos espectroscópicos (RMN de ¹H y ¹³C, e IR) y espectrométricos (EM-IE), utilizando como base los datos reportados previamente en la literatura (Jimenez *et al.*, 1998; Mulholland y Taylor, 1988; Segura-Correa *et al.*, 1993); el compuesto **12** se describe por primera vez para la especie (**Anexo 1**). Los compuestos **13** y **15** son nuevas entidades químicas, por lo tanto su caracterización se describe a continuación.

Cuadro 4. Limonoides aislados de *Swietenia humilis* en la presente investigación.



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
1	OH		H	12	OH		H
14	OH		H	2	OH		H
15			H	3	OH		H
				6			H
				13			H

Referencias: Jiménez *et al.*, 1998; Mulholland y Taylor, 1988; Okorie y Taylor, 1971; Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015b; Segura-Correa *et al.*, 1993.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico de los compuestos **13** y **15** (**Anexo 2, Figuras A1 y A3**) presentaron iones moleculares en relaciones masa carga (m/z) de 598 y 614 uma, correspondientes a las fórmulas moleculares $C_{33}H_{42}O_{10}$ y $C_{33}H_{42}O_{11}$, respectivamente. En los espectros de infrarrojo se registraron bandas intensas de absorción en ν_{\max} 1725, 1223, 1504 y 1197 cm^{-1} características de la presencia de grupos cetona, carboximetilo, furano y éster, respectivamente (**Anexo 2, Figura A2**). El análisis de los datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear reveló que ambos metabolitos se diferenciaban fundamentalmente en las señales correspondientes a los núcleos en C-8 y C-30 (**Tabla 1**).

Por otro lado, la comparación de los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H de **13** y de la humilínolida C (**6**) reveló que los compuestos diferían en las señales del residuo de ácido en C-3. Así, en los espectros del compuesto **13** se observaron señales características para un residuo isobutilo [δ_{C} 176.1, 34.1, 18.7, y 19.3; δ_{H} 2.65 (*m*), 1.18 (*d*) y 1.17 (*d*)] en lugar de las señales del grupo tigloilo del compuesto **6**. Los espectros de ^{13}C y ^1H de **13** también mostraron las señales típicas de una olefina trisustituida entre C-8 y C-30 (δ_{C} 137.7 y 125.7; δ_{H} 5.38), y la de un carbono cuaternario base de grupo acetilo [δ_{C} 169.3, 85.1 y 21.7; δ_{H} 2.12 (*s*)]. Las absorciones de H-3 (δ_{H} 5.54) y H-30 (δ_{H} 5.38) aparecieron como señales singlete y triplete, respectivamente, y fueron consistentes con la presencia de un residuo de éster en C-2 (**Figura 4**). La ubicación del grupo isobutilo en C-3 se confirmó con base en el análisis de las correlaciones observadas en los experimentos de correlación heteronuclear HMBC. De tal forma que el doblete en δ_{H} 1.17 (H-27) y la señal en δ_{H} 5.54 (H-3) mostraron una clara correlación con el carbonilo en C-24 (δ_{C} 176.1) (**Figuras 5 y 6**). La obtención de cristales apropiados del compuesto **13** para un análisis por difracción de rayos X permitió confirmar inequívocamente su estructura como la de una mexicanólida no reportada en la literatura (**Figura 7; Anexo 3, Tablas A1-A6 y Figura A1**).

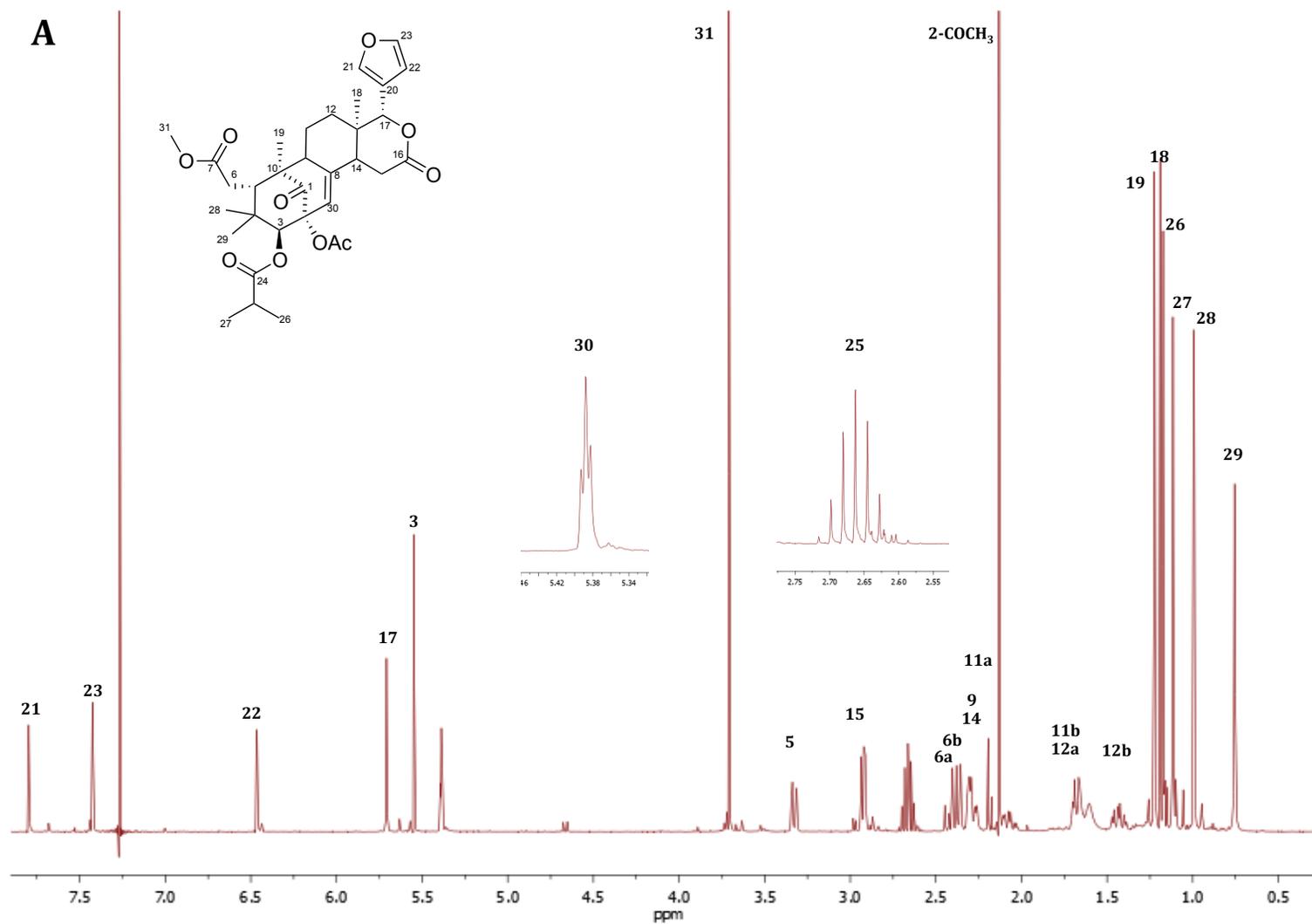


Figura 4. Panel A. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) de la Humilinólida G (**13**).

B

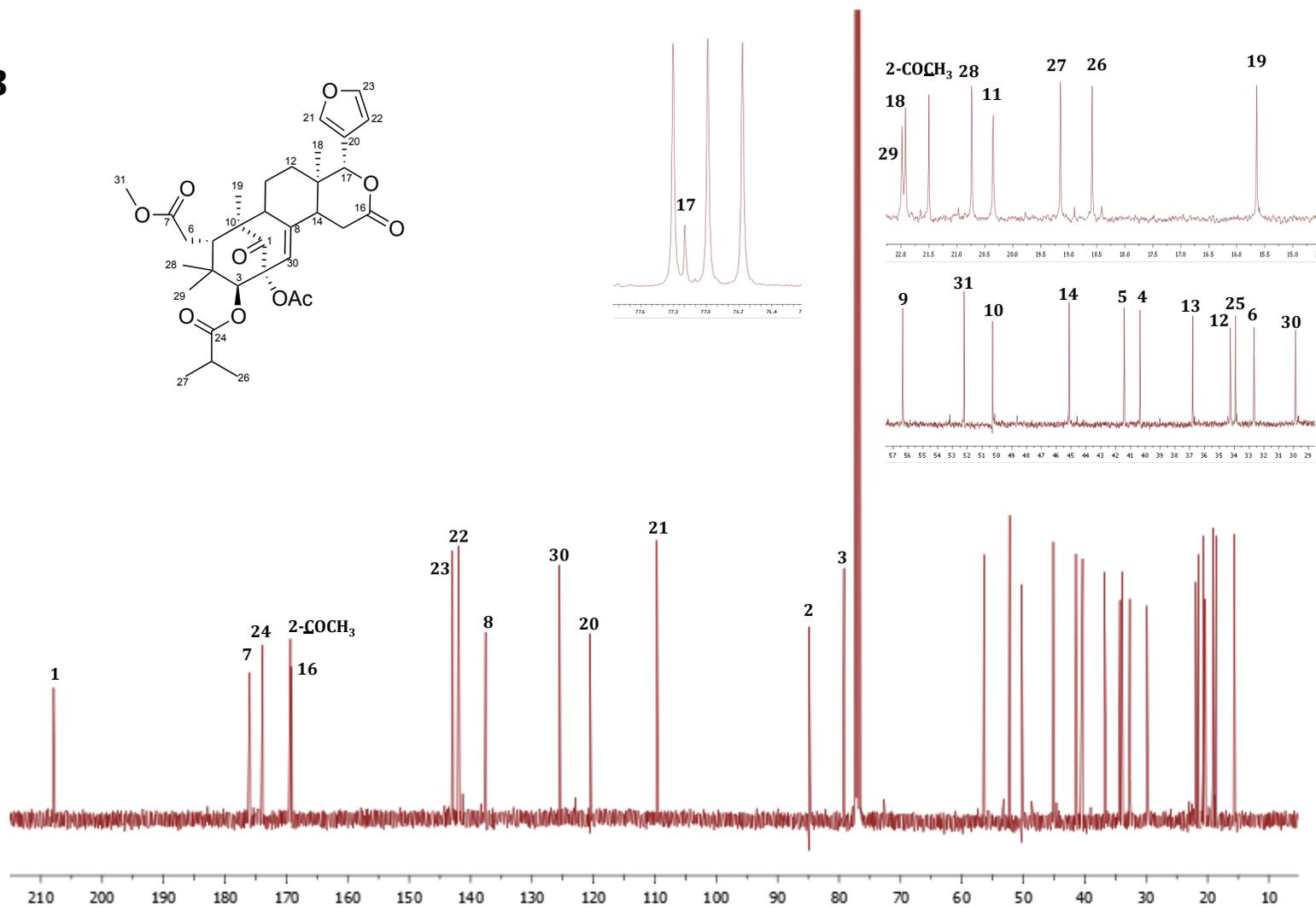


Figura 5. Panel B. Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) de la Humilinólida G (13).

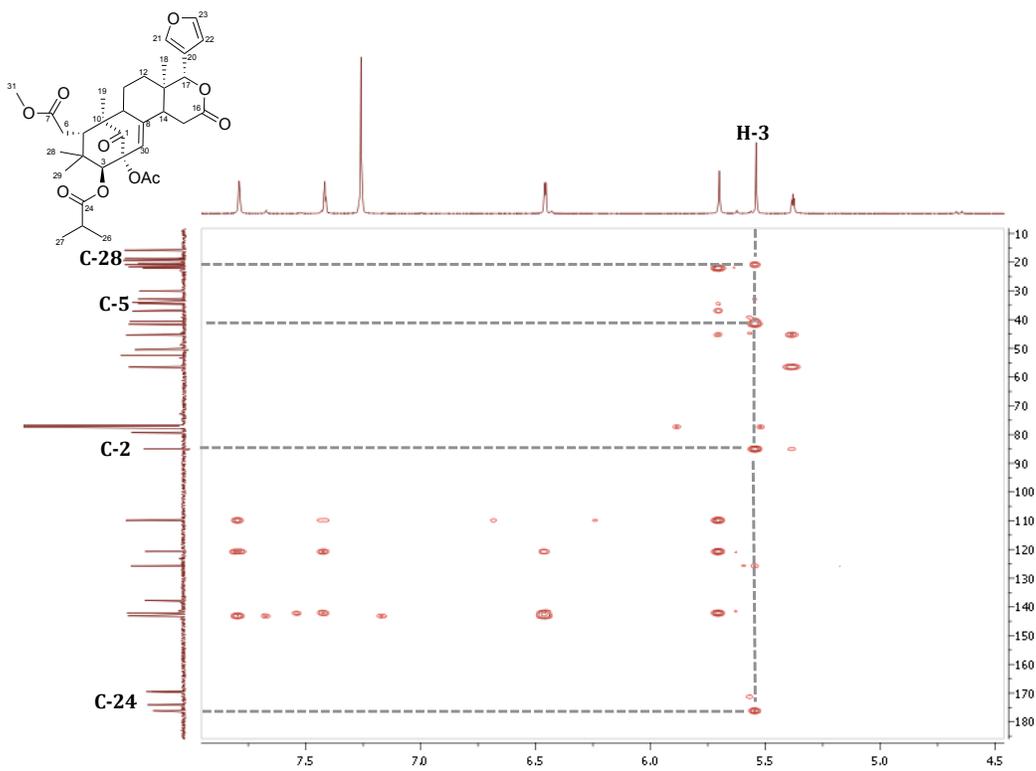


Figura 6. Correlaciones selectas del espectro bidimensional HMBC de la Humilinólida G (13).

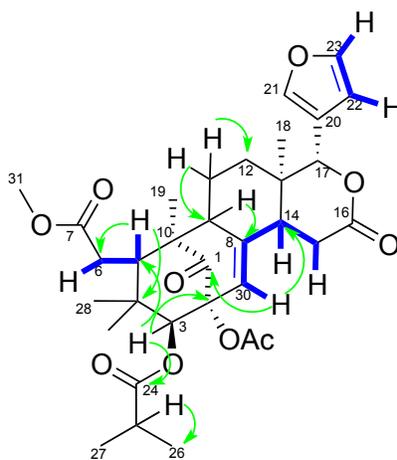


Figura 7. Principales correlaciones observadas en los experimentos HMBC (flechas verdes) y COSY (líneas sólidas azules) para la Humilinólida G (13).

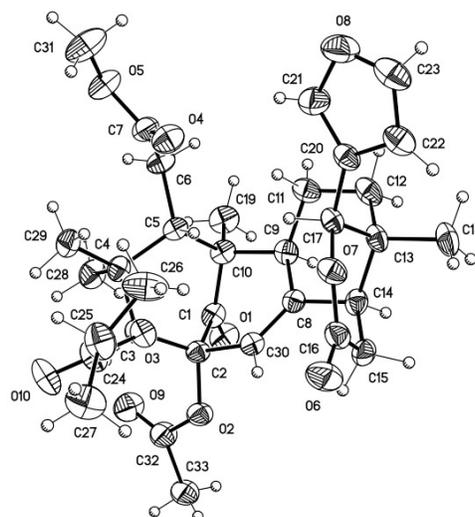


Figura 8. Estructura tridimensional de la Humilinólida G (**13**) resuelta por difracción de rayos X.

Los espectros de RMN del compuesto **15** presentan diferencias respecto a los del compuesto **13** tan sólo en las señales atribuibles a C-8 y H-8/C-30. Así, las señales de la olefina 8(30)-trisustituída fueron reemplazadas por las de una funcionalidad epóxido (δ_c 62.9 y 65.4; δ_H 3.66) (**Figura 8**).

La localización del residuo isobutilo en C-3 y la del acetilo en C-2 del núcleo metil-2,3-dihidroxi-1-oxiomeliacato fue confirmado por el análisis del experimento HMBC; se encontraron correlaciones relevantes entre H-3 y C-24, C-27 y C-28. (**Figura 9**). Además, el espectro obtenido mediante el experimento NOESY mostró la interacción entre H-30 (δ_H 3.66)/H-12 (δ_H 2.91), y H-14 (δ_H 1.60), apoyando la orientación α del epóxido (**Figuras 10 y 11**).

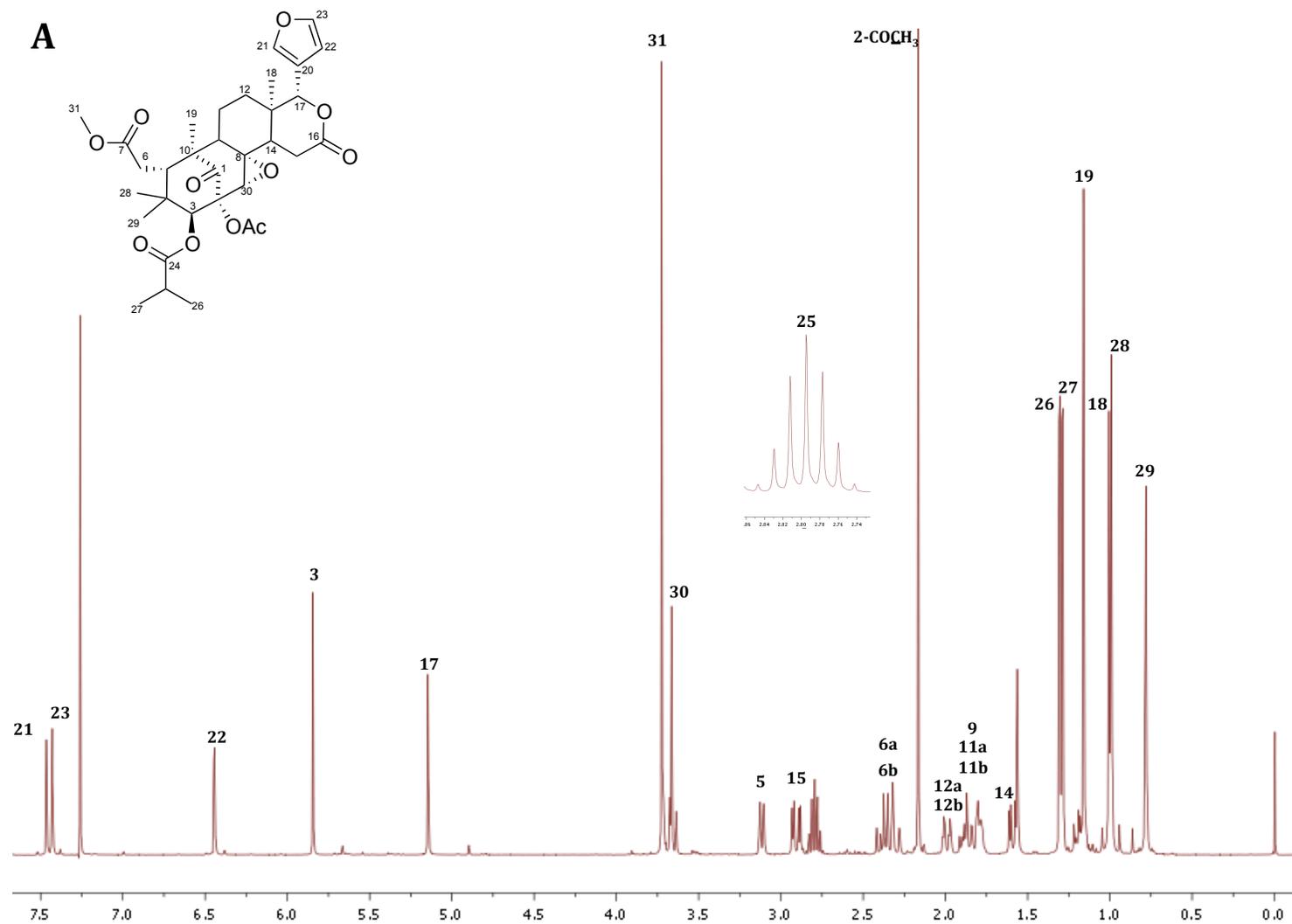


Figura 8. Panel A. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) de la Humilinólida H (15).

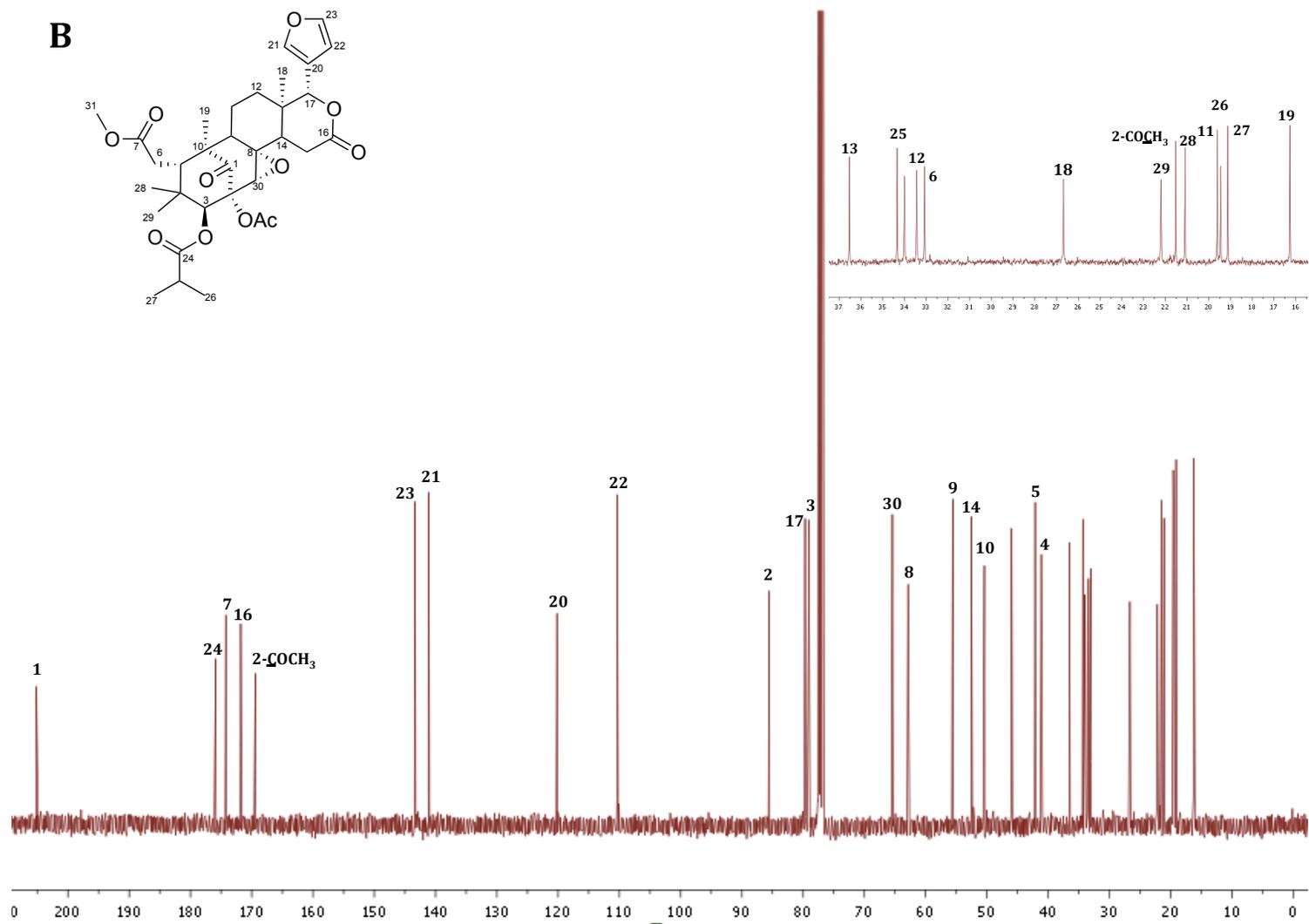


Figura 9. Espectro de (A) ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) y (B) ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) de la Humilinólida H (15).

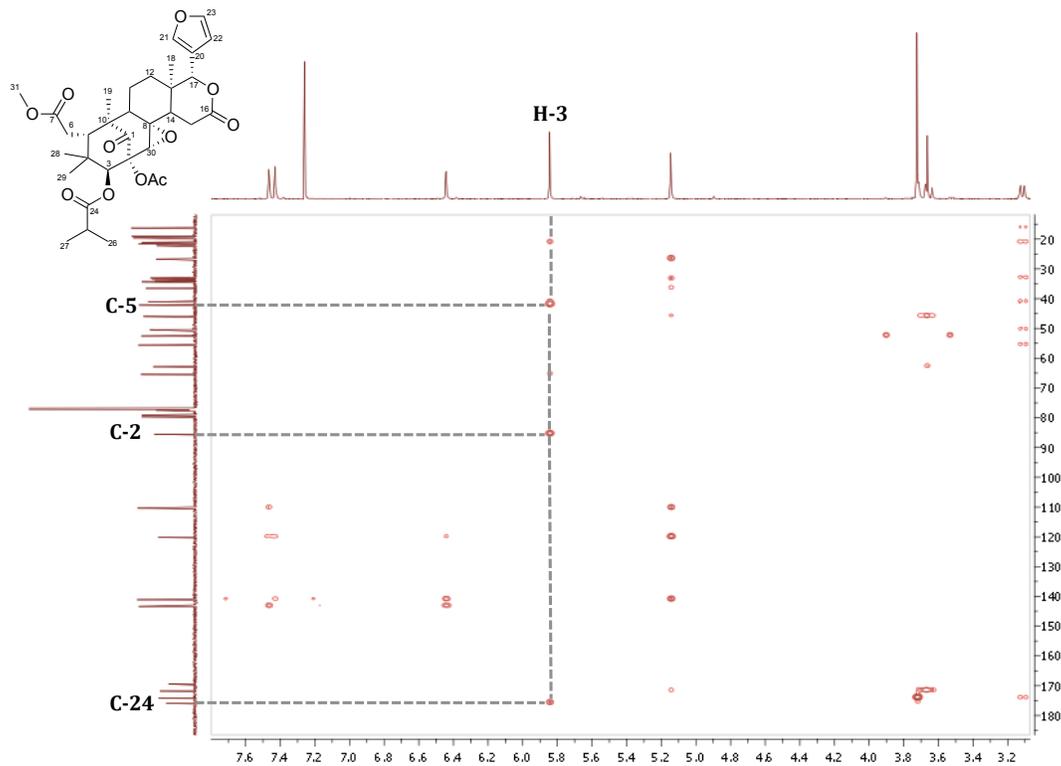


Figura 10. Correlaciones selectas del espectro bidimensional HMBC de la Humilinólida H (15).

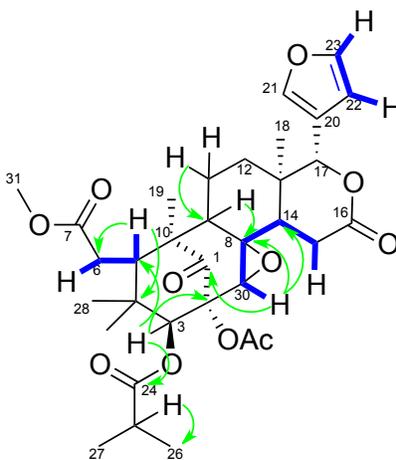


Figura 11. Principales correlaciones observadas en los experimentos HMBC (flechas verdes) y COSY (líneas sólidas azules) para la Humilinólida H (15).

La configuración absoluta de los centros estereogénicos de **13** y **15** se determinó mediante el análisis de los espectros de dicroísmo circular; en ambos casos los espectros presentaron un efecto Cotton negativo en 290 nm (**Figura 12**) al igual que las humilinólidas previamente descritas (Jimenez *et al.*, 1998). Los compuestos **13** y **15** se designaron con los nombres triviales de humilinólidas G y H, respectivamente (Ovalle-Magallanes *et al.*, 2015b).

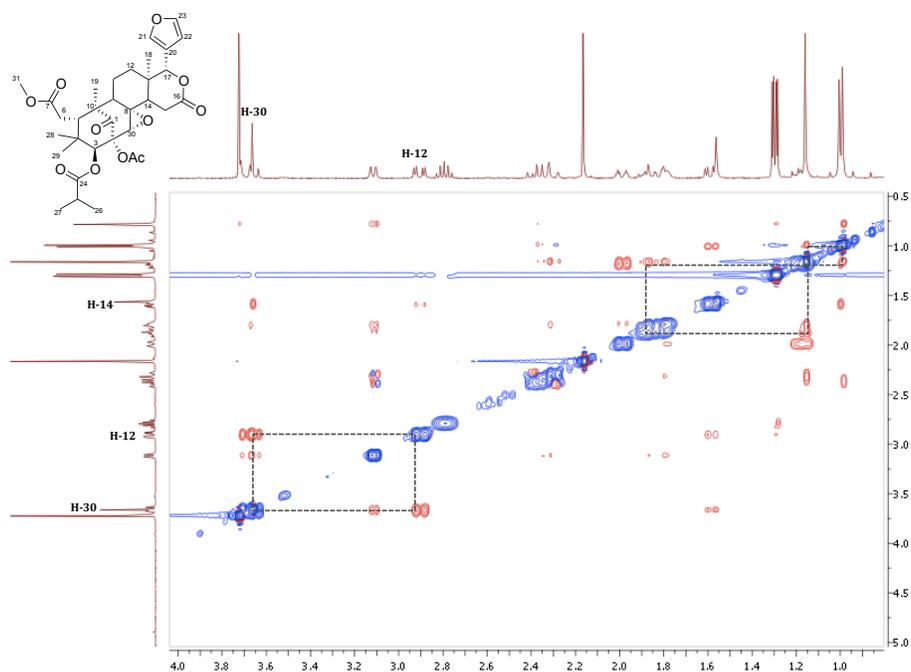


Figura 12. Principales correlaciones observadas en el espectro bidimensional NOESY de la Humilinólida H (**15**).

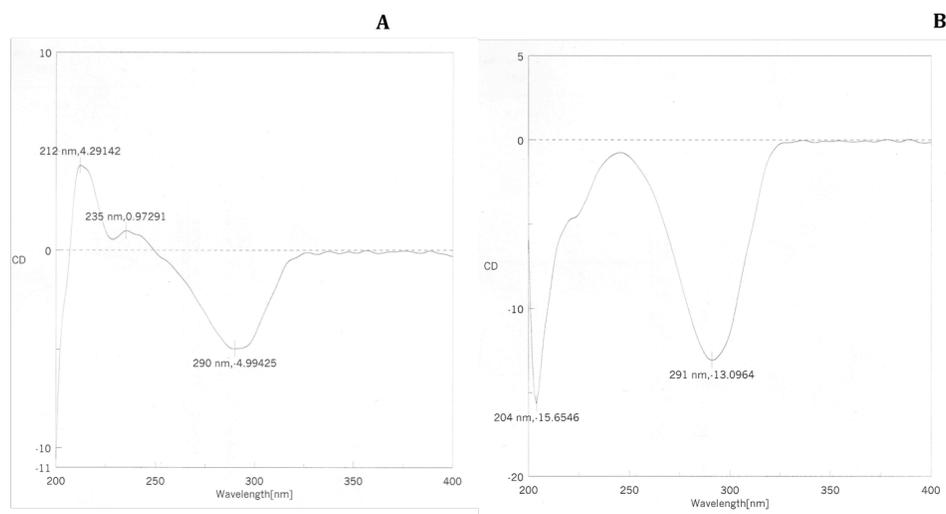


Figura 13. Espectros de dicroísmo circular de las humilinólidas G (panel A) (**13**) y H (Panel B) (**15**).

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN de las humilínolidas G y H (compuestos **13** y **15**) en CDCl₃ [¹H (400 MHz), ¹³C (100 MHz)].

Posición	13		15	
	δ _C , tipo	δ _H (J en Hz)	δ _C , tipo	δ _H (J en Hz)
1	208.1, C		205.1, C	
2	85.1, C		85.5, C	
3	79.3, CH	5.54 (s)	79.7, CH	5.84 (s)
4	40.5, C		41.1, C	
5	41.6, CH	3.32 (dd, 9.73,1.86)	42.1, CH	3.11 (m)
6a	32.8, CH ₂	2.41 (dd, 17.03,9.77)	33.1, CH ₂	2.39 (dd, 16.82, 9.66)
6b		2.32 (m) ^a		2.31 (m) ^a
7	174.0, C		174.2, C	
8	137.7, C		62.9, C	
9	56.5, CH	2.27 (m)	55.6, CH	1.90 (m) ^a
10	50.5, C		50.4, C	
11a	20.5, CH ₂	2.08 (m)	19.6, CH ₂	1.90 (m) ^a
11b		1.68 (m)		1.82 (m)
12a	34.4, CH ₂	1.68 (m)	33.4, CH ₂	2.0 (m)
12b		1.42 (ddd, 17.18, 7.85, 3.34)		1.2 (m)
13	37.0, C		36.5, C	
14	45.3, CH	2.27 (m) ^a	45.9, CH	1.60 (m)
15	30.0, CH ₂	2.91 (dd, 5.71, 3.93)	33.4, CH ₂	2.91 (m)
16	169.5, C		171.8, C	
17	77.4, CH	5.70 (s)	79.1, CH	5.15 (s)
18	22.1, CH ₃	1.11 (s)	26.7, CH ₃	1.01 (s)
19	15.8, CH ₃	1.22 (s)	16.3, CH ₃	1.16 (s)
20	120.7, C		120.2, C	
21	142.1, CH	7.79 (m)	141.1, CH	7.46 (m)
22	109.8, CH	6.46 (dd, 1.86, 0.80)	110.3, CH	6.44 (dd, 1.67, 0.63)
23	143.1, CH	7.42 (t, 1.72)	143.3, CH	7.43 (t, 1.68)
24	176.1, C		175.8, C	
25	34.1, CH	2.65 (m)	34.3, CH	2.80 (m)
26	18.7, CH ₃	1.18 (d, 1.74)	19.6, CH ₃	1.31(d, 2.85)
27	19.3, CH ₃	1.17 (d, 1.58)	19.4, CH ₃	1.29 (d, 2.73)
28	20.9, CH ₃	0.98 (s)	21.1, CH ₃	0.99 (s)
29	22.2, CH ₃	0.75 (s)	22.2, CH ₃	0.78 (s)
30	125.7, CH	5.38 (t, 2.06)	65.4, CH	3.66 (s)
31	52.4, CH ₃	3.70 (s)	52.5, CH ₃	3.72 (s)
2-COCH ₃	169.3, C		169.4, C	
2-COCH ₃	21.7, CH ₃	2.12 (s)	21.5, CH ₃	2.17 (s)

^a Señal traslapada parcialmente

5.1.2 Desarrollo de un método por CLAE para la cuantificación de las mexicanólidas de *S. humilis*

El perfil cromatográfico de una fracción orgánica (acetato de etilo) obtenida por reparto de la decocción de las semillas de *S. humilis* se generó por CLAE. El cromatograma característico (**Figura 13**) obtenido para este preparado es el resultado de diferentes ensayos utilizando varias fases móviles y estacionarias. La mejor resolución de los componentes del extracto acuoso se obtuvo en una columna de fase reversa, empleando un sistema de elución gradiente lineal ternario constituido por metanol, acetonitrilo y agua. La fracción del extracto acuoso analizado está constituida principalmente por las mexicanólidas, que se seleccionaron entonces como los compuestos marcadores activos de la especie.

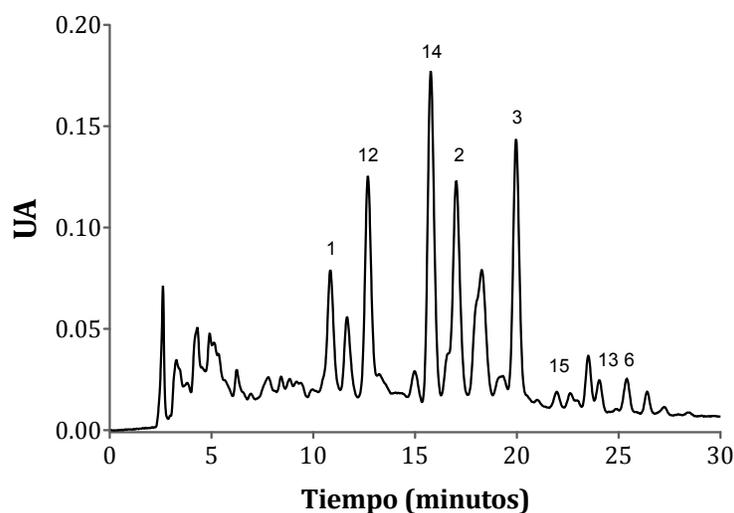


Figura 14. Perfil cromatográfico por CLAE de la decocción de *S. humilis* con las mexicanólidas **1–3, 6, 12–15** identificadas. Columna Synergi™ 4 μm Hydro-RP 80 \AA (150 \times 4.6 mm, d.i. 4 μm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (A) (30:70) y CH_3CN (B) de 45% B (0 min), a 55% B (10 min), a 100% B (30 min). Tipo de elución gradiente lineal. $\lambda = 208.7$ nm. Velocidad de flujo 0.4 ml/min. Volumen de inyección 20 μl . Mexicanólida **3** en $t_R = 19.997$ min.

La identificación de los picos del cromatograma se realizó mediante la coelución de soluciones de 0.5 mg/ml de los compuestos aislados en la presente investigación (**1–3, 6, 12–15**) con una solución de 1.0 mg/ml de la fracción orgánica. Se seleccionó a la mexicanólida **3** como compuesto de referencia para cuantificar a las mexicanólidas identificadas, ello porque

la respuesta analítica de todas las mexicanólidas fue similar, es decir, presentaron el mismo máximo de absorción en el rango de longitudes de onda analizadas (205-360 nm).

Se determinaron varios parámetros estadísticos para validar el método de cuantificación desarrollado, los cuales se presentan en la **Tabla 2**. En primera instancia, la selectividad se comprobó porque la respuesta analítica registrada se debía únicamente a la presencia de las mexicanólidas de *S. humilis* en la muestra analizada. Tal aseveración se sustenta en que los máximos de absorción de los compuestos fueron iguales cuando se analizaron como estándares puros (1 mg/ml) y cuando se coeluyeron con el extracto de *S. humilis* (0.5 g/ml) (**Anexo 4, Figura A1**).

Tabla 2. Parámetros de regresión, límites de detección, cuantificación, precisión y exactitud para la mexicanólida metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**) en *S. humilis*.

Parámetro	Método por CLAE, mexicanólida 3
Coefficiente de determinación, R ² (n = 6)	0.9988
Ecuación de regresión	85813x + 69353
LD, $\mu\text{g ml}^{-1}$ (n = 15) ^a	0.46
LC, $\mu\text{g ml}^{-1}$ (n = 15) ^b	1.39
Ecuación de regresión de los experimentos de recobro	1.0127x - 0.8275
Coefficiente de determinación del recobro, R ² (n = 3)	0.9998
Coefficiente de variación de la regresión de recobro	0.07
Porcentaje de recobro promedio	98.2 - 101.9
Repetibilidad, porcentaje de desviación estándar relativa (n = 11)	1.0

^aLD: Límite de detección, $3.3 \times$ (desviación estándar de la respuesta/pendiente de la curva de calibración).

^bLC: Límite de cuantificación, $10 \times$ (desviación estándar de la respuesta/pendiente de la curva de calibración).

La linealidad del sistema de cuantificación se determinó por un análisis de regresión simple, al demostrarse que la respuesta analítica era directamente proporcional a la concentración de las mexicanólidas en el extracto de *S. humilis*. La linealidad y exactitud del método se obtuvieron mediante la adición de soluciones de **3** en el rango entre 25 $\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$ a la matriz de trabajo; de estos experimentos se calcularon el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro promedio, los cuales estuvieron dentro de los rangos

aceptados por las guías consultadas (98–102% y < 2%, respectivamente). La precisión del método se midió en términos de repetibilidad mediante el análisis de réplicas independientes de una solución estándar de **3**. De esta manera, el método diseñado fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones ensayadas.

La cuantificación de las mexicanólidas identificadas se logró tras la interpolación de los valores de las áreas bajo la curva de cada pico en la ecuación de regresión del compuesto **3**. El contenido total de mexicanólidas en las muestras analizadas, equivalentes a mexicanólida **3**, fue de 330.19 ± 40.4 mg por gramo de semilla de *S. humilis* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultado de la cuantificación por CLAE de las mexicanólidas de *S. humilis*.^a

Mexicanólida	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	mg/g de semilla
1	9.39 ± 1.8	28.18 ± 9.7
2	20.17 ± 2.4	59.85 ± 15.4
3	24.07 ± 3.4	71.52 ± 20.2
6	2.39 ± 0.5	7.07 ± 2.4
12	19.96 ± 3.1	59.63 ± 18.9
13	0.89 ± 0.4	2.60 ± 1.3
14	33.46 ± 6.5	99.42 ± 32.5
15	0.67 ± 0.3	1.92 ± 0.7
Total	111.0 ± 17.4	330.19 ± 40.4

^a Los datos están expresados como equivalentes de mexicanólida **3**, y son el promedio \pm desviación estándar de seis determinaciones.

5.2 Evaluación farmacológica: seguridad y eficacia antidiabética de *S. humilis*

El reconocimiento de la relevancia de las plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes ha conducido al desarrollo de metodologías que sustentan su seguridad y eficacia como agentes hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicos. Las pruebas empleadas en la evaluación farmacológica preclínica de estos recursos terapéuticos con frecuencia se basan en los modelos usados en el diseño de fármacos alopáticos; por ende, las experimentaciones *in vivo* son el punto de partida en la validación científica de la inocuidad y de los efectos farmacológicos atribuidos de forma empírica a las plantas medicinales. En este apartado se presentan y discuten los resultados de las evaluaciones de *S. humilis* en modelos animales selectos, empleando ratones normoglucémicos y/o hiper glucémicos, y/o ratas con síndrome metabólico.

5.2.1 Seguridad: Toxicidad aguda en ratones

Con la finalidad de establecer las dosis letales medias (DL_{50}) de la droga cruda de *S. humilis* (semillas) y de un extracto acuoso de la misma (decocción, DSH) en ratones, se empleó el protocolo descrito por Lorke. El uso de dosis logarítmicas de los fitopreparados y de pocas unidades de experimentación, confieren a este modelo características que lo hacen idóneo para analizar en un periodo reducido de tiempo y con el número mínimo de animales, la toxicidad aguda de una sustancia (Lorke, 1983). Los resultados obtenidos en el ensayo, presentados en la **Tabla 4**, permitieron estimar que las DL_{50} de los preparados eran mayores a 5 g/kg, ya que a las dosis evaluadas no se observaron ni cambios conductuales relacionados a efectos tóxicos agudos ni muertes; además, en los catorce días posteriores a la administración de los preparados no hubo cambios en el peso, mortalidad o daños macroscópicos en los principales órganos analizados. Las evidencias recabadas sugirieron que ambos fitopreparados son inocuos en el modelo y dosis evaluados. La seguridad demostrada para el extracto acuoso de *S. humilis* dio pauta a la elección del rango de dosis a utilizar en los experimentos de potencial antidiabético.

Tabla 4. Toxicidad aguda de la droga cruda y de la decocción de *S. humilis* (DSH).

Droga cruda				DSH			
Etapa 1		Etapa 2		Etapa 1		Etapa 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad						
10	0/3	1500	0/3	10	0/3	1500	0/3
100	0/3	2600	0/3	100	0/3	2600	0/3
1000	0/3	5000	0/3	1000	0/3	5000	0/3

5.2.2 Eficacia antidiabética en ratones

Los medicamentos hipoglucemiantes para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 se valen de la modificación de los mecanismos homeostáticos de la glucosa, principalmente de los relacionados con la secreción de insulina y con la sensibilización de los órganos periféricos a la acción de esta hormona, para contrarrestar el estado de hiperglucemia crónica característica de este padecimiento. Como premisa inicial se considera que las plantas medicinales pueden actuar del mismo modo en que lo hacen los medicamentos

hipoglucemiantes alopáticos. Por ello, la eficacia de la decocción de *S. humilis* y de tres mexicanólidas selectas (acetato de 2-hidroxi-6-desoxi-destigloilswietenina, **12**; humilina B, **1**, y metil-2-hidroxi-3-tigloiloximeliac-8(30)-enato, **3**) para reducir los niveles de glucemia en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos se evaluó en dos modelos farmacológicos ampliamente descritos en la literatura: hipoglucemiante agudo, y tolerancia oral a carbohidratos (glucosa y sacarosa) (Brown *et al.*, 2011; Fröde y Medeiros, 2008; Tahara *et al.*, 2008). Estas pruebas fueron seleccionadas considerando que proporcionan información fundamental sobre el potencial hipoglucemiante y/o antihiperglucémico de preparados a base plantas y de sus compuestos puros bajo distintas condiciones experimentales.

5.2.2.1 Efecto hipoglucemiante agudo

El modelo hipoglucemiante agudo empleado evaluó la capacidad de la decocción de *S. humilis* (DSH), forma tradicional de consumo, de un extracto hexánico (HSH), y de dos de sus mexicanólidas (**12** y **3**) para reducir la glucemia en condiciones de ayuno controladas; se utilizó a la glibenclamida como fármaco hipoglucemiante de referencia. Las gráficas de área bajo la curva de este modelo representan la concentración de glucemia acumulada en el tiempo de experimentación.

Los resultados, presentados en la **Figura 14**, muestran que cuando se administró a ratones normoglucémicos, sólo la dosis de 100 mg/kg fue capaz de reducir la glucemia de forma significativa (**Panel A**; $p < 0.001$). La capacidad hipoglucemiante de esta dosis se presentó a todos los tiempos de medición (reducción de glucemia de -24,23 a -46.47%; **Anexo 5, Figura A1**). Por otra parte, la evaluación en animales hiperglucémicos demostró que las dosis de 31.6 y 100 mg/kg tuvieron efectos hipoglucemiantes significativos durante todo el experimento (**Panel B**; $p < 0.01$). Si bien la dosis de 316 mg/kg redujo la glucemia desde las 1.5 y hasta las 7 h del experimento (reducción de glucemia de -47.76 a -42.44%; **Anexo 5, Figura A1**), el efecto hipoglucemiante global no fue estadísticamente significativo, pero sí se observó una clara tendencia en la reducción de la glucemia en el transcurso de la evaluación.

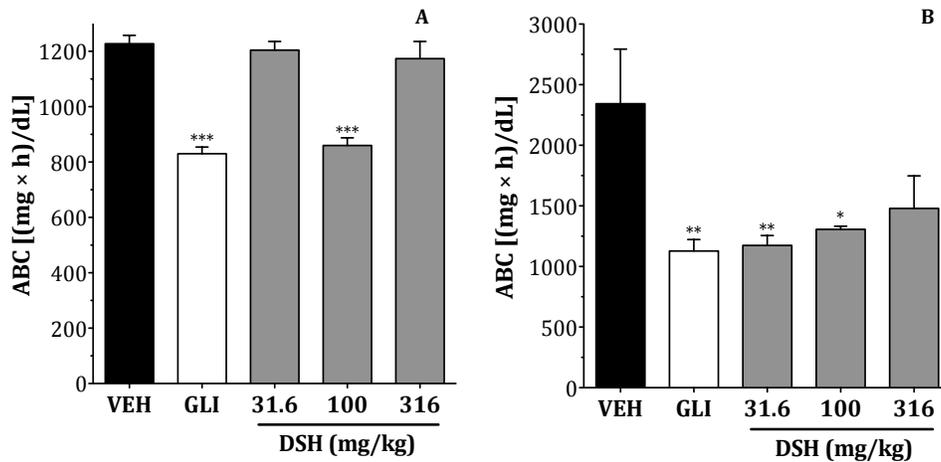


Figura 15. Efecto hipoglucemiante agudo de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI (glibenclamida, 15 mg/kg). Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

En el caso de HSH, sólo las dosis de 100 mg/kg, y de 31.6 mg/kg demostraron un efecto hipoglucemiante significativo en animales normoglucémicos e hiperglucémicos, respectivamente ($p < 0.05$) (Figura 15). En el primer tipo de animales, HSH redujo la glucemia a las 1.5, 3 y 9 h del experimento (-34.84, -41.57 y -44.50%); en el segundo, a las 5, 7 y 9 h (-39.12, -48.79 y -53.3%) (Anexo 5, Figura A2).

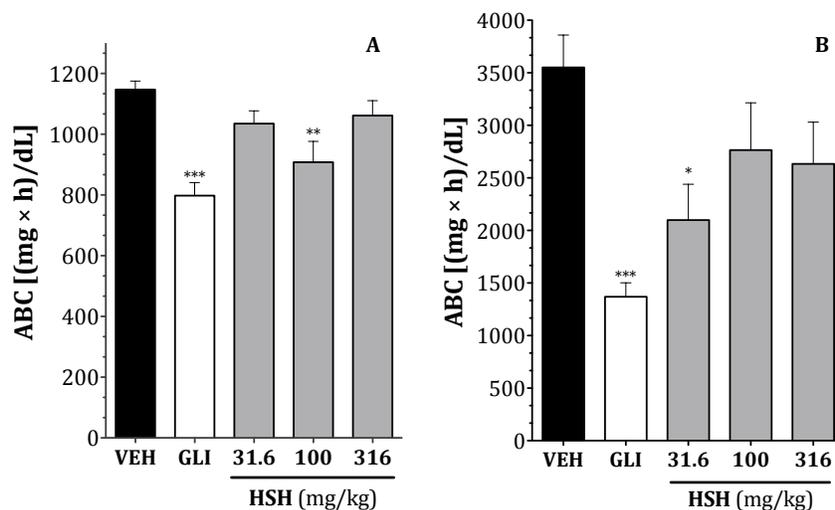


Figura 16. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto hexánico de *S. humilis* (HSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

Posteriormente, se evaluaron las mexicanólidas **12** y **3** (Figuras 16 y Anexo 5, Figuras A3 y A4). Los resultados obtenidos indicaron que en ratones normoglucémicos (Panel A), el compuesto **12** redujo la glucemia durante todo el experimento a las dosis de 3.16 y 10 mg/kg; el compuesto **3** presentó este mismo efecto a las dosis de 3.16 y 31.6 mg/kg ($p < 0.05$). En ratones hiperglucémicos (Panel B), el compuesto **12** sólo tuvo efecto hipoglucemiante significativo a la dosis más alta evaluada (31.6 mg/kg, $p < 0.05$), mientras que el **3** fue eficaz únicamente a la dosis de 10 mg/kg ($p < 0.05$).

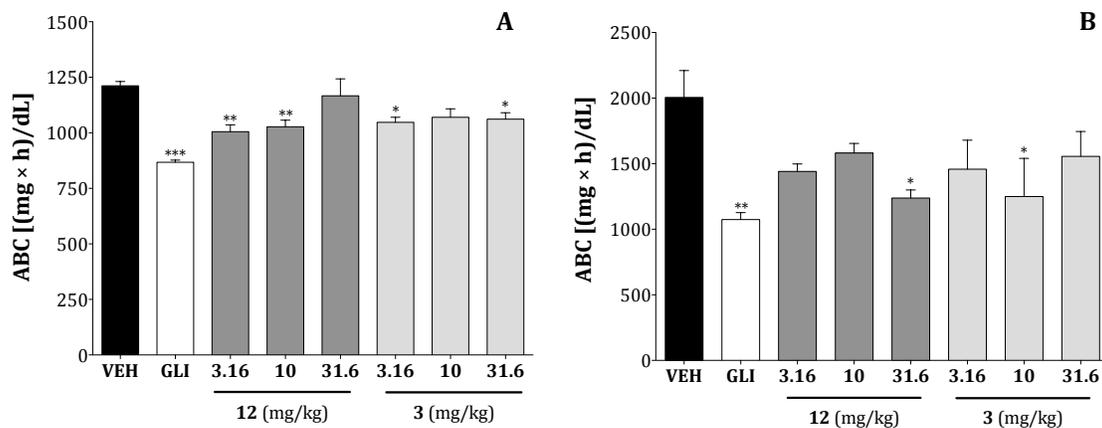


Figura 17. Efecto hipoglucemiante agudo de las mexicanólidas **12** y **3** de *S. humilis* en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada barra representa el promedio del área bajo la curva \pm EEM de los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett comparado con el grupo vehículo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos en esta prueba para los dos preparados de *S. humilis* y para las mexicanólidas **12** y **3**, dan pauta a varias propuestas. Primero, las diferencias de actividad observadas entre el extracto acuoso y el hexánico permiten establecer que la eficacia hipoglucemiante de la especie se debe principalmente a las mexicanólidas. Como se describe en la sección 4.1.2, estos metabolitos constituyen un tercio del extracto acuoso; en cambio el extracto hexánico contiene principalmente ácidos grasos de acuerdo al estudio de Pérez-Rubio y colaboradores (2012). Segundo, el efecto hipoglucemiante de las mexicanólidas **12** y **3** fue menor que el observado para el extracto acuoso, lo cual sugiere que la actividad hipoglucemiante de este preparado es el resultado de la acción de las mexicanólidas y otros

productos por determinar. Tercero, los mecanismos detrás de la eficacia hipoglucemiante de *S. humilis* pueden estar relacionados con la secreción de insulina (en particular, en animales normoglucémicos), o bien, con la reducción de la liberación de glucosa hepática. La acción conjunta de estos mecanismos regula la glucemia en los periodos de ayuno (Bone y Mills, 2013).

5.2.2.2 Efecto antihiperoglucémico agudo: tolerancia a la glucosa y a la sacarosa orales

Las pruebas de tolerancia a la glucosa (PTGO) y a la sacarosa orales (PTSO) sirvieron para evaluar el potencial antihiperoglucémico de la decocción de *S. humilis* y las mexicanólicas **12**, **1** y **3**, empleando metformina y acarbosa como fármacos de referencia, respectivamente. Los cursos temporales construidos para estos modelos representan las variaciones de glucemia de cada grupo experimental.

Los resultados obtenidos en la PTGO para el extracto acuoso de *S. humilis* (DSH) indicaron que la administración de la dosis de 316 mg/kg a animales normoglucémicos produjo un pico posprandial significativamente menor al del grupo tratado con vehículo (14.7% de incremento de glucemia respecto al 40.0% observado en el vehículo, $p < 0.001$) (**Figura 17, Panel A**). En ratones hiperoglucémicos, todas las dosis de DSH evaluadas fueron capaces de mermar de forma significativa el aumento en los niveles de glucosa inducidos por la carga de este monosacárido (incremento de glucemia de 39%, 100 mg/kg; de 39%, 177 mg/kg; y de 28.2 %, 316 mg/kg; $p < 0.001$) (**Figura 17, Panel B**).

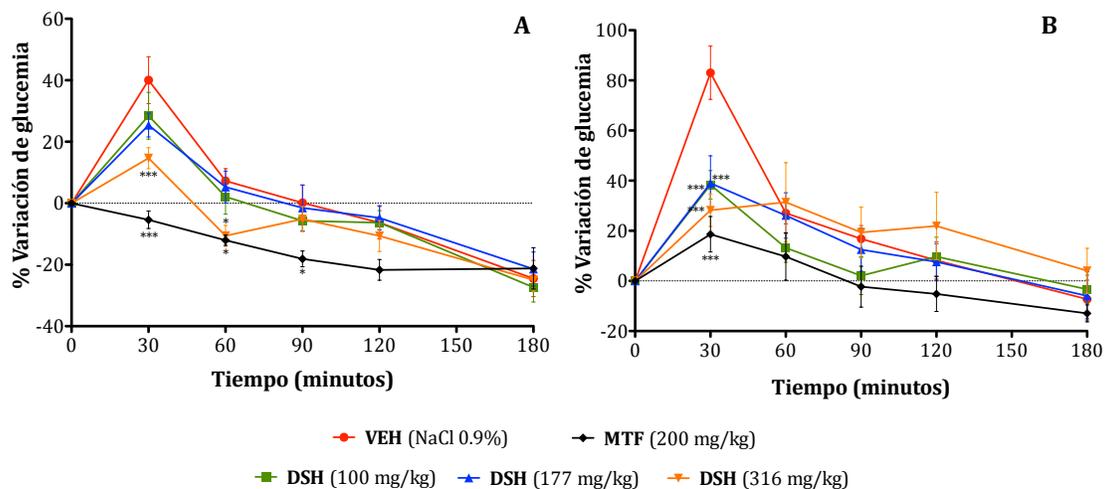


Figura 18. Prueba de tolerancia a la glucosa de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, y $***p < 0.001$.

Cuando los compuestos puros se evaluaron usando ratones normoglucémicos en la PTGO, se observó que la mexicanólida **12** fue capaz de reducir significativamente la magnitud del pico posprandial a todas las dosis ensayadas (**Figura 18, Panel A**: aumento del 36.2%, 3.16 mg/kg; 42.2%, 10 mg/kg; y 25.8%, 31.6 mg/kg, respecto al 65.2% de incremento de glucemia del vehículo; $p < 0.001$); la mexicanólida **1** sólo tuvo efecto antihyperglucémico significativo a la dosis de 10 mg/kg (**Figura 19, Panel A**: variación del 18.3% respecto al 32.5% del vehículo; $p < 0.05$). Por su parte, la mexicanólida **3** prácticamente abolió la aparición del pico posprandial a las dosis de 10 y de 31.6 mg/kg (**Figura 20, Panel A**: aumento del 2.9%, 10 mg/kg; y 4.9%, 31.6 mg/kg, respecto al 27.4% de variación del vehículo; $p < 0.01$).

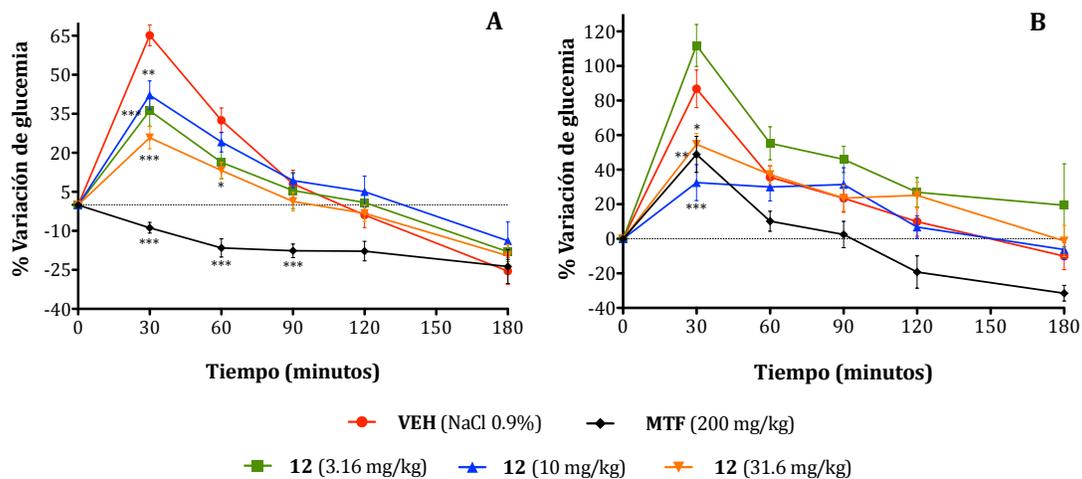


Figura 19. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida **12** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, y $***p < 0.001$.

En animales hiperglucémicos, las dosis de 10 mg/kg y 31.6 mg/kg del compuesto **12** presentaron un efecto antihyperglucémico significativo (**Figura 18, Panel B**: variación de glucemia del 32.5% y de 54.7%, respectivamente, comparado con el 86.8% de incremento de glucemia del vehículo; $p < 0.001$). De manera similar a la condición normoglucémica, sólo la dosis de 10 mg/kg de la mexicanólida **1** tuvo efecto significativo (**Figura 19, Panel B**: aumento del 37.9% respecto al 73.4% del vehículo; $p < 0.05$). Únicamente la dosis de 31.6 mg/kg de la mexicanólida **3** fue capaz de reducir la magnitud del pico posprandial en ratones hiperglucémicos (**Figura 20, Panel B**: aumento del 44.7%, comparado con el 91.7% de variación del vehículo; $p < 0.05$).

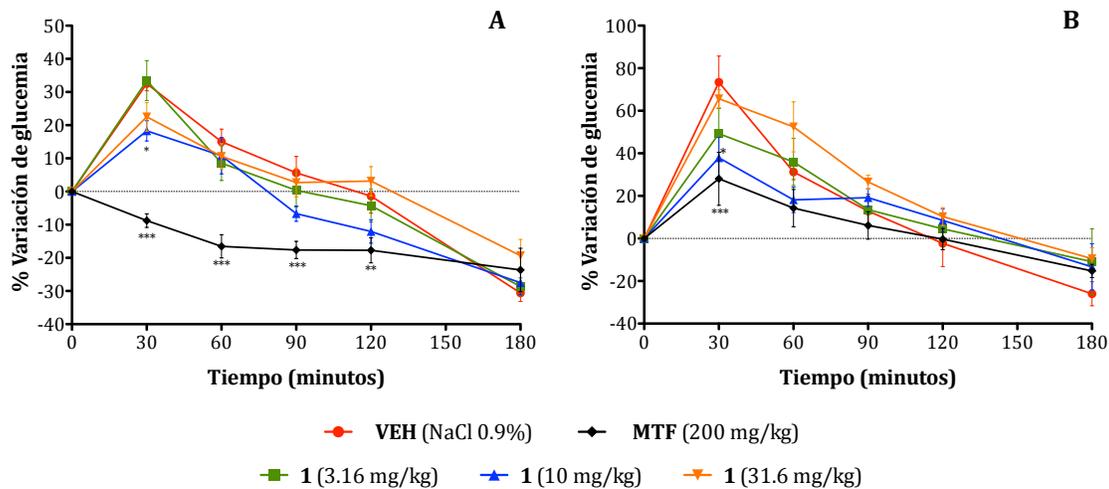


Figura 20. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida **1** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

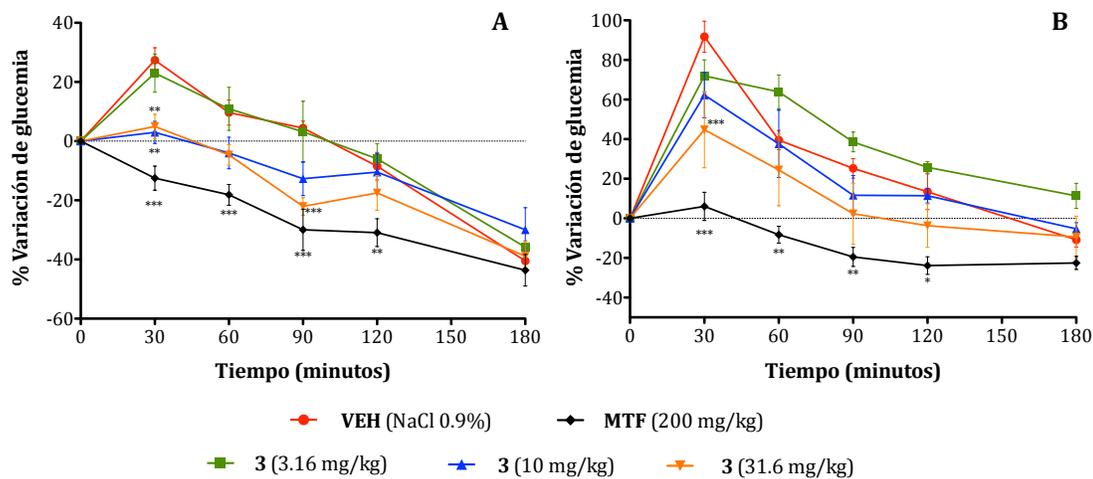


Figura 21. Prueba de tolerancia a la glucosa de la mexicanólida **3** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

El análisis de los cursos temporales construidos para las PTGO de la decocción de *S. humilis* (DSH) y de las mexicanólidas **12**, **1** y **3**, permite especular acerca de los mecanismos involucrados en la reducción del pico posprandial generado por la administración de una carga de glucosa. El efecto antihiper glucémico observado en ratones normoglu cémicos puede relacionarse en primera instancia con la secreción de insulina estimulada por glucosa; éste es el mecanismo primario de regulación ante el incremento de la glucemia posprandial. A su vez, la insulina liberada induce la captación de glucosa en tejido muscular o adiposo (Leto y Saltiel, 2012). Al reducir la glucemia posprandial en animales hiper glucémicos (que son intolerantes a la glucosa), los tetranortriterpenoides de *S. humilis* podrían estar regulando la captura de glucosa por los órganos periféricos mediante mecanismos relacionados o no con las vías metabólicas de la insulina.

Por su parte, la evaluación de la decocción de *S. humilis* (DSH) en la prueba de tolerancia a la sacarosa indicó que el preparado no poseía efecto antihiper glucémico significativo en ratones normoglu cémicos (**Figura 21, Panel A**). Sin embargo, en ratones hiper glucémicos se observó que todas las dosis de DSH evaluadas redujeron significativamente la magnitud del pico posprandial (variación del 33.1%, 100 mg/kg; del 43.4%, 177 mg/kg; y del 47.5%, 316 mg/kg, respecto al 73.4% de incremento del vehículo, $p < 0.01$) (**Figura 21, Panel B**).

Los resultados de la PTSO en ratones normoglu cémicos dan pauta a descartar que la inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales contribuye a la acción antihiper glucémica de *S. humilis*. El efecto observado en ratones hiper glucémicos podría deberse a los mecanismos descritos para las PTGO.

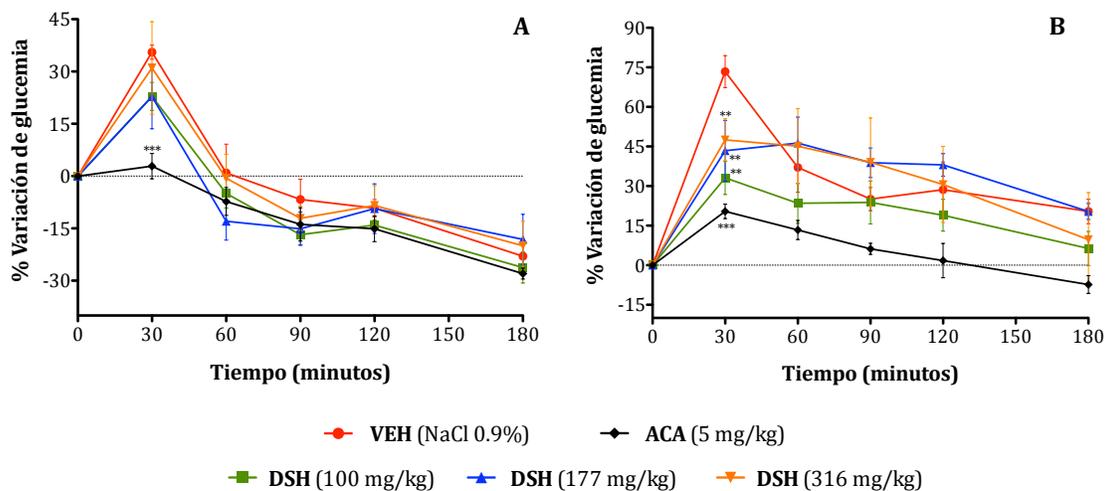


Figura 22. Prueba de tolerancia a la sacarosa de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); ACA, acarbosa (5 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

5.2.2.3 Tolerancia a la insulina intraperitoneal

La prueba de tolerancia a la insulina intraperitoneal (PTI) se usó para evaluar el potencial de la mexicanólida **12** como sensibilizadora a la acción de la insulina. Se empleó metformina como fármaco de referencia. Los cursos temporales construidos para este modelo representan la disminución de los niveles de glucosa en los tiempos de medición de cada grupo experimental. En animales normoglucémicos, cuando el compuesto **12** se dio en combinación con insulina, las dos dosis evaluadas produjeron un descenso significativo en la glucemia en todos los tiempos de medición, del mismo modo en que lo hizo la metformina administrada en conjunto con la insulina (**Figura 22, Panel A**). La reducción máxima de glucemia se obtuvo a los 45 min (-101.7 mg/dl con 10 mg/kg de **12**; -100 mg/dl con 2 mg/kg de **12**; -105.3 mg/dl con metformina + insulina; -81.3 mg/dl con insulina). En ratones hiperglucémicos, la mexicanólida **12** evaluada a la dosis de 2 mg/kg tuvo este mismo comportamiento hipoglucemiante (**Figura 22, Panel B**). El efecto máximo se midió a los 45 min (-111.7 mg/dl con 2 mg/kg de **12**; -102.4 mg/dl con metformina + insulina; -75.5 mg/dl con insulina).

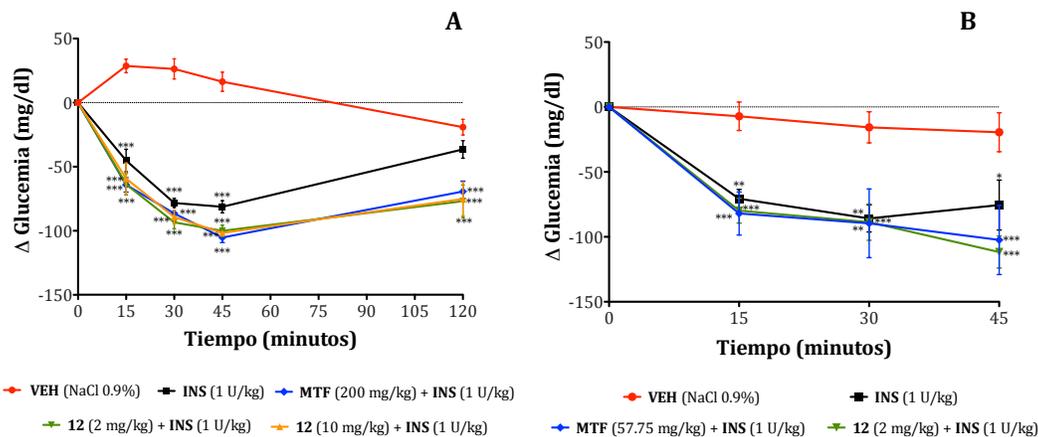


Figura 23. Prueba de tolerancia a la insulina de la mexicanólida **12** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); INS, insulina (1 U/kg); MTF, metformina (200 mg/kg o 57.75 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

Como el efecto hipoglucemiante inducido por la combinación de **12** con la insulina fue de mayor magnitud que el provocado por la hormona exógena, y con el mismo perfil que la combinación metformina-insulina, puede proponerse que la mexicanólida **12** aumenta los efectos hipoglucemiantes de la hormona mediante un mecanismo sensibilizador parecido al de la metformina.

5.2.3 Eficacia antihiper glucémica, hipoglucemiante e hipolipemiante en ratas con síndrome metabólico

El síndrome metabólico, la manifestación de hiperglucemia, obesidad, hipertensión y dislipidemias en un mismo paciente, es una de las condiciones de mayor prevalencia en nuestro país, y es una de las principales causas de diabetes mellitus tipo 2 (ENSANUT, 2012). Puesto que las semillas de *S. humilis* se usan en las prácticas médicas populares como “depurativas de la sangre”, un término coloquial aplicado a plantas capaces de reducir los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos sanguíneos (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), se evaluó la capacidad de la decocción de las semillas (DSH) para modificar estos parámetros en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa.

Luego de la administración crónica de una solución al 10% de fructosa a ratas Sprague-Dawley, los animales desarrollaron características físicas y bioquímicas que los definían como individuos con síndrome metabólico, SM-IF (Ferreira de Moura *et al.*, 2009; Wilson e Islam, 2012) (**Tabla 5**). El primer experimento realizado en estos animales fue una prueba de tolerancia a la glucosa; pudo determinarse que las ratas tratadas con fructosa eran intolerantes a la glucosa (**Figura 23, Panel A**). Posteriormente, se evaluó el potencial antihiper glucémico de la decocción de *S. humilis* (DSH) (**Figura 23, Panel B**). Las dos dosis evaluadas de DSH disminuyeron la magnitud del pico posprandial respecto al generado en el grupo vehículo (variación del 49.2% con 100 mg/kg; 61.1% con 316 mg/kg; y 87.4% del vehículo, $p < 0.01$).

La administración durante una semana de DSH a las ratas SM-IF indujo cambios metabólicos significativos en los animales (**Tabla 5**). La decocción (dosis de 100 y 316 mg/kg) disminuyó los niveles de glucemia de los animales tratados a valores similares a los de los animales de dieta chow. Además, DSH fue capaz de reducir los niveles séricos de triglicéridos y de ácido úrico, así como la grasa abdominal (100 mg/kg; $p < 0.05$).

Tabla 5. Efecto de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratas Sprague Dawley con síndrome metabólico inducido por fructosa (SM-IF) en algunos parámetros metabólicos ^a

	Dieta chow	SM-IF	DSH 100 mg/kg	DSH 316 mg/kg
Peso corporal (g)	381.7 ± 5.2	426.0 ± 2.6 ^b	421.0 ± 5.8 ^b	435.7 ± 9.8 ^b
Peso del hígado (g)	9.5 ± 1.2	12.5 ± 0.2 ^b	16.1 ± 0.5 ^b	15.8 ± 0.9 ^b
Grasa abdominal (g)	8.9 ± 1.0	14.4 ± 0.6 ^b	8.9 ± 0.9 ^c	9.6 ± 1.0 ^c
Índice de Lee	297.1 ± 2.7	311.4 ± 1.1 ^b	312.2 ± 1.4 ^b	313.7 ± 2.7 ^b
Glucosa (mmol/L)	6.7 ± 0.2	7.9 ± 0.4 ^b	6.4 ± 0.1 ^c	6.8 ± 0.3 ^c
Triglicéridos (mmol/L)	0.89 ± 0.06	1.60 ± 0.08 ^b	1.28 ± 0.12 ^c	1.5 ± 0.08
Colesterol total (mmol/L)	2.52 ± 0.03	2.48 ± 0.07	2.48 ± 0.07	2.44 ± 0.07
Ácido úrico (mmol/L)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.003 ^c	0.03 ± 0.01 ^c
Insulina (ng/ml)	0.885 ± 0.070	0.710 ± 0.032 ^b	0.681 ± 0.038	0.724 ± 0.043
Glucógeno hepático (mg glucosa /g tejido hepático)	38.26 ± 6.10	24.24 ± 2.02	47.54 ± 4.0 ^c	25.64 ± 1.97

^a Cada valor es el promedio ± EEM de seis ratas por grupo y corresponden a datos en ayuno. ^b $p < 0.05$ diferente respecto a las ratas chow. ^c $p < 0.05$ diferente respecto a las ratas SM-IF. ANADEVa seguido de una prueba *post hoc* Dunnett.

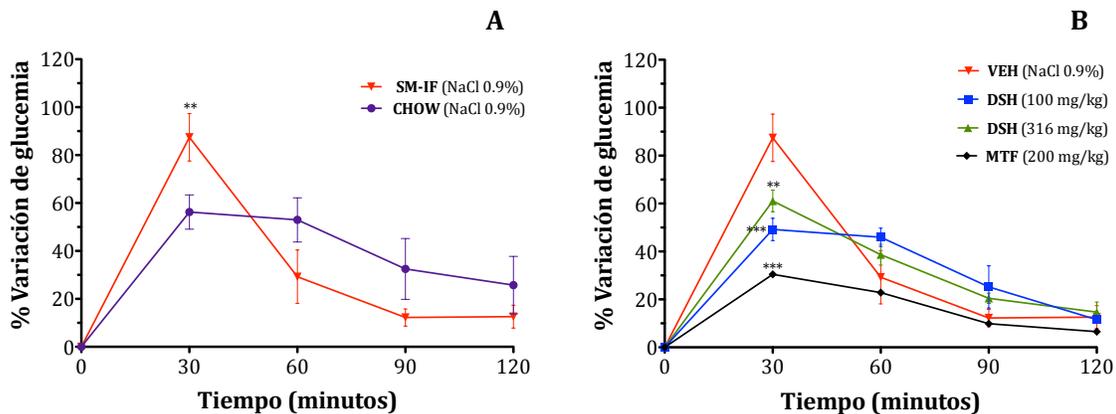


Figura 24. Panel A. Tolerancia a la glucosa oral en ratas con síndrome metabólico inducido por fructosa (SM-IF) y en ratas sin síndrome metabólico (dieta chow). Panel B. Tolerancia a la glucosa oral de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratas SM-IF. VEH, vehículo (NaCl 0.9%); MTF, metformina (200 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

Dos de los hallazgos más relevantes en este modelo fueron que la decocción no modificó los niveles séricos de insulina, pero sí produjo un incremento significativo en el glucógeno hepático (dosis de 100 mg/kg). Estos resultados y los obtenidos en los modelos en ratones, permiten sugerir que los mecanismos primarios por los cuales *S. humilis* reduce la glucemia son muy parecidos a los de la metformina, es decir, que la especie podría actuar como sensibilizadora a la acción de la insulina (Foretz *et al.*, 2014).

5.2.4 Aproximación *in vivo* al mecanismo de acción antidiabético de *S. humilis*

Con la finalidad de explicar la eficacia antidiabética de *S. humilis* se diseñaron experimentos basados en una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones hiperglucémicos. Esta selección obedeció al hecho de que las mexicanólidas fueron mejores agentes antihiperglucémicos que hipoglucemiantes (secciones 4.2.2.1 y 4.2.2.2), es decir, sus efectos parecen estar ligados a la liberación de insulina estimulada por glucosa (Henquin *et al.*, 2006; Henquin, 2000; Prentki *et al.*, 2013). En este fenómeno participan las vías clásicas de despolarización en las células β pancreáticas, así como mecanismos hormonales, adrenérgicos, colinérgicos y serotoninérgicos (Ahrén, 2000; Henquin *et al.*, 2006; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011). Entonces, se analizó la participación de los canales K_{ATP} y/o la modulación

de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} en el efecto antihiper glucémico de las mexicanólidas **12** y **3**. Las gráficas construidas para estos experimentos representan las áreas bajo la curva de los picos posprandiales cuantificados para cada tratamiento.

5.2.4.1 Activación y antagonismo

Como se describió en la sección de antecedentes, el bloqueo de los canales K_{ATP} es uno de los eventos clave para la secreción de insulina estimulada por glucosa. Para determinar si la mexicanólida **12** tenía como blanco farmacológico a estos canales, los ratones fueron pre-tratados con diazóxido, un activador que se une selectivamente a la subunidad SUR1 de los canales K_{ATP}. Cuando los canales K_{ATP} se abren por acción del diazóxido, la secreción de insulina se ve inhibida porque las membranas celulares de las células β pancreáticas se hiperpolarizan, los canales de calcio sensibles a voltaje no se abren, y por ende las concentraciones intracelulares de calcio no se incrementan (Henquin, 2000).

En la **Figura 24, Panel A** se muestra el resultado de este experimento. Aunque el efecto antihiper glucémico de **12** disminuyó, éste no fue abatido, como fue el caso de la glibenclamida. Estas observaciones permiten proponer que **12** no posee un mecanismo secretagogo de tipo sulfonilurea, y que otros mecanismos participan en su efecto farmacológico.

De acuerdo con esta propuesta, se evaluó si la modulación serotoninérgica estaba asociada a los efectos antihiper glucémicos de los compuestos **12** y **3**. La participación de la serotonina en la homeostasis de la glucosa ha sido evidenciada en múltiples reportes de la literatura; no obstante los mecanismos precisos por los cuales esta amina es capaz de modificar la secreción de insulina y la captación de glucosa no han sido establecidos (Deeney *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Pytliak *et al.*, 2011). Así por ejemplo, se ha descrito la producción pancreática de serotonina y la liberación de ésta junto con la insulina en respuesta a la hiperglucemia (Richmond *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha reportado que la supresión de la síntesis de serotonina pancreática en animales de experimentación conduce al desarrollo de diabetes, mientras que la administración de serotonina restablece la secreción de insulina (Paulmann *et al.*, 2009).

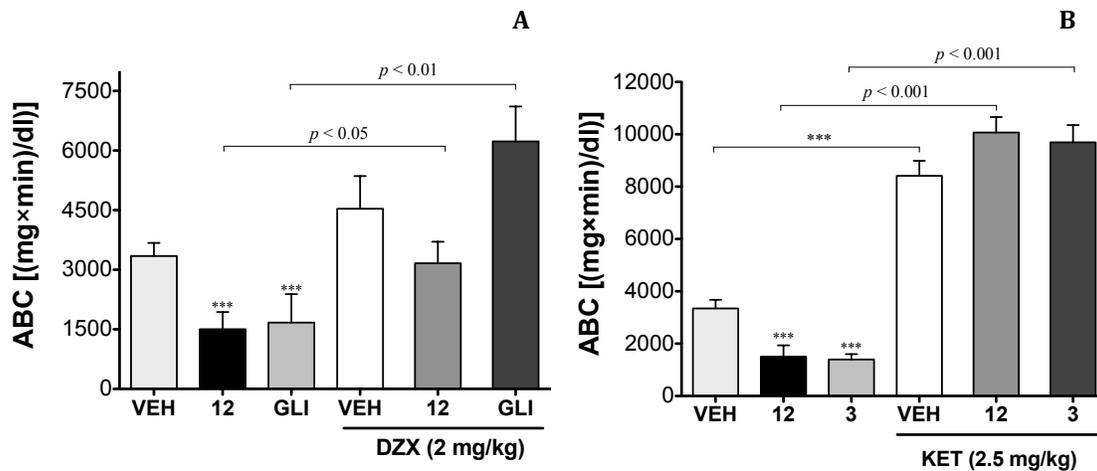


Figura 25. Establecimiento del posible mecanismo de acción de los compuestos **12** (2 mg/kg) y **3** (31.6 mg/kg). VEH, vehículo (NaCl 0.9%). Panel A: GLI, glibenclamida (9.47 mg/kg); DZX, diazóxido (2 mg/kg). Panel B: KET, ketanserina (2.5 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Tukey comparado con el grupo vehículo respectivo, *** $p < 0.001$.

En el **Panel B** de la **Figura 24** se muestran los resultados de la evaluación de la participación serotoninérgica, en la cual se pre-trató a los ratones con el antagonista 5-HT_{2A/C} ketanserina. Cuando se administró una carga de glucosa al grupo vehículo pre-tratado, se observó un aumento significativo de la glucemia en comparación con el grupo vehículo sin pre-tratamiento. Esto concuerda con lo reportado por Hahn y colaboradores (2011), quienes describieron que este antagonista reduce la secreción de insulina en roedores (Hahn *et al.*, 2011). Puesto que las mexicanólidas **12** y **3** no fueron capaces de contrarrestar la condición hiperglucémica inducida en animales pre-tratados con ketanserina, se propone que estos compuestos pueden ser agonistas de los receptores 5-HT_{2A/C}.

Debido a la distribución de los receptores 5-HT_{2A/C} tanto en el sistema nervioso central como en los tejidos periféricos, varios mecanismos pueden contribuir al efecto antihyperglucémico que exhiben los agonistas de estos receptores. En modelos *in vitro*, se determinó que la serotonina estimulaba la captación de glucosa en células musculares a través de la expresión de los receptores 5-HT_{2A} (Hajdúch *et al.*, 1999). También se ha reportado que en ratas, los receptores 5-HT_{2A} participan en la secreción de insulina, mientras que los del subtipo 2C parecen sensibilizar a los órganos periféricos a la acción de esta hormona (Guenette *et al.*, 2013). Además, en ratones, la modulación central de los receptores

5-HT_{2C} está relacionada con la reducción de la intolerancia a la glucosa y de la hiperinsulinemia en los animales de experimentación (Zhou *et al.*, 2007). Entonces, el efecto antihiper glucémico de las mexicanólidas **12** y **3** puede ser el resultado tanto de la secreción de insulina estimulada por glucosa, como del aumento de la captación de este monosacárido por los órganos periféricos.

5.2.5 Estudio de acoplamiento molecular de las mexicanólidas de *S. humilis*

Para explicar de manera teórica la propuesta de que las mexicanólidas **12** y **3** actúan como agonistas de los receptores 5-HT_{2C}, se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los ocho compuestos aislados en la presente investigación con un receptor 5-HT_{2C} construido mediante modelado por homología, usando la estructura cristalográfica del receptor 5-HT_{2B} en complejo con ergotamina como base (Protein Data Bank, RCSB; código 4NC3). Ambos receptores poseen aproximadamente 80% de identidad en su secuencia transmembranal (TM) (Figura 25).

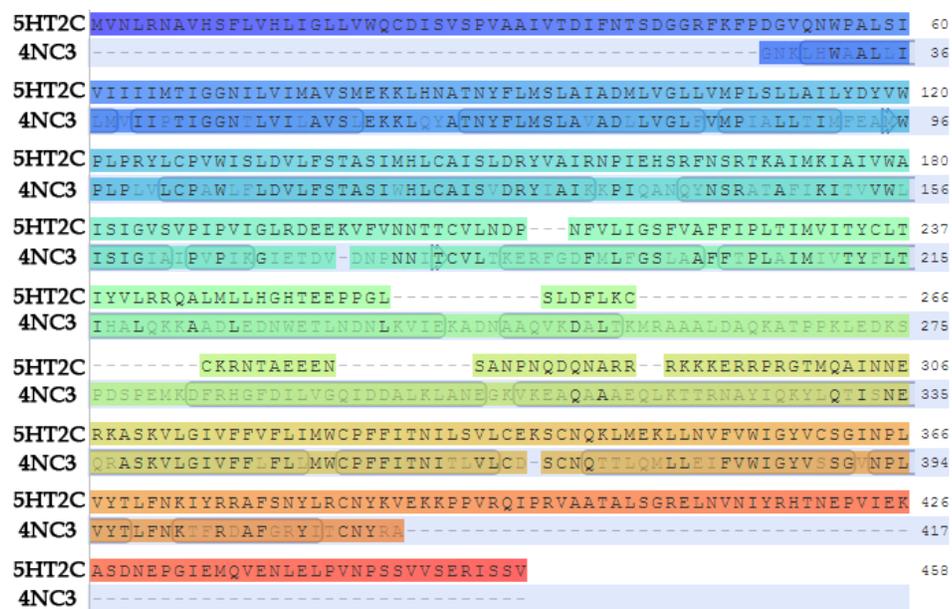


Figura 26. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del receptor cristalizado 5-HT_{2B} (código PDB 4NC3) y del receptor 5-HT_{2C} (código UniProtKB P28335) usando la herramienta Template Alignment Tool del servidor Swiss-Model.

La comparación de los diagramas de Ramachandran (Carrascoza *et al.*, 2014) de los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (**Figura 26** y **Anexo 6, Figura A1-A2**) mostró que el modelo tridimensional del receptor 5-HT_{2C} generado por homología poseía 92.8% de sus aminoácidos en regiones favorecidas (respecto al 96.4% del 5-HT_{2B}), mientras que 98.5% de los mismos se ubicaron en regiones permitidas (respecto al 100% del 5-HT_{2B}). Las diferencias obtenidas se debieron a los residuos Phe46, Asp117, Ile192, Lys199, Asp211, Lys388 e Ile415, ubicados todos ellos en las asas del receptor construido (**Anexo 6, Figura A3**).

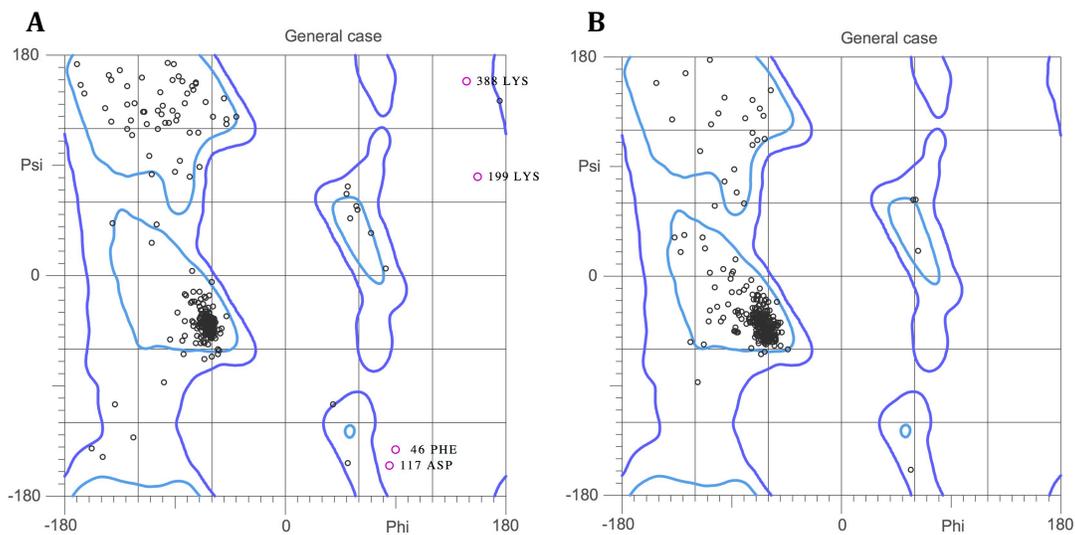


Figura 27. Diagramas de Ramachandran (casos generales) del receptor 5-HT_{2C} (Panel A) y del receptor 5-HT_{2B} (Panel B) obtenidos usando la herramienta MolProbity.

En reportes previos se emplearon como modelos para la construcción del receptor 5-HT_{2C} las estructuras cristalográficas de los receptores β_2 -adrenérgico y rodopsina bovino, en los cuales se identificaron los principales aminoácidos involucrados en las interacciones ligando-receptor 5-HT_{2C} (Córdova-Sintjago *et al.*, 2014, 2012; Lu *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2007).

La validación del modelo tridimensional construido para el receptor 5-HT_{2C} se realizó mediante los análisis de acoplamiento del agonista endógeno serotonina y del antagonista 5-HT_{2A/C} ketanserina con el receptor generado (**Figura 27, Paneles A-C**). Éstos permitieron establecer que los sitios teóricos de unión para ambos compuestos coincidían en gran medida con lo reportado en la literatura (Córdova-Sintjago *et al.*, 2012, 2014; Galeazzi *et al.*, 2014). Los principales aminoácidos en el sitio ortostérico fueron los residuos aromáticos Trp324 y

Phe328, los cuales están altamente conservados entre los receptores 5-HT_{2A/C} (Córdova-Sintjago *et al.*, 2014). Además, este sitio de unión de la serotonina incluía los residuos de los aminoácidos Asp134, Val135, y Ser138; éste último formó un puente de hidrógeno con la serotonina (distancia = 2.01 Å) (**Figura 27, Panel B**).

Por su parte, la ketanserina interactuó con el receptor modelado en un sitio similar al de la serotonina. La funcionalidad quinazolindiona se alineó de forma similar al indol de la serotonina, mientras que la porción fluorobencénica lo hizo en el sitio extendido de unión (regiones TM3 y TM5) a través de contactos hidrofóbicos. Los residuos aminoácidos más relevantes en estas interacciones fueron Trp130, Asp134, Val135, Ser138, Phe214, Phe328, Leu350 y Val354 (**Figura 27, Panel C**). La afinidad de unión calculada para la ketanserina fue de -12.1 kcal/mol, mientras que la de la serotonina fue de -7.1 kcal/mol (**Tabla 6**).

Las mexicanólidas **1-3, 6, 12-15** se unieron en un sitio común con el receptor 5-HT_{2C} construido (**Figura 27, Panel D y Figura 28**). Este sitio de interacción se ubicó en el sitio extendido de unión del receptor, muy cerca de aquél de la ketanserina, e involucró la mayoría de los residuos de aminoácido descrito para otros agonistas 5-HT_{2C} (Lu *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2007). De forma teórica, el furano presente en todos los compuestos interactuó con el aminoácido Phe327. Los residuos de éster en la posición C-3 de las mexicanólidas interaccionaron con la Tyr118, de la misma manera que la ketanserina (Galeazzi *et al.*, 2014). Otras interacciones entre las mexicanólidas y el receptor modelado detectadas fueron con los residuos Ser110, Ala113, Ile114, Trp130, Val208, Leu209, Phe327, Glu347, Leu350, Asn351 y Val 354 (**Figura 28**).

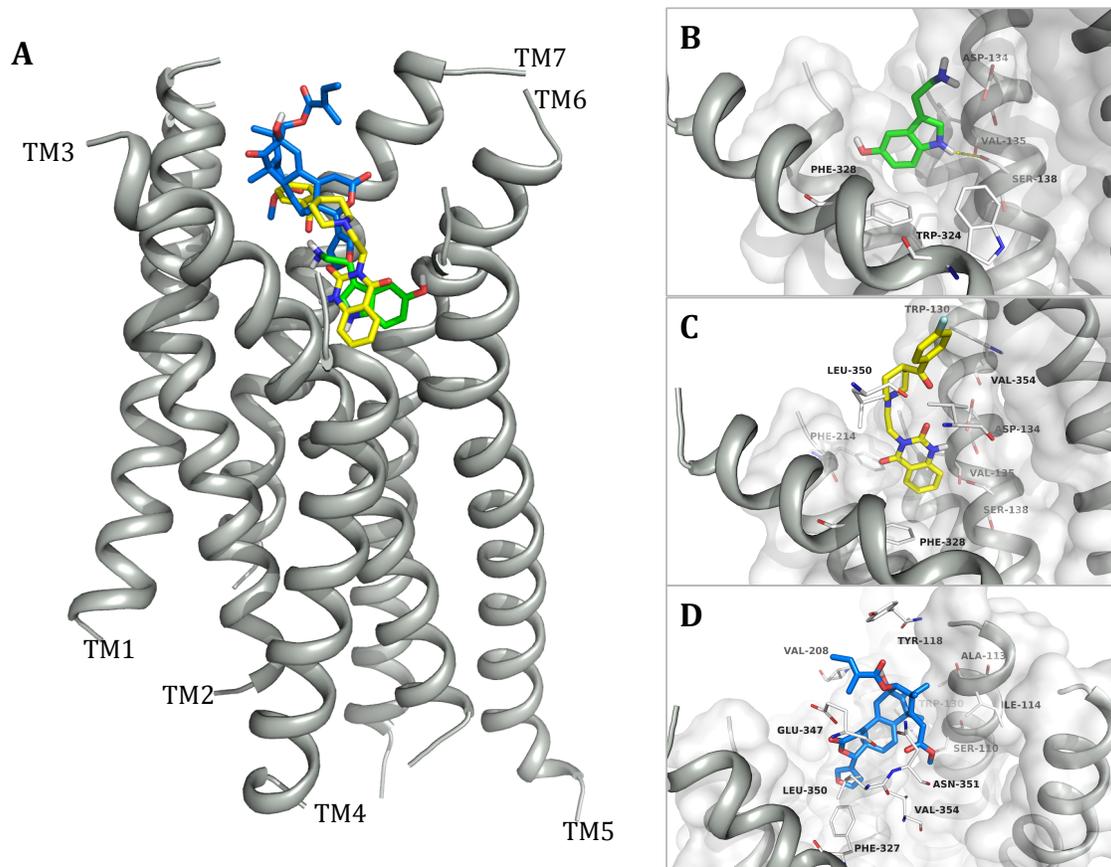


Figura 28. Modelos para el acoplamiento de la serotonina, ketanserina y las mexicanólicas (1–3, 6, 12–15). Panel A: comparación del sitio de unión de la serotonina (bastones verdes), la ketanserina (bastones amarillos) y **3** (bastones azules). Se muestran los siete dominios transmembranales del receptor (TM, cartón gris). En el panel lateral se muestran de forma detallada las interacciones de la serotonina (Panel B), la ketanserina (Panel C), y **3** (Panel D) en el sitio de unión; los bastones blancos muestran los principales residuos de interacción. Los residuos de interacción se muestran en barras blancas. Imagen preparada con PyMOL.

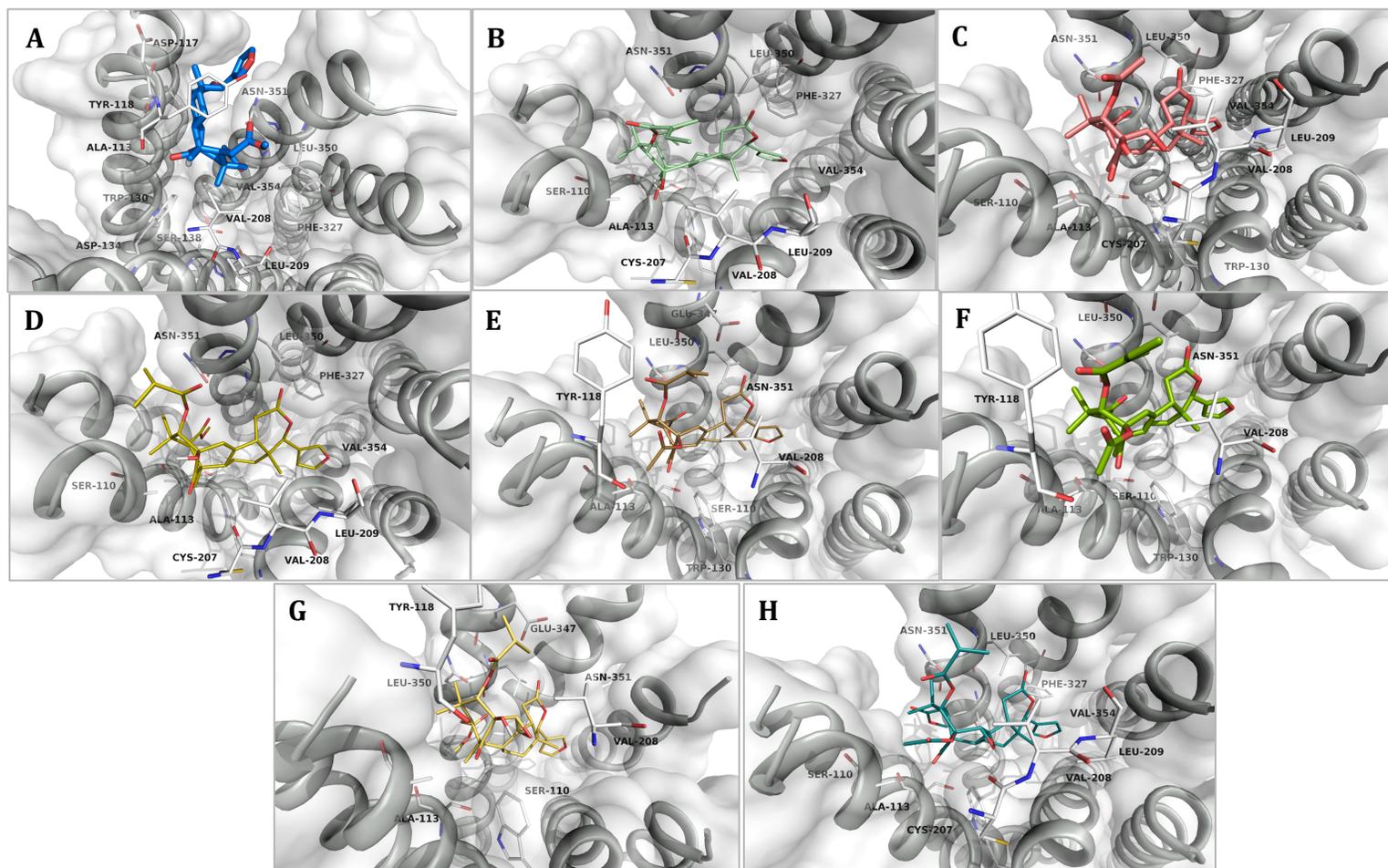


Figura 29. Modelos para el acoplamiento de las mexicanólidas **12** (A), **3** (B), **1** (C), **4** (D), **13** (E), **6** (F), **14** (G), y **15** (H) con el receptor serotoninérgico 5-HT_{2c} (cartón gris). Los residuos de interacción se muestran en bastones blanco.

Las variaciones obtenidas en la afinidad calculada para las mexicanólidas (desde -9.4 hasta -12.7 kcal/mol, **Tabla 6**) sugieren que de forma teórica, la presencia de un doble enlace entre las posiciones C-30 y C-8, y una cadena larga en C-3 (isobutirato o tiglato), como en el caso de los compuestos **3**, **6**, **13** y **2**, parecen ser las características estructurales requeridas para favorecer la afinidad con de las mexicanólidas con el receptor 5-HT_{2C}. De esta manera, el compuesto **12**, que posee un doble enlace entre las posiciones C-30 y C-8 pero un residuo de acetato en C-3 mostró la menor afinidad por el receptor modelado. Los análogos epoxidados **1**, **14** y **15**, independientemente de la longitud de su éster en C-3, presentaron menor afinidad con el receptor. Los resultados obtenidos en este estudio teórico predicen la probable interacción de las mexicanólidas con los receptores serotoninérgicos de tipo 2C, lo cual apoyaría los resultados obtenidos *in vivo* que sugieren que este tipo de compuestos son agonistas 5-HT_{2C}.

Tabla 6. Parámetros de acoplamiento molecular de las mexicanólidas de *S. humilis*, serotonina y ketanserina calculados con Autodock Vina. Se presentan la energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) y la constante de inhibición K_i estimadas para la interacción de los compuestos con la estructura del receptor 5-HT_{2C} modelado.

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	K_i (nM)
1	-10.7	14.35
2	-11.4	4.4
3	-12.7	0.49
6	-12.2	1.14
12	-9.4	128.7
13	-11.6	3.14
14	-10.9	10.24
15	-10.0	46.76
Serotonina	-7.7	2270
Ketanserina	-12.1	1.35

5.2.6 Aproximación *in vitro* al mecanismo de acción antidiabético de *S. humilis*

Los resultados de los experimentos *in vivo* descritos en las secciones anteriores sugieren que las mexicanólidas de *S. humilis* son polifarmacológicas, es decir, que producen sus efectos antidiabéticos a través de la acción sobre múltiples blancos terapéuticos. Esta característica dio pauta a ampliar el análisis de la eficacia antidiabética observada en los

modelos animales a modelos *in vitro*. En este contexto, se planteó la evaluación de la capacidad antioxidante de la decocción de *S. humilis* (DSH) y de las mexicanólidas acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**), humilina B (**1**) y metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**), así como el establecimiento de los efectos de DSH y de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** (humilínólida H) en ensayos a nivel celular.

5.2.6.1 Potencial antioxidante

La hiperglucemia postprandial persistente que desarrollan los pacientes pre-diabéticos provoca glucotoxicidad, un fenómeno de estrés oxidativo que conduce al deterioro de las células β pancreáticas; en consecuencia, disminuye la secreción de insulina y aumenta la resistencia a su acción, contribuyendo a la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Hogan *et al.*, 2010; Kawahito *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la glucotoxicidad puede ser atenuada por compuestos antioxidantes (Robertson *et al.*, 2003). Con base en estas consideraciones se determinó el potencial antioxidante de las mexicanólidas **12**, **1** y **3**, así como de la decocción de *S. humilis* por el método ORAC.

Los resultados obtenidos mostraron que DSH, **12**, **1** y **3**, poseen una capacidad antioxidante moderada (DSH, 115.64 ± 6.45 ; **12**, 2.02 ± 0.29 ; **1**, 16.24 ± 0.30 ; **3**, 12.29 ± 0.54 μmol equivalentes de Trolox por gramo). Los mecanismos antioxidantes de *S. humilis* pueden involucrar la reducción de las especies reactivas de oxígeno y/o la reducción de productos de glicación avanzada. Previamente, De y colaboradores (2011) reportaron que un extracto hidrometanólico de las semillas de la especie relacionada *S. mahagoni* poseía eficacia antioxidante en ratas diabéticas; tal efecto se explicó por el incremento de la actividad de enzimas catalasa y peroxidasa hepática, renal y muscular (De *et al.*, 2011). Entonces, las características antioxidantes de *S. humilis* podrían contribuir al restablecimiento de la funcionalidad de las células β pancreáticas al reducir la glucotoxicidad.

5.2.6.2 Ensayos basados en células

Los modelos basados en células permiten establecer las actividades antidiabéticas primarias de las plantas medicinales, mediante el análisis de los efectos de sus preparados y compuestos sobre las células que producen insulina (pancreáticas), o las que responden a su

acción, como son las musculares, hepáticas, y adiposas. También se pueden utilizar aquellas células involucradas en la absorción intestinal de glucosa. Estos bioensayos pueden complementar estudios *in vivo*, y permiten explorar los mecanismos de acción moleculares precisos de las plantas medicinales antidiabéticas (Haddad *et al.*, 2012). Así pues, la decocción de *S. humilis* (DSH) y las mexicanólicas **12**, **3** y **15** fueron evaluadas para descartar posibles efectos citotóxicos; posteriormente se ensayaron en células derivadas de tejidos hepático y muscular para establecer su potencial inhibitorio de la enzima glucosa-6-fosfatasa, y su capacidad para estimular de la captación de glucosa, respectivamente.

5.2.6.2.1 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de DSH, **12**, **3** y **15** se determinó al detectar la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de células H4IIE (hepatocitos) y C2C12 (miotubos). Esta enzima es liberada al medio extracelular cuando existe daño en las membranas plasmáticas (Weyermann *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron determinar que ni la decocción ni los compuestos provocaron daños significativos a ninguna de las líneas celulares a las concentraciones evaluadas (**Figura 29**). Con base en éstos, se seleccionaron las concentraciones óptimas no tóxicas para proseguir con las evaluaciones. En las células H4IIE éstas fueron: 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ para DSH, y 5 $\mu\text{g/ml}$ para los compuestos; y en las células C2C12 200 $\mu\text{g/ml}$ para DSH, y 10 $\mu\text{g/ml}$ para las mexicanólicas.

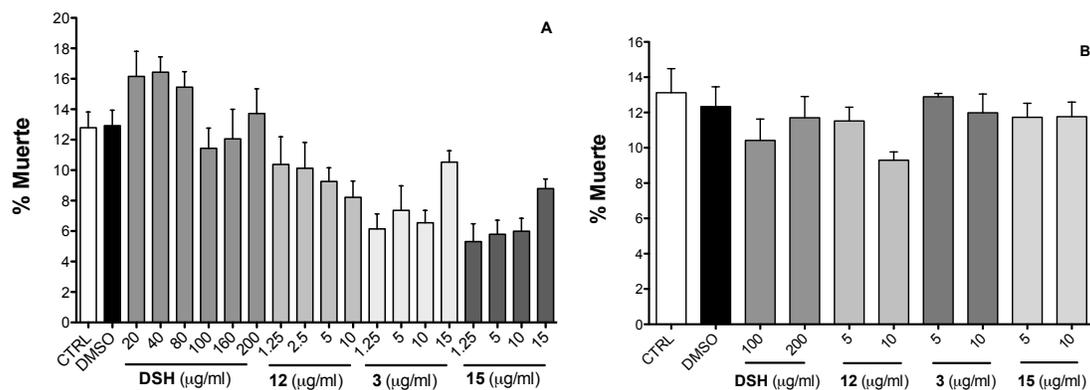


Figura 30. Ensayo LDH. **Panel A, células H4IIE,** y **Panel B, células C2C12.** DSH: decocción de *S. humilis*; **12**, **3** y **15**, mexicanólicas. Cada barra es el promedio del porcentaje de muerte \pm EEM de tres experimentos independientes (triplicados). ANADEV A de 1 vía, *post hoc* Dunnett.

5.2.6.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa en células H4IIE4

La enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) cataliza la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato a glucosa; éste es el paso final tanto de la gluconeogénesis como de la glucogenólisis hepáticas, por lo que de su actividad depende la liberación de glucosa del hígado hacia el torrente sanguíneo (Schmoll *et al.*, 2000). El efecto inhibitorio de DSH y de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** sobre la G6Pasa se evaluó en las células hepáticas H4IIE. Como se observa en la **Figura 30**, todas las muestras analizadas provocaron una inhibición significativa de la actividad de la enzima entre 38% y 61%. La insulina (100 nM), empleada como control positivo, produjo una inhibición del 78% en la actividad de la enzima. La inhibición de la G6Pasa demostrada por DSH y por las mexicanólidas evaluadas está relacionada con el efecto hipoglucemiante demostrado *in vivo*, en particular con el observado a tiempos prolongados de ayuno, pues se ha descrito que en animales de experimentación, esta condición induce la activación de la enzima G6Pasa (Nordlie *et al.*, 1999). Por ello, el efecto inhibitorio de la G6Pasa de *S. humilis* contribuye a su eficacia antidiabética en condiciones de ayuno. Es también probable que la inhibición de la G6Pasa favorezca la síntesis de glucógeno hepático, ya que la glucosa-6-fosfato es sustrato de la enzima glucógeno sintasa (GS). Tal propuesta podría explicar el incremento de glucógeno hepático provocado por la decocción de *S. humilis*. Además, muchos inhibidores de la G6Pasa son también activadores de la GS (Nachar *et al.*, 2013).

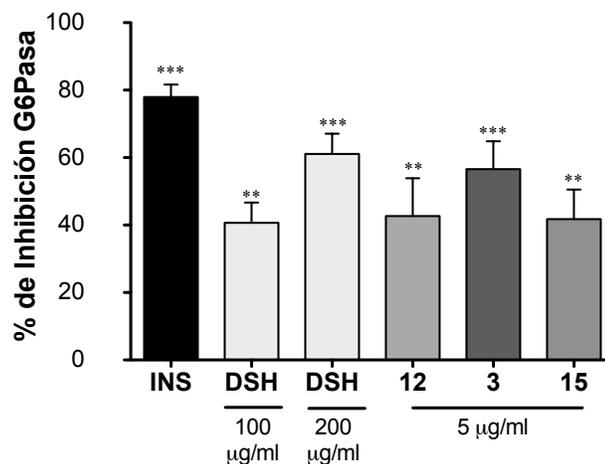


Figura 31. Ensayo de inhibición de la enzima G6Pasa en células hepáticas H4IIE. INS: insulina (100 nM, 18 h); DSH: decocción de *S. humilis* (18 h); **12**, **3** y **15**, mexicanólidas (18 h). Cada barra es el promedio del porcentaje de actividad G6Pasa \pm EEM de tres experimentos independientes (duplicados). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

5.2.6.2.3 Ensayo de captación de glucosa en células C2C12

La captura de glucosa por los tejidos muscular y adiposo es uno de los mecanismos regulatorios de la glucemia postprandial, e involucra la activación de vías de señalización dependientes e independientes de insulina. Puesto que casi la totalidad de tal captación ocurre en músculo esquelético, se evaluó el potencial de la decocción y las mexicanólicas **12**, **3** y **15** para incrementar el transporte de glucosa en mioblastos C2C12, una línea celular sensible a la insulina (Martineau *et al.*, 2006).

La insulina (100 nM, 30 min), y la metformina (400 μ M, 18 h), usados como controles positivos, estimularon significativamente el transporte de glucosa en un 49.8% y 56.3%, respectivamente, en relación a los valores del vehículo de DMSO ($***p < 0.001$). Las mexicanólicas (10 μ g/ml, 18 h) también produjeron un incremento significativo en la captación de glucosa en estas células ($*p < 0.05$, y $**p < 0.01$); los incrementos fueron del 31.8% (**12**), 23.5% (**3**), y 23.9% (**15**) con respecto a los valores del DMSO (**Figura 31**). Estos resultados demostraron que en el efecto antihiper glucémico *in vivo* de *S. humilis* está involucrada la captación de glucosa en músculo esquelético, lo cual explica su potencial antidiabético en condiciones postprandiales.

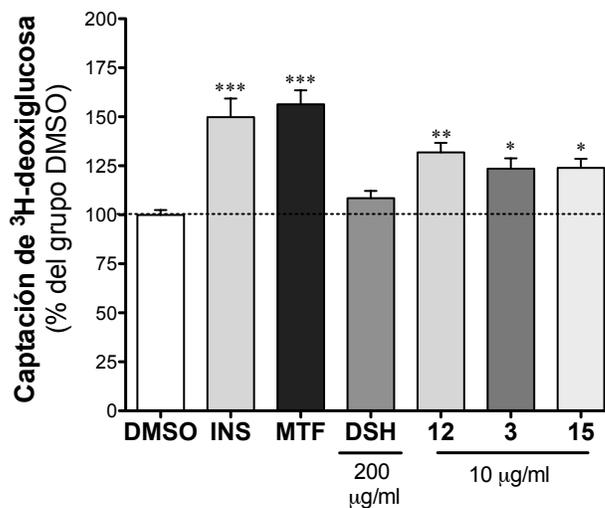


Figura 32. Ensayo de captación de glucosa en células musculares C2C12. INS: insulina (100 nM, 30 min); MTF: metformina (400 μ M, 18 h); DSH: decocción de *S. humilis* (18 h); **12**, **3**, y **15**, mexicanólicas (18 h). Cada barra es el promedio \pm EEM de cinco experimentos independientes (duplicados) normalizados al grupo DMSO. ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$, y $*** p < 0.001$).

5.2.6.2.4 Efecto de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** en la fosforilación de AMPK en células C2C12

Para explicar los mecanismos moleculares detrás de la captación de glucosa inducida por las mexicanólidas **12**, **3** y **15**, se analizó la expresión de la proteína cinasa activada por adenosina 5-monofosfato (AMPK) en células C2C12. La selección de esta proteína obedeció a que los resultados *in vivo* sugirieron que las mexicanólidas actuaban de forma muy parecida a la metformina, la cual es un activador de AMPK (Jalving *et al.*, 2010). Esta proteína juega un papel importante en la activación de varias proteínas que regulan la captura de glucosa independiente de insulina (Saltiel y Kahn, 2001). Como se observa en la **Figura 32**, aunque los controles positivos metformina y AICAR (ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida) provocaron un ligero aumento de la fosforilación de AMPK (p-AMPK) respecto al control de DMSO (2.3 y 1.9 veces, respectivamente), el efecto no fue estadísticamente significativo, debido a la dispersión de los valores obtenidos en los análisis densitométricos que permitieron detectar específicamente la proteína fosforilada. La misma tendencia en la estimulación de la expresión de p-AMPK se observó para la mexicanólida **12** (incremento de 1.8 veces). Este tipo de variaciones se han reportado en la literatura, puesto que la expresión de la forma fosforilada de la AMPK en células musculares varía dependiendo del tiempo de exposición al tratamiento y de la concentración de éste (Martineau *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2009).

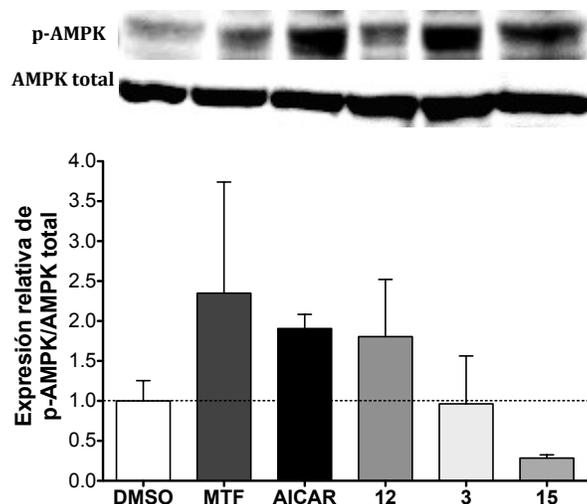


Figura 33. Efecto de las mexicanólidas **12**, **3** y **15** en la expresión de p-AMPK en células C2C12. MTF: metformina (400 μ M, 18 h); AICAR: ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida (2 μ M, 30 min); **12**, **3** y **15**, mexicanólidas (10 μ g/ml, 18 h). La fosforilación de AMPK se midió por western blot (parte superior de la figura), y está expresada como el promedio \pm EEM de tres experimentos independientes, normalizados al grupo DMSO. ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett.

En este punto es necesario destacar que no se realizaron ensayos para valorar los mejores tiempos de expresión de p-AMPK ni se evaluaron distintas concentraciones de las mexicanólidas, sino que se eligieron las condiciones empleadas en los experimentos de captación de glucosa (18 h, de exposición, concentración de 10 µg/ml). Entonces, para aseverar que la mexicanólida **12** es un activador de AMPK debería analizarse la expresión de p-AMPK a distintos tiempos de incubación usando varias concentraciones del metabolito, sin descartar la expresión de otras proteínas involucradas en la activación de AMPK y en el transporte de glucosa, como GLUT-4 o CaMKK. Por otra parte, resultaría conveniente evaluar si las mexicanólidas actúan como insulinomiméticas, a través de la activación de la vía PI3K/Akt (dependiente de insulina), o bien, si son sensibilizadoras a la acción de la insulina al inducir la captación de glucosa a través de la expresión de receptores 5-HT_{2A/C}, ello en relación con la propuesta de que las mexicanólidas son agonistas de este tipo de receptores (Hajdich *et al.*, 1999).

5.3 Interacciones planta medicinal-fármaco alopático: el caso de *S. humilis*

La combinación de medicamentos con plantas medicinales es una práctica frecuente entre los pacientes diabéticos; sin embargo, la información sobre el resultado de tales asociaciones no es muy abundante. Para evaluar el resultado de la interacción entre la mexicanólida **12**, la decocción cuantificada de *S. humilis* (DSH) y los fármacos glibenclamida (GLI) y metformina (MTF), se diseñó un experimento basado en una curva de tolerancia a la glucosa. En primera instancia, se construyeron curvas dosis-respuesta (CDR) con cinco niveles de dosis de **12**, DSH, GLI y MTF. En la **Figura 33** se presentan las CDR lineales graficadas tras la estandarización al efecto máximo observado (alcanzado con MTF, 300 mg/kg).

Si bien las características de las CDR generadas no permitieron llevar a cabo un análisis isoblográfico (Tallarida, 2000), sí fue posible estimar dosis equiefectivas de la parte lineal de las curvas, mismas que se utilizaron en las distintas evaluaciones (por separado o en combinación). De esta manera en los tratamientos por separado las dosis utilizadas fueron las siguientes: **12** (2 mg/kg), DSH (864 mg/kg), GLI (9.47 mg/kg) y MTF (57.75 mg/kg); en el caso de los tratamientos en combinación (**12**+GLI; **12**+MTF, GLI+MTF) se utilizaron las siguientes dosis: **12**, 1 mg/kg; DSH, 432 mg/kg; GLI, 4.735mg/kg; y MTF, 28.875 mg/kg; es decir la mitad de las dosis.

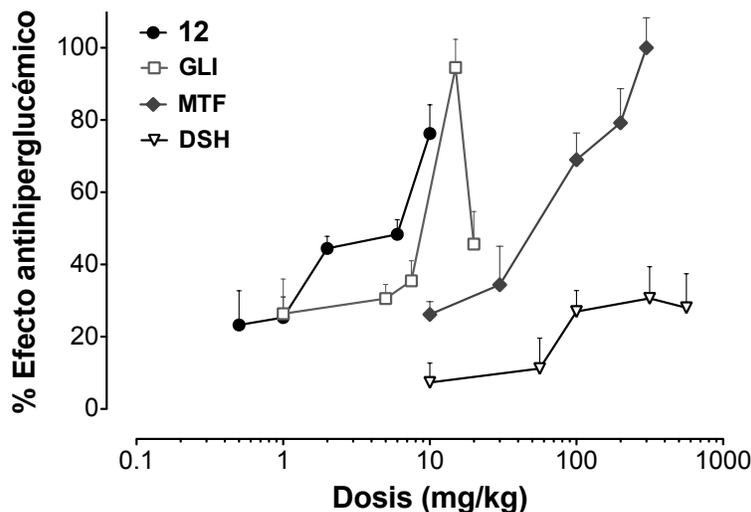


Figura 34. Curvas dosis-respuesta del efecto antihiper glucémico de la mexicanólida **12**, glibenclamida (GLI), metformina (MTF), y la decocción de *S. humilis* (DSH). Cada punto representa el promedio \pm EEM de $n = 6$ ratones.

Los resultados de los experimentos de interacción se presentan en la **Figura 34**. En primera instancia, la co-administración de MTF y GLI provocó una disminución significativa de la glucemia (60% de reducción respecto al vehículo, $p < 0.01$), de forma similar en que lo hizo cada fármaco cuando se administró individualmente.

La comparación entre el área bajo la curva de la mexicanólida **12** con las áreas bajo la curva resultantes de las distintas de las combinaciones reveló lo siguiente:

- (i) La administración individual de **12** indujo una reducción de la glucemia del 66% ($p < 0.01$).
- (ii) La combinación de **12** y GLI provocó la desaparición del efecto antihiper glucémico. Este resultado concuerda con el obtenido en los experimentos de activación de los canales K_{ATP} . Es entonces probable que la mexicanólida **12** interactúe con los canales K_{ATP} pancreáticos en un sitio distinto al de las sulfonilureas (como los secretagogos de tipo meglitinida), lo cual podría provocar un impedimento estérico para la unión de la glibenclamida, o viceversa.
- (iii) La co-administración de **12** con metformina provocó un 88% de disminución de los niveles de glucosa ($p < 0.001$). Debido a que la reducción en la glucemia de la

combinación **12** + MTF fue 20% superior que la provocada por la combinación GLI + MTF, se propone que el mecanismo de acción antihiper glucémico de **12** es distinto al de la metformina. Esta propuesta coincide con aquella que sugiere que las mexicanólidas son agonistas de los receptores 5-HT_{2A/C}.

Este mismo tipo de efectos se observaron con la co-administración de la decocción (DSH) con MTF y con GLI. Los ratones tratados con DSH presentaron un 33% de reducción de glucemia; en combinación con MTF, se alcanzó un 53% de disminución ($p < 0.01$), y con GLI, se perdió el efecto farmacológico. Por tanto, es probable que las mexicanólidas interactúen con la glibenclamida y con la metformina de la misma manera en que lo hizo el compuesto **12**.

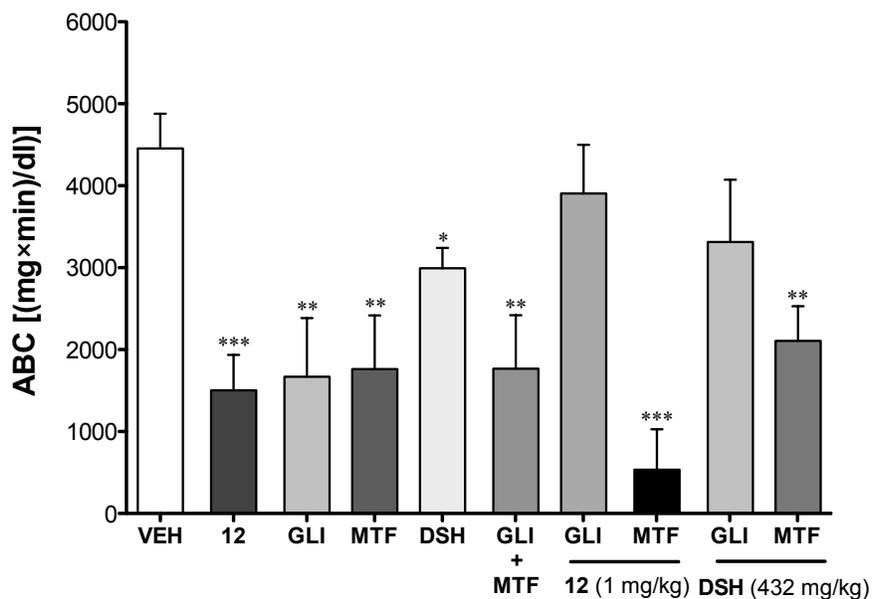


Figura 35. Efecto en la glucemia del compuesto **12** (2 mg/kg), de la glibenclamida (GLI, 9.47 mg/kg), de la metformina (MTF, 57.75 mg/kg), de la decocción de *S. humilis* (DSH, 864 mg/kg), y combinaciones, durante un experimento de interacción. Las dosis de **12**, GLI, MTF, y DSH usadas en las combinaciones fueron: 1 mg/kg, 4.735 mg/kg, 28.875 mg/kg, y 432 mg/kg, respectivamente. VEH, vehículo (NaCl 0.9%). Cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, glucemia vs. tiempo, mg/dl x min) \pm EEM de $n = 6$. ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

5.4 Eficacia antinociceptiva y antihiperalgésica de *S. humilis*

Como se señaló en la sección de antecedentes, la neuropatía diabética periférica es una de las complicaciones más difíciles de tratar en los pacientes con DMT2. Los medicamentos alopáticos que se usan para tratar este padecimiento muchas veces son ineficientes y costosos. El uso de preparados a base de capsaicina ha dado pauta a buscar agentes útiles para el tratamiento de la neuropatía diabética en plantas medicinales usadas para tratar el dolor, y constituyen una opción para desarrollar terapias integrales que puedan reducir la sintomatología de la DMT2 y a la vez, atenuar la neuropatía diabética; esto en virtud de los fenómenos de polifarmacología o sinergia que caracterizan a estos remedios (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009). En este contexto, se planteó la evaluación del potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de la decocción de *S. humilis* y de la mexicanólida **12** usando la prueba de la formalina en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.

5.4.1 Establecimiento del modelo de hiperalgnesia

Los ratones hiperglucémicos (glucemia 421.2 ± 12.6 mg/dl) desarrollaron hiperalgnesia tras dos semanas de la administración con STZ-NA (50-130 mg/kg, *i.p.*). Esta aseveración se basa en el hecho de que la administración de una solución diluida de formaldehído (formalina, 1%) a este tipo de animales produjo un incremento significativo en el tiempo de lamida ($p < 0.01$), en comparación con los ratones normoglucémicos que exhiben una respuesta nociceptiva menor al ser tratados con una solución de formalina de mayor concentración (2%) (**Figura 35**). Estos resultados son consistentes con los reportados previamente para las mismas condiciones experimentales. Se ha descrito que en este tipo de animales prevalece el incremento de la actividad de las enzimas aldosa reductasa, poli(ADP-ribosa) polimerasa, y ciclooxigenasa-2, así como la depleción de transportadores de potasio KCC-2 a nivel espinal (Obrosova, 2009). Todos estos mecanismos inducen procesos de sensibilización central y periférica que desencadenan un estado hiperalgésico (Calcutt *et al.*, 1996; Freshwater *et al.*, 2002; Hao y Ogawa, 1998).

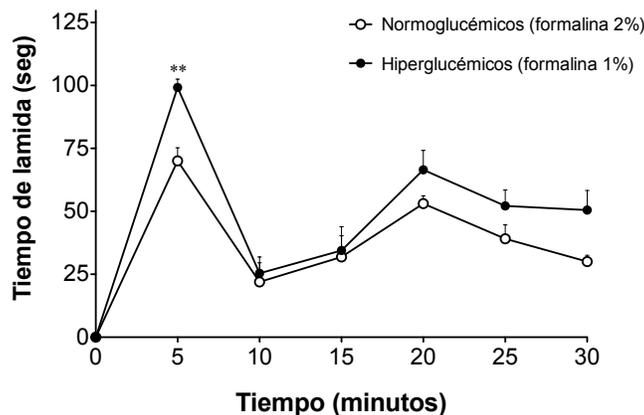


Figura 36. Curso temporal del comportamiento nociceptivo inducido por una inyección s.c. de una solución diluida de formaldehído (formalina) a ratones normoglucémicos (2%) e hiperglucémicos (1%). Cada punto es el promedio del tiempo de lamida \pm EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni.

5.4.2 Efecto de DSH y de la mexicanólida **12** en el modelo de la formalina

El efecto antinociceptivo de la decocción de *S. humilis* (DSH) se muestra en la **Figura 36** (**Paneles A-C**). DSH disminuyó el comportamiento nociceptivo producido por la formalina de modo dependiente de la concentración ($p < 0.05$), tanto en la fase neurogénica (**Panel A**), como en la inflamatoria (**Panel B**). El efecto antinociceptivo máximo se alcanzó a la concentración de 100 $\mu\text{g/pata}$ (51.4%); dicho efecto fue similar al de la gabapentina (30 $\mu\text{g/pata}$, 50.8%), un fármaco anticonvulsivante de amplio uso para el tratamiento de la neuropatía diabética (Backonja *et al.*, 1999). La CE_{50} antinociceptiva calculada para DSH fue de 44.4 $\mu\text{g/pata}$. Ahora bien, cuando se evaluó en ratones hiperglucémicos (**Paneles D-F**), DSH mostró un efecto antihiperalgésico significativo dependiente de la concentración ($p < 0.05$), tanto en la fase 1 (**Panel D**) como en la 2 (**Panel E**); la antihiperalgnesia máxima se alcanzó a la concentración de 177 $\mu\text{g/pata}$ (65.1%), y fue superior a la que tuvo la gabapentina (37.5%). La CE_{50} antihiperalgésica calculada para DSH fue de 130.4 $\mu\text{g/pata}$.

Como el efecto antihiperalgésico de la especie era de interés por su potencial en el tratamiento de la neuropatía diabética, se evaluó a **12**, una de las mexicanólidas mayoritarias, en ratones hiperalgésicos. Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Figura 37**. Este compuesto provocó una disminución significativa en el tiempo de lamida durante todo el experimento, tanto en la fase neurogénica como en la inflamatoria (**Paneles A-C**, $p < 0.05$). La acción antihiperalgésica central de la concentración más alta de **12** (3.5 $\mu\text{g/pata}$) fue

equiefectiva a la de la gabapentina (30 $\mu\text{g/pata}$) (51.8% y 47.1%, respectivamente). La CE_{50} antihiperalgésica calculada para **12** fue de 2.91 $\mu\text{g/pata}$. Tras establecer la eficacia antihiperalgésica central y periférica de **12**, se decidieron establecer sus posibles mecanismos de acción, seleccionando para las evaluaciones la concentración de 3 $\mu\text{g/pata}$ a partir de las curvas concentración-respuesta. El curso temporal del efecto antihiperalgésico de **12** a esta concentración se muestra en la **Figura 38**.

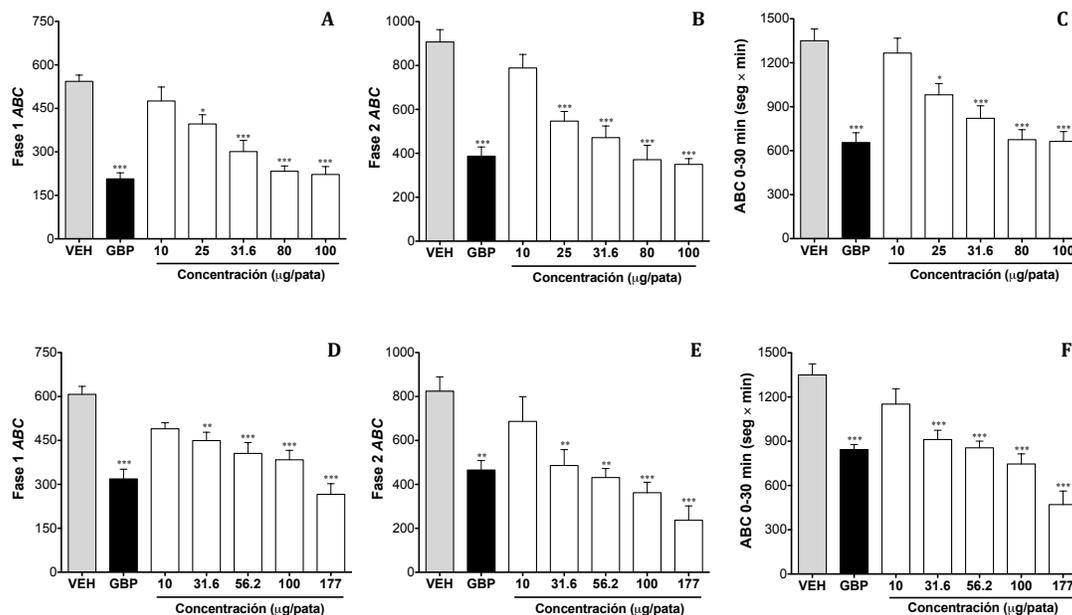


Figura 37. Prueba de la formalina. Efecto antinociceptivo de la decocción de *S. humilis* en ratones normoglucémicos durante las fases 1 (Panel A), 2 (Panel B) y área bajo la curva total (Panel C), y efecto antihiperalgésico de la decocción de *S. humilis* en ratones hiperglucémicos durante las fases 1 (Panel D), 2 (Panel E), y área bajo la curva total (Panel F). VEH: vehículo (NaCl 0.9%); GBP: gabapentina (30 $\mu\text{g/pata}$, control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo, $\text{seg} \times \text{min}$) \pm EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

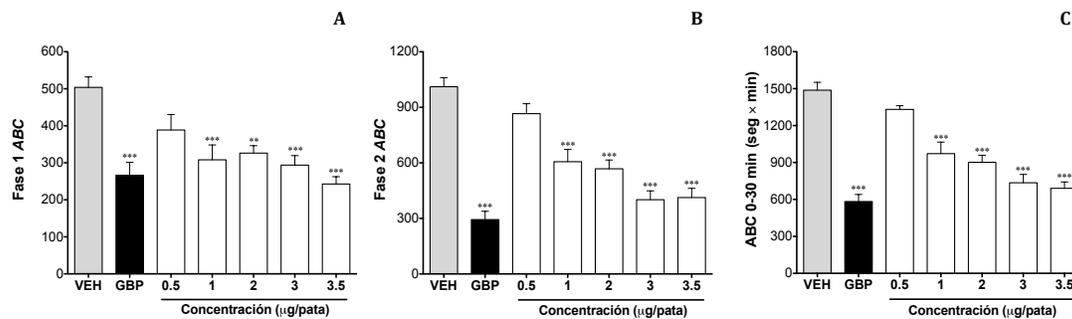


Figura 38. Prueba de la formalina. Efecto antihiperalgésico de la mexicanólida **12** ratones hiperglucémicos durante las fases 1 (Panel A), 2 (Panel B), y área bajo la curva total (Panel C). VEH: vehículo (NaCl 0.9%); GBP: gabapentina (30 µg/pata, control positivo). Cada barra es el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra tiempo, seg × min) ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVa de 1 vía, *post hoc* Dunnett (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

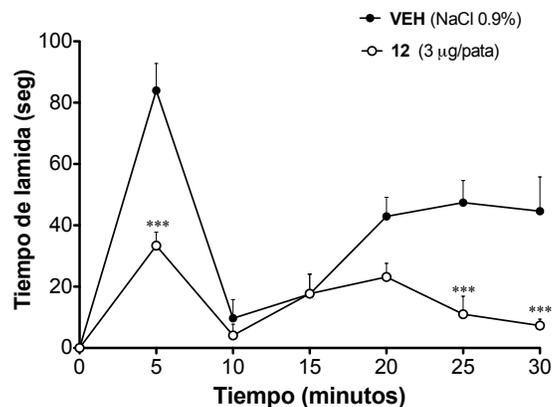


Figura 39. Curso temporal del efecto antihiperalgésico de la mexicanólida **12** (3 µg/pata) en ratones hiperglucémicos. Cada punto es el promedio del tiempo de lamida ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni (***) $p < 0.001$).

5.4.3 Mecanismo de acción antihiperalgésico de la mexicanólida **12** en la prueba de la formalina

Los sistemas serotoninérgico, GABAérgico, opioide y nitrérgico regulan en conjunto la transmisión y modulación central y periférica de los estímulos nociceptivos, por lo que los fármacos que ejercen su acción sobre sus receptores son usados en la clínica para aliviar los síntomas de la neuropatía diabética (Obrosova, 2009). Puesto que no existen reportes en la

literatura de los mecanismos de acción antihiperalgésicos de compuestos del tipo mexicanólida, se analizaron los posibles efectos de la mexicanólida **12** en estas vías de señalización nociceptiva.

En primer lugar, se evaluó la participación de las vías serotoninérgicas y GABAérgicas en el efecto antihiperalgésico de **12**; los resultados de dichos experimentos se presentan en la **Figura 39, Paneles A-C**. El tratamiento con los antagonistas ketanserina (KET, antagonista 5-HT_{2A/2C}; 6 µg/pata;), o con flumazenilo (FLU, antagonista GABA_A/BZD; 6 µg/pata), no modificó el comportamiento de lamida en los animales de experimentación. Sin embargo, los efectos centrales y periféricos **12** fueron abolidos en ratones pre-tratados con estos antagonistas.

La participación serotoninérgica en los mecanismos moduladores de nocicepción es muy compleja; se ha sugerido que la mayoría de los receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A/B/D/F}, 5-HT_{2A/B/C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆, y 5-HT₇) están involucrados en estos procesos; el efecto neto de su modulación por ligandos exógenos (nocicepción o analgesia) dependerá no sólo del tipo de receptor involucrado, sino del estado fisiológico del animal en que se evalúen (Millan, 2002). Puesto que el efecto antihiperalgésico de la mexicanólida **12** fue abolido en ratones pre-tratados con el antagonista 5-HT_{2A/C} ketanserina (6 µg/pata), es posible que estos receptores participen en la acción antihiperalgésica de **12**. Se ha reportado que el agonismo de los receptores 5-HT_{2A} en neuronas GABAérgicas produjo un efecto antihiperalgésico en ratas con neuropatía diabética; el agonismo de este mismo tipo de receptores en ratas con neuropatía inducida quirúrgicamente redujo la alodinia a través de mediación muscarínica (Obata *et al.*, 2002; Pichon *et al.*, 2010). También se ha descrito que el agonismo 5-HT_{2C} poseía acciones antialodínicas y antihiperalgésicas en ratas; dichas acciones se relacionaron con la estimulación de receptores GABA_A y con la inhibición de la liberación de serotonina en las fibras C del asta dorsal, mediante mecanismos de activación α -adrenérgica (Nakai *et al.*, 2010).

Los reportes anteriores sugieren que otros mecanismos analgésicos se activan luego de la estimulación de los receptores 5-HT_{2A/C}. Por ello, se evaluó si los receptores GABA_A estaban involucrados en la acción antihiperalgésica de la mexicanólida **12**. Se ha documentado que la activación de estos receptores por agonistas GABA_A reduce la nocicepción inducida por formalina, y que los antagonistas de dicho receptor revierten dicho efecto (Lee *et al.*, 2010; Munro *et al.*, 2009; Zeilhofer *et al.*, 2009). En el modelo de hiperalgnesia empleado, el antagonismo con flumazenilo (6 µg/pata) dio como resultado la pérdida del efecto

antihiperalgésico de **12**, lo cual permite sugerir que la eficacia de este compuesto puede deberse a vías inhibitorias activadas por la modulación de los receptores GABA_A.

Entonces, es probable que la mexicanólida **12** ejerza su efecto antihiperalgésico valiéndose tanto del agonismo de los receptores 5-HT_{2A/C} como de los receptores GABA_A, mediante los mecanismos moduladores que estos receptores ejercen al interactuar entre sí, en particular a nivel central.

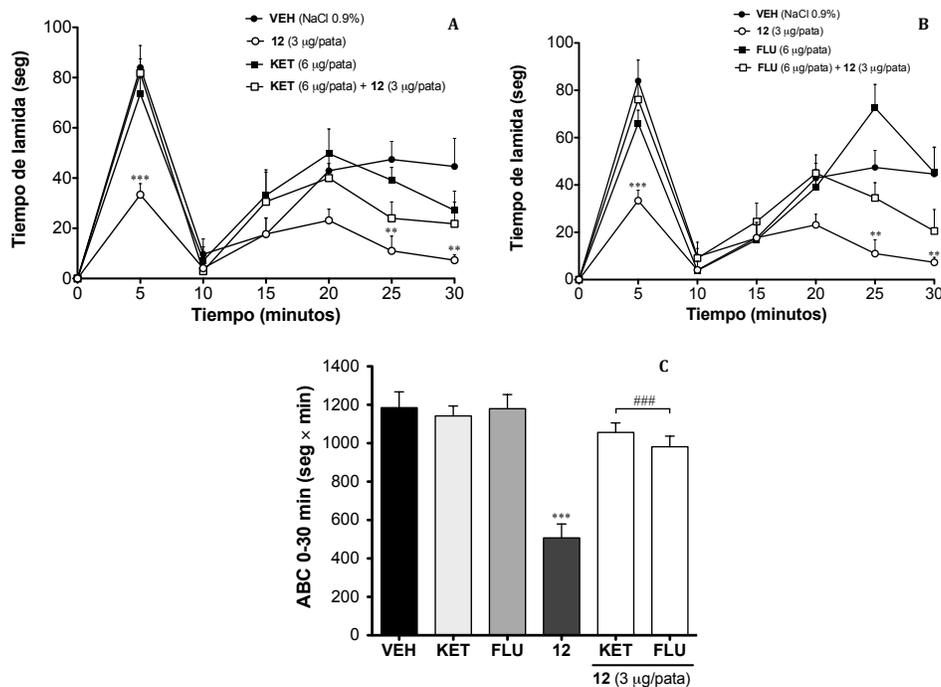


Figura 40. Posible mecanismo de acción antihiperalgésico de la mexicanólida **12** (3 µg/pata) en ratones hiperglucémicos. Modulación serotoninérgica (Paneles A y C) y GABAérgica (Paneles B y C). VEH: vehículo (NaCl 0.9%), KET: ketanserina (6 µg/pata), FLU: flumazenilo (6 µg/pata). Paneles A y B: cada punto representa el tiempo de lamida promedio (seg) ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 2 vías, *post hoc* Bonferroni (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$); Panel C: cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra el tiempo, seg × min) ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 1 vía, *post hoc* Dunnett, *** $p < 0.001$. ### $p < 0.001$ diferente de la administración de la mexicanólida **12** (ANADEVAs de 1 vía, *post hoc* Tukey).

Se ha demostrado que las modulaciones serotoninérgicas y GABAérgicas participan en la analgesia opioide. Así, mientras que el aumento de los niveles centrales de serotonina potencian la analgesia μ - y κ -opioide, el agonismo de la morfina sobre los receptores μ -opioide en las neuronas GABAérgicas centrales inhibe la liberación de GABA; asimismo, la

modulación alostérica de los receptores GABA_A por el diazepam atenúa la analgesia μ - y κ -opioide (Nemmani y Mogil, 2003; Viguier *et al.*, 2012). Estos efectos serotoninérgicos-GABAérgicos sobre la analgesia opioide nos llevaron a explorar si estas últimas vías participaban en el efecto antihiperalgésico de la mexicanólida **12**; para tal efecto se pre-trató a los ratones con el antagonista no selectivo naloxona (NLX, 3 μ g/pata). En **Figura 40, Panel A**, que ilustra los resultados del experimento se puede observar que el antagonista no afectó el tiempo de lamida de los ratones. El pre-tratamiento con NLX redujo el efecto antihiperalgésico global de **12** (**Figura 40, Panel B**), aunque con menor significancia que en el caso del pre-tratamiento con KET y FLU. Estos resultados son consistentes con los anteriores que sugieren que los mecanismos antihiperalgésicos primarios de **12** son serotoninérgicos y GABAérgicos. Se propone que la participación de los receptores opioides en la acción antihiperalgésica de **12** es secundaria, probablemente mediada por el agonismo de los receptores del tipo δ - y κ -opioide, pues se ha descrito que la analgesia opioide en ratones con hiperglucemia inducida por estreptozotocina está asociada a tales receptores, no así a los del tipo μ -opioide (Kamei *et al.*, 1992).

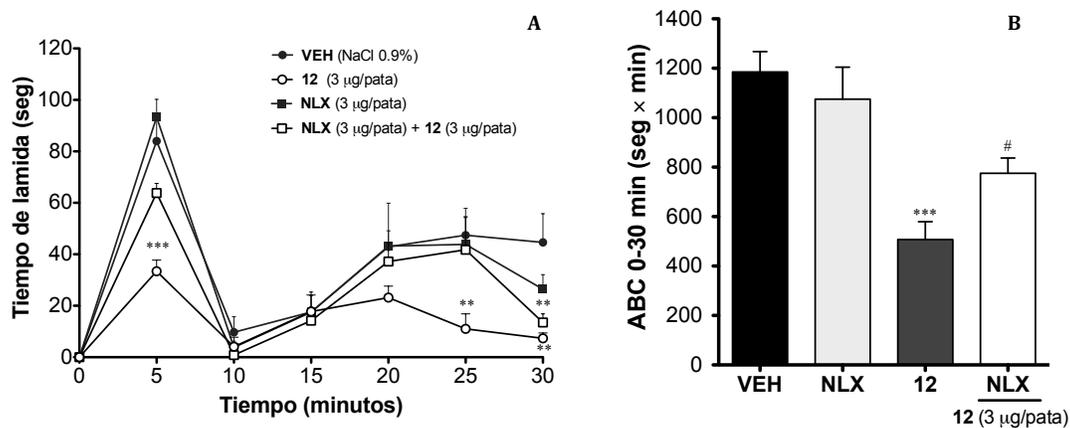


Figura 41. Posible mecanismo de acción antihiperalgésico de la mexicanólida **12** (3 μ g/pata) en ratones hiperglucémicos. Modulación opioide. VEH: vehículo (NaCl 0.9%), NLX: naloxona (3 μ g/pata). Panel A: cada punto representa el tiempo de lamida promedio (seg) \pm EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 2 vías, post hoc Bonferroni (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). Panel B: Cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra el tiempo, seg \times min) \pm EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 1 vía, post hoc Dunnett, *** $p < 0.001$. # $p < 0.05$ diferente de la administración de la mexicanólida **12** (ANADEVAs de 1 vía, post hoc Tukey).

Puesto que la vía arginina/NO/GMPc/PKG/K_{ATP} está asociada al efecto antinociceptivo de fármacos como la morfina, el metamizol, y el diclofenaco (Sachs *et al.*, 2004), se exploró si el efecto antihiperalgésico de **12** se debía a su acción sobre alguna de las proteínas efectoras de esta vía. En primera instancia, se evaluó la participación a nivel de la síntesis de óxido nítrico (NO). En nuestro modelo, la administración de L-NAME (éster metílico de L-nitroarginina, inhibidor de la óxido nítrico sintasa, 150 µg/pata) redujo la hiperalgesia periférica (**Figura 41, Paneles A y E**); por otra parte, el pre-tratamiento con L-arginina (precursor de la síntesis de NO, 50 µg/pata), o con SIN-1 (donador de NO, 3-morfolinosisidnonimina, 200 µg/pata) produjo efectos antihiperalgésicos significativos (**Figura 41, Paneles B-E**). Estos efectos analgésicos coinciden con los reportados en la literatura (Cury *et al.*, 2011, *inter alia*; Kolesnikov *et al.*, 2009; Sachs *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Tassorelli *et al.*, 2006).

Aunque los efectos antihiperalgésicos centrales de la mexicanólida **12** en ratones pre-tratados con L-NAME no fueron estadísticamente significativos, resultó evidente que la mexicanólida ejerció un efecto antihiperalgésico, en comparación con los animales que sólo recibieron L-NAME (**Figura 41, Paneles A y D**). Por tanto, es muy poco probable que **12** inhiba la síntesis de NO, en virtud de que el efecto antihiperalgésico de **12** se ve atenuado y no abolido en presencia de L-NAME, es decir, **12** es capaz de reducir la hiperalgesia que exhiben los ratones pre-tratados mediante mecanismos que no dependen directamente de la producción enzimática de NO.

Los resultados de la evaluación de **12** con los precursores de la síntesis de NO revelaron el comportamiento dual de este neurotransmisor en el modulación del dolor, puesto que se observó la atenuación (en ratones pre-tratados con L-arginina) y la abolición del efecto antihiperalgésico central de **12** (en animales pre-tratados con SIN-1) (**Figura 41, Paneles B-F**). Estos resultados pueden explicarse con las evidencias que señalan que **12** activa las vías opioides. Mediante estas rutas de señalización, **12** estimularía la síntesis de NO, contribuyendo al incremento de las concentraciones de dicho neurotransmisor. Varios estudios sugieren que niveles elevados de NO producen hiperalgesia central al incrementar la liberación de sustancia P en el asta dorsal, y al reducir la vías inhibitorias GABAérgicas. Además, se ha propuesto que el aumento de las concentraciones de NO desencadena la síntesis de prostaglandinas, en particular PGE₂ y PGI₂, las cuales actúan como sensibilizadores a niveles central y periférico (Cury *et al.*, 2011; Ndengele *et al.*, 2008). Así, es probable que los mecanismos antihiperalgésicos de la mexicanólida **12** fueran abolidos a la concentración del

donador de NO empleado.

Posteriormente se analizó la posible intervención del receptor de NO, la enzima guanilato ciclasa (GC), y de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) en el efecto antihiperalgésico de **12**. El pre-tratamiento con el inhibidor de GC, ODQ (1-*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona, 75 μ g/pata), o con el bloqueador de canales K_{ATP} , glibenclamida (GLI, 50 μ g/pata) no provocó efecto antihiperalgésico alguno, de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura (Galdino *et al.*, 2015; Sachs *et al.*, 2004) (**Figura 42, Paneles C-F**).

Los resultados obtenidos muestran que el efecto antihiperalgésico central de **12** no está relacionado directamente ni con la activación de la GC ni con la apertura de canales K_{ATP} , puesto que la antihiperalgesia inducida por la mexicanólida **12** se preserva en ratones pre-tratados con ODQ o con GLI (**Figura 42, Paneles A y B**). La ligera reducción del efecto antihiperalgésico central de **12** en ratones tratados con GLI, y del periférico en ratones pre-tratados con ODQ, apoya la propuesta de que **12** activa vías opioides, pues el resultado tanto del bloqueo de canales K_{ATP} como de la inhibición de la síntesis de GMPC, sería la reducción de la apertura de los canales K_{ATP} y de la consecuente hiperpolarización de las neuronas inhibitorias; dichos eventos son necesarios para la analgesia opioide.

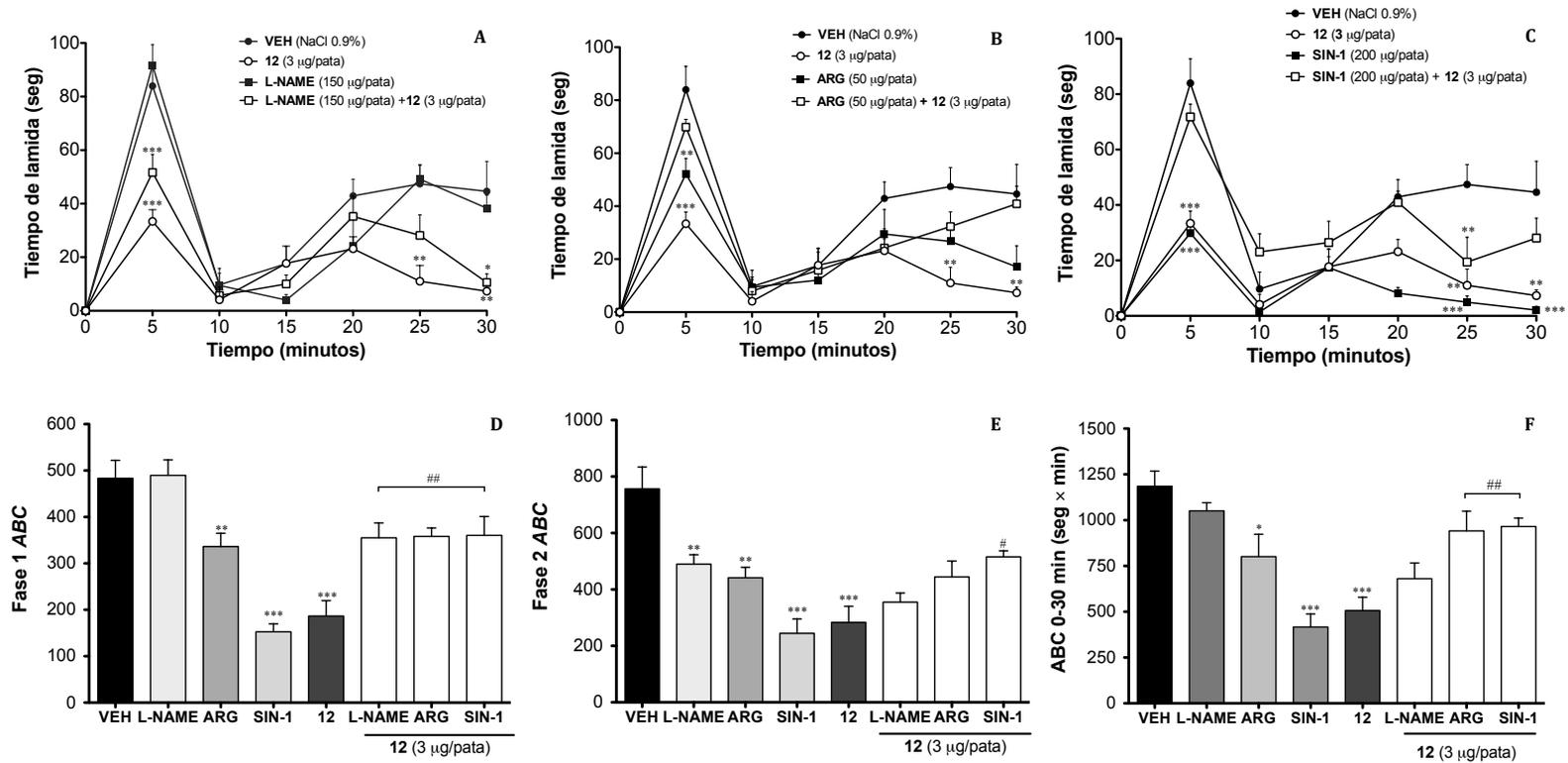


Figura 42. Posible mecanismo de acción antihiperalgésico de la mexicanólida **12** (3 µg/pata) en ratones hiperglucémicos. Modulación nitrérgica. VEH: vehículo (NaCl 0.9%), L-NAME: éster metílico de L-nitroarginina (150 µg/pata), ARG: L-arginina (50 µg/pata), y SIN-1: 3-morfolinosisdonimina (200 µg/pata). Paneles A-C: cada punto representa el tiempo de lamida promedio (seg) ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 2 vías, *post hoc* Bonferroni ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$). Paneles D-F: cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra el tiempo, seg × min) ± EEM de $n = 6$ ratones. # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ diferente de la administración de la mexicanólida **12** (ANADEVAs de 1 vía, *post hoc* Tukey)

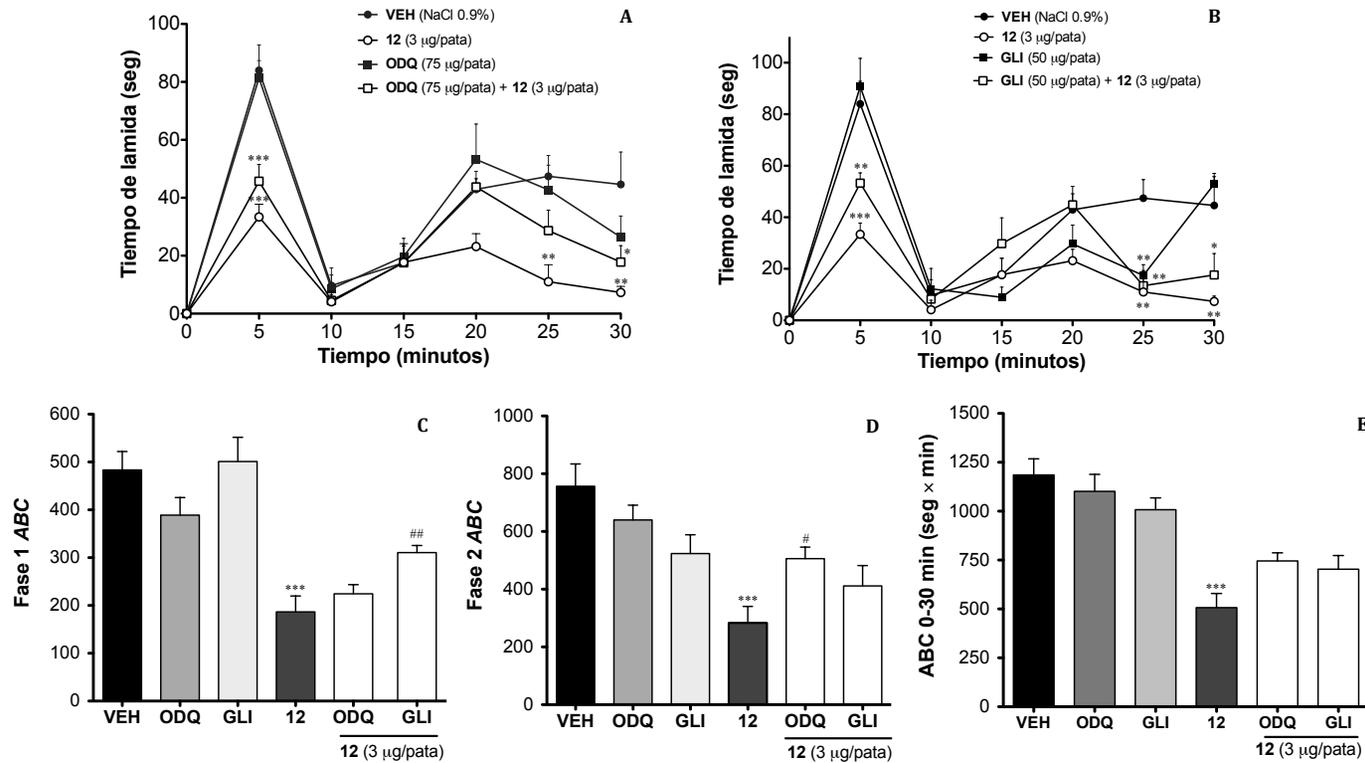


Figura 43. Posible mecanismo de acción antihiperálgico de la mexicanólida **12** (3 µg/pata). Modulación vía guanilato ciclasa y canales K_{ATP} . VEH: vehículo (NaCl 0.9%), ODQ: 1-*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-ona (75 µg/pata), GLI: glibenclamida (50 µg/pata). Paneles A-B: cada punto representa el tiempo de lamida promedio (seg) ± EEM de $n = 6$ ratones. ANADEVAs de 2 vías, *post hoc* Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). Paneles C-E: cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, tiempo de lamida contra el tiempo, seg × min) ± EEM de $n = 6$ ratones. # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ diferente de la administración de la mexicanólida **12** (ANADEVA de 1 vía, *post hoc* Tukey).

VI. Conclusiones

1. El estudio fitoquímico de las semillas de la especie *Swietenia humilis* condujo al aislamiento y caracterización de ocho mexicanólidas, incluyendo: acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**), humilina B (**1**), metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**2**), metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**), metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**13**), humilinólida C (**6**), humilinólida G (**14**) y humilinólida H (**15**). Los compuestos **14** y **15** son nuevas entidades moleculares, en tanto que el **12** se describe por primera vez en la especie.
2. Se desarrolló y validó un método analítico por CLAE para la cuantificación de las mexicanólidas presentes en el extracto acuoso de las semillas de *S. humilis*. Este método constituye una prueba de composición para la especie y puede aplicarse para el control de calidad de la droga cruda derivada de *S. humilis*. Asimismo, la aplicación de este método permitirá el desarrollo de fitomedicamentos estandarizados y/o cuantificados que tengan como base la droga cruda de *S. humilis*.
3. Los estudios *in vivo* desarrollados permitieron establecer la inocuidad y eficacia de la decocción de las semillas como agente hipoglucemiante, antihiper glucémico e hipolipemiante. Los estudios de toxicidad en ratones indicaron que la DL₅₀ del preparado es mayor a 5 g/kg. Las mexicanólidas aisladas fueron caracterizadas como los principios activos de la especie, en particular, como agentes antihiper glucémicos (compuestos **12**, **1** y **3**), puesto que presentaron mejor actividad en los ensayos de tolerancia a la glucosa oral respecto a la observada en los ensayos utilizados para determinar su potencial hipoglucemiante. Esta propiedad farmacológica conferiría a la especie mayor seguridad, al suponer bajos riesgos de provocar hipoglucemia entre quienes la consumen.
4. Mediante estudios *in vivo*, *in vitro* e *in silico* selectos se exploraron los posibles mecanismos de acción antidiabéticos de **12**, una de las mexicanólidas mayoritarias de *S. humilis*. Éstos incluyeron:
 - a. El bloqueo de los canales de K_{ATP} pancreáticos en un sitio de unión distinto al de las sulfonilureas.

- b. El agonismo de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C}.
- c. La inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa hepática.
- d. La estimulación de la captación de glucosa por las células de músculo esquelético.
- e. Capacidad antioxidante moderada.

Estos resultados dan cuenta del carácter polifarmacológico de las mexicanólidas de *S. humilis*, de modo que el efecto farmacológico de la especie es el resultado de la acción conjunta de sus metabolitos sobre múltiples blancos moleculares.

5. Los estudios de interacción en ratones indicaron que la co-administración tanto de la mexicanólida **12** como del preparado tradicional de las semillas de *S. humilis* con glibenclamida provoca la abolición del efecto farmacológico del producto natural, del preparado, y del fármaco de referencia, mientras que la co-administración con metformina causa un aumento significativo del efecto antihiper glucémico. Tales observaciones están en concordancia con los mecanismos de acción propuestos para **12**. La información generada en estos estudios son relevantes dado el gran número de pacientes que combinan la terapia alopática con plantas medicinales y a la escasa información existente al respecto.
6. Se estableció el potencial antinociceptivo y antihiperalgésico de la decocción de *S. humilis*. La mexicanólida **12** es un agente antihiperalgésico cuyos posibles mecanismos de acción involucran primordialmente la modulación serotoninérgica, GABAérgica y opioide a niveles central y periférico. La participación de las vías nitrérgicas en el efecto de **12** parece deberse a la modulación de las vías antes señaladas.
7. La eficacia preclínica como agente antidiabético demostrada para la decocción de las semillas de *S. humilis* sustenta de manera preliminar su uso tradicional para tratar la diabetes mellitus tipo 2 y las dislipidemias. Los distintos blancos farmacológicos de los metabolitos de *S. humilis*, además de su potencial como agente antihiperalgésico, convierten a la especie en un candidato idóneo para el desarrollo de fitomedicamentos polifarmacológicos seguros para tratar la diabetes mellitus y sus complicaciones.

Bibliografía

- Aguilar-Salinas, C.A., Rojas-Martínez, R., 2012. Epidemiología de la diabetes y el síndrome metabólico en Mexico. *Ciencia* 36-45.
- Ahrén, B., 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393-410. doi:10.1007/s001250051322
- Anaya-Eugenio, G.D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J., Mata, R., 2014. Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *J. Ethnopharmacol.* 155, 416-425. doi:10.1016/j.jep.2014.05.051
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325-348. doi:10.1016/j.jep.2005.04.019
- Argáez-López, N., Wachter, N.H., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E., Lozoya, D.X., 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care* 26, 2470-1. doi:10.2337/diacare.26.8.2470
- Backonja M., Beydoun A., Edwards K.R., Schwartz S.L., Fonseca V., Hes M., et al., 1999. Gabapentin for the Symptomatic Treatment of Painful Neuropathy in Patients With Diabetes Mellitus: a Randomized Controlled Trial, *Surv. Anesthesiol.* 43, 236-237. doi:10.1097/00132586-199908000-00055.
- Bedinger, D.H., Adams, S.H., 2015. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 415, 143-156. doi:10.1016/j.mce.2015.08.013
- Bektas, N., Arslan, R., Ozturk, Y., 2014. Zonisamide: Antihyperalgesic efficacy, the role of serotonergic receptors on efficacy in a rat model for painful diabetic neuropathy. *Life Sci.* 95, 9-13. doi:10.1016/j.lfs.2013.12.012
- Benkert, P., Künzli, M., Schwede, T., 2009. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 37.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. Página web. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Página web: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Caoba&id=7041> (Acceso en Marzo 2012).
- Bilous, R., Donnelly, R., 2010. Handbook of Diabetes, Handbook of Diabetes. doi:10.1002/9781444391374
- Brown, L., Panchal, S.K., Sunil K. Panchal and Lindsay Brown, 2011. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Biomed. Biotechnol.* 2011, 1-14. doi:10.1155/2011/351982
- Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 267-277. doi:10.1038/nrm782
- Buhmann, H., le Roux, C.W., Bueter, M., 2014. The gut-brain axis in obesity. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 559-571. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.003
- Calcutt, N. a, Jorge, M.C., Yaksh, T.L., Chaplan, S.R., 1996. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 68, 293-9.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 33, 179-189. doi:S0100-879X(00)03300204 [pii]
- Camacho, M.D.R., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Solis, P.N., Marshall, S.J., Ghazanfar, S. a., 2003. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.* 89, 185-191. doi:10.1016/S0378-8741(03)00269-1
- Cardoso-Taketa, A.T., Lozada-Lechuga, J., Fragoso-Serrano, M., Villarreal, M., Pereda- Miranda, R., 2004. Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *J. Nat. Prod.* 67, 644-649. doi: 10.1021/np0304666
- Carrascoza F., Zaric S., Silaghi-Dumitrescu R., 2014. Computational study of protein secondary structure

- elements: Ramachandran plots revisited. *J. Mol. Graph. Model.* 50, 125–13
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.04.001>
- Chapman, C.R., Casey, K.L., Dubner, R., Foley, K.M., Gracely, R.H., Reading, A.E., 1985. Pain measurement: an overview. *Pain* 22, 1-31. doi:10.1016/S0885-3924(86)80031-8
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., Kamper, E., 2009. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23, 245-58.
- Ciésła, Ł., Waksmundzka-Hajnos, M., 2009. Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *J. Chromatogr. A* 1216, 1035-1052. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.057>
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), Sistema de Información para la Reforestación, Fichas técnicas. *Swietenia humilis*. Página web: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1004Swietenia%20humilis.pdf> (Acceso en Abril 2012).
- COFEPRIS. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Riesgos Potenciales por el uso de Rosiglitazona ®. Hoja Informativa. México, 2010.
- Córdova-Sintjago, T., Sakhujia, R., Kondabolu, K., Canal, C.E., Booth, R.G., 2012. Molecular determinants for ligand binding at serotonin 5-HT 2A and 5-HT 2C GPCRs: Experimental affinity results analyzed by molecular modeling and ligand docking studies, en: *International Journal of Quantum Chemistry*. pp. 3807-3814. doi:10.1002/qua.24237
- Córdova-Sintjago, T., Villa, N., Fang, L., Booth, R.G., 2014. Aromatic interactions impact ligand binding and function at serotonin 5-HT2C G protein-coupled receptors: Receptor homology modeling, ligand docking, and molecular dynamics results validated by experimental studies. *Mol. Phys.* 112, 398-407. doi:10.1080/00268976.2013.833656
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J. A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R., 2009. Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *J. Nat. Prod.* 72, 408-413. doi:10.1021/np800642d
- Cury, Y., Picolo, G., Gutierrez, V.P., Ferreira, S.H., 2011. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 25, 243-254. doi:10.1016/j.niox.2011.06.004
- Da Silva, M.N., Arruda, M.S.P., Castro, K.C.F., Da Silva, M.F.D.G.F., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., 2008. Limonoids of the phragmalin type from *Swietenia macrophylla* and their chemotaxonomic significance. *J. Nat. Prod.* 71, 1983-1987. doi:10.1021/np800312h
- Das G.F. Da Silva, M.F., Gottlieb, O.R., Dreyer, D.L., 1984. Evolution of limonoids in the Meliaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 12, 299-310. doi:10.1016/0305-1978(84)90053-X
- De, D., Chatterjee, K., Ali, K.M., Bera, T.K., Ghosh, D., 2011. Antidiabetic potentiality of the aqueous-methanolic extract of seed of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. in streptozotocin-induced diabetic male albino rat: A correlative and evidence-based approach with antioxidative and antihyperlipidemic activities. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2011. doi:10.1155/2011/892807
- De la Rosa, L.A., Vazquez-Flores, A.A., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Medina-Campos, O.N., Ávila-Nava, A., González-Reyes, S., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. *J. Funct. Foods* 7, 219-228. doi:10.1016/j.jff.2014.02.008
- Deeney, J.T., Bränström, R., Corkey, B.E., Larsson, O., Berggren, P.O., 2007. 3H-serotonin as a marker of oscillatory insulin secretion in clonal β -cells (INS-1). *FEBS Lett.* 581, 4080-4084. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.052
- Dewanjee, S., Maiti, A., Das, A.K., Mandal, S.C., Dey, S.P., 2009. Swietenine: A potential oral hypoglycemic from *Swietenia macrophylla* seed. *Fitoterapia* 80, 249-251. doi:10.1016/j.fitote.2009.02.004
- Ekins, S., Mestres, J., Testa, B., 2007a. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br. J. Pharmacol.* 152, 9-20. doi:10.1038/sj.bjp.0707305
- Ekins, S., Mestres, J., Testa, B., 2007b. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br. J. Pharmacol.* 152, 9-20. doi:10.1038/sj.bjp.0707305

- El-Kaissi, S., Sherbeeni, S., 2011. Pharmacological Management of Type 2 Diabetes Mellitus: An Update. *Curr. Diabetes Rev.* 7, 392-405. doi:10.2174/157339911797579160
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Gutiérrez J. P., Rivera J., Shamah T., Oropeza C., y Hernández Ávila M., coordinadores. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública 2012. Página web <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf> (Acceso en Noviembre 2013).
- 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. doi:10.1021/np300204p
- Eurachem, 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, Eurachem Guide, ISBN: 0-94948926-12-0. doi:978-91-87461-59-0
- Ferreira de Moura, R., Ribeiro, C., de Oliveira, J.A., Stevanato, E., de Mello, M.A.R., 2009. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br. J. Nutr.* 101, 1178-1184. doi:10.1017/S0007114508066774
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., 2014. Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metab.* 20, 953-966. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018
- Freshwater, J.D., Svensson, C.I., Malmberg, A.B., Calcutt, N. a, 2002. Elevated spinal cyclooxygenase and prostaglandin release during hyperalgesia in diabetic rats. *Diabetes* 51, 2249-55. doi:10.2337/diabetes.51.7.2249
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* 115, 173-183. doi:10.1016/j.jep.2007.10.038
- Galdino, G.S., Xavier, C.H., Almeida, R., Silva, G., Fontes, M.A., Menezes, G., Duarte, I.D., Perez, A.C., 2015. The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. *Int. J. Neurosci.* 125, 765-73. doi:10.3109/00207454.2014.970256
- Galeazzi R., Massaccesi L., Piva F., Principato G., Laudadio E., 2014. Insights into the influence of 5-HT_{2c} aminoacidic variants with the inhibitory action of serotonin inverse agonists and antagonists *J. Mol. Model.* 20:2120. doi: 10.1007/s00894-014-2120-0
- Guenette, M.D., Giacca, A., Hahn, M., Teo, C., Lam, L., Chintoh, A., Arenovich, T., Remington, G., 2013. Atypical antipsychotics and effects of adrenergic and serotonergic receptor binding on insulin secretion in-vivo: An animal model. *Schizophr. Res.* 146, 162-169. doi:10.1016/j.schres.2013.02.023
- Guerrero Analco A., 2007. Compuestos antihiperlipémicos y antinociceptivos de la especie *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae). Una contribución a la determinación de los parámetros de inocuidad, calidad y eficacia de la droga cruda. Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM.
- Haddad, P.S., Musallam, L., Martineau, L.C., Harris, C., Lavoie, L., Arnason, J.T., Foster, B., Bennett, S., Johns, T., Cuerrier, A., Coon Come, E., Coon Come, R., Diamond, J., Etapp, L., Etapp, C., George, J., Husky Swallow, C., Husky Swallow, J., Jolly, M., Kawapit, A., Mamianskum, E., Petagumskum, J., Petawabano, S., Petawabano, L., Weistche, A., Badawi, A., 2012. Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: A case study from Canadian eastern James Bay Cree traditional medicine. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2012. doi:10.1155/2012/893426
- Hahn, M., Chintoh, A., Giacca, A., Xu, L., Lam, L., Mann, S., Fletcher, P., Guenette, M., Cohn, T., Wolever, T., Arenovich, T., Remington, G., 2011. Atypical antipsychotics and effects of muscarinic, serotonergic, dopaminergic and histaminergic receptor binding on insulin secretion in vivo: An animal model. *Schizophr. Res.* 131, 90-95. doi:10.1016/j.schres.2011.06.004
- Hajduch, E., Rencurel, F., Balendran, a., Batty, I.H., Downes, C.P., Hundal, H.S., 1999. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a Novel Regulator of Glucose Transport in Rat Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 274, 13563-13568. doi:10.1074/jbc.274.19.13563
- Hajjalizadeh, Z., Nasri, S., Kaeidi, A., Sheibani, V., Rasoulia, B., Esmaeili-Mahani, S., 2014. Inhibitory effect of *Thymus caramanicus* Jalas on hyperglycemia-induced apoptosis in in vitro and in vivo models of diabetic neuropathic pain. *J. Ethnopharmacol.* 153, 596-603.

- doi:10.1016/j.jep.2014.02.049
- Hao S, Ogawa H., 1998. Sevoflurane suppresses behavioral response in the rat formalin test: combination with intrathecal lidocaine produced profound suppression of the response. *Neurosci. Lett.* 248, 124-126. doi:10.1016/S0304-3940(98)00282-1
- Hardie, D.G., 2013. Metformin - Acting through cyclic AMP as well as AMP? *Cell Metab.* 17, 313-314. doi:10.1016/j.cmet.2013.02.011
- Henquin, J.C., Dufrane, D., Nenquin, M., 2006. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55, 3470-7. doi:10.2337/db06-0868
- Henquin, J.C., 2009. Regulation of insulin secretion: A matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739-751. doi:10.1007/s00125-009-1314-y
- Henquin, J.C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760. doi:10.2337/diabetes.49.11.1751
- Henquin, J.C., Nenquin, M., Ravier, M. a, Szollosi, a, 2009. Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes. Obes. Metab.* 11 Suppl 4, 168-179. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01109.x
- Hernández F., 1959. *Historia Natural de Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 447-448.
- Hillisch, A., Pineda, L.F., Hilgenfeld, R., Ekins, S., Mestres, J., Testa, B., Arbor, A., 2004. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov. Today* 9, 659-669. doi:10.1016/S1359-6446(04)03196-4
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zhou, K., 2010. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr. Metab. (Lond)*. 7, 71. doi:10.1186/1743-7075-7-71
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. a., Prior, R.L., 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4437-4444. doi:10.1021/jf0201529
- Huang, S., Czech, M.P., 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* 5, 237-252. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.006
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-114. doi:10.1016/0304-3959(87)90088-1
- ICH, International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Step 4 version. 13 p.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, sixth ed.], International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2013, pp. 11-13. Página web: <http://www.idf.org/diabetesatlas> (Acceso noviembre 2015).
- Israili, Z.H., 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 18, 117-152. doi:10.1097/MJT.0b013e3181afb51
- Jalving, M., Gietema, J. a., Lefrandt, J.D., Jong, S. De, Reyners, A.K.L., Gans, R.O.B., Vries, E.G.E. De, 2010. Metformin: Taking away the candy for cancer? *Eur. J. Cancer* 46, 2369-2380. doi:10.1016/j.ejca.2010.06.012
- Jensen, N.H., Cremers, T.I., Sotty, F., 2010. Therapeutic potential of 5-HT_{2C} receptor ligands. *ScientificWorldJournal*. 10, 1870-1885. doi:10.1100/tsw.2010.180
- Jimenez, A., Villarreal, C., Toscano, R.A., Cook, M., Arnason, J.T., Bye, R., Mata, R., 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry* 49, 1981-1988. doi:10.1016/S0031-9422(98)00364-1
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *J. Ethnopharmacol.* 161, 36-45. doi:10.1016/j.jep.2014.11.052
- Kablan, A., A.Saunders, R., Szkudlarek-Mikho, M., J.B. Chin, A., M. Bosio, R., 2010. Prieurianin Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice and Inhibits Adipogenesis in Cultured Preadipocytes. *J.*

- Diabetes Metab. 01, 1-5. doi:10.4172/2155-6156.1000101
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846. doi:10.1038/nature05482
- Kamei, J., Kawashima, N., Kasuya, Y., 1992. Naloxone-induced analgesia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 210, 339-341. doi:10.1016/0014-2999(92)90424-3
- Kawahito, S., Kitahata, H., Oshita, S., 2009. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* 15, 4137-4142. doi:10.3748/wjg.15.4137
- Kecskemeti, V., Bagi, Z., Pacher, P., Posa, I., Kocsis, E., Koltai, M.Z., 2002. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Curr. Med. Chem.* 9, 53-71.
- Krentz, A.J., Bailey, A.J., 2005. Oral antidiabetic agents: Current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65, 385-411.
- Kolesnikov Y.A., Chereshev I., Criesta M., Pan Y.-X., Pasternak G.W., 2009. Opposing actions of neuronal nitric oxide synthase isoforms in formalin-induced pain in mice., *Brain Res.* 1289, 14-21. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.041.
- Lam, C.K.L., Chari, M., Lam, T.K.T., 2009. CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 24, 159-170. doi:10.1152/physiol.00003.2009
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* doi:10.1107/S0021889892009944
- Lee J., Back S.K., Lim E.J., Cho G.C., Kim M.A., Kim H.J., et al. 2010. Are spinal GABAergic elements related to the manifestation of neuropathic pain in rat?, *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 14, 59-69. doi:10.4196/kjpp.2010.14.2.59.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597-652.
- Leney, S.E., Tavaré, J.M., 2009. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *J. Endocrinol.* 203, 1-18. doi:10.1677/JOE-09-0037
- Leto, D., Saltiel, A.R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 383-396. doi:10.1038/nrm3351
- Leturque, A., Brot-Laroche, E., Le Gall, M., 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E985-E992. doi:10.1152/ajpendo.00004.2009
- Liu, K.K.C., Lefker, B. a., Dombroski, M. a., Chiang, P., Cornelius, P., Patterson, T. a., Zeng, Y., Santucci, S., Tomlinson, E., Gibbons, C.P., Marala, R., Brown, J. a., Kong, J.X., Lee, E., Werner, W., Wenzel, Z., Giragossian, C., Chen, H., Coffey, S.B., 2010. Orally active and brain permeable proline amides as highly selective 5HT2c agonists for the treatment of obesity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20, 2365-2369. doi:10.1016/j.bmcl.2010.01.107
- Lorenzati, B., Zucco, C., Miglietta, S., Lamberti, F., Bruno, G., 2010. Oral hypoglycemic drugs: Pathophysiological basis of their mechanism of action. *Pharmaceuticals* 3, 3005-3020. doi:10.3390/ph3093005
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275-287. doi:10.1007/BF01234480
- Lovell S.C., Davis I. W., Arendall III W. B., de Bakker P. I.W., Word J. M., Prisant M. G., Richardson J.S., Richardson D. C., 2003. Structure Validation by C α Geometry: ϕ , ψ and C β Deviation. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 50, 437-450. doi: 10.1002/prot.10286
- Lu, C., Jin, F., Li, C., Li, W., Liu, G., Tang, Y., 2011. Insights into binding modes of 5-HT2c receptor antagonists with ligand-based and receptor-based methods. *J. Mol. Model.* 17, 2513-2523. doi:10.1007/s00894-010-0936-9
- Lukačínová, A., Hubková, B., Rácz, O., Ništiar, F., 2013. Animal models for study of diabetes mellitus. *Diabetes mellitus- Insights Perspect.* 2030, 229-254. doi:42083
- Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G.M., 1998. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chemie Int. Ed.* 37, 2754-2794. doi:10.1002/(sici)1521-3773(19981102)37:20<2754::aid-anie2754>3.0.co;2-3

- Martineau, L.C., Adeyiwola-Spoor, D.C. a, Vallerand, D., Afshar, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2010. Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, Metformin-like mechanism. *J. Ethnopharmacol.* 127, 396-406. doi:10.1016/j.jep.2009.10.026
- Martineau, L.C., Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Mai Le, P., Prentki, M., Bennett, S. a., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2006. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine* 13, 612-623. doi:10.1016/j.phymed.2006.08.005
- Martínez M., 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. p.120.
- 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. doi:10.2337/diabetes.47.2.224
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J. Nat. Prod.* 76, 468-483. doi:10.1021/np300869g
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474. doi:10.1016/S0301-0082(02)00009-6
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785-2791. doi: 10.1002/jcc.21256
- Morris, L.J., 1966. Separations of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid Res.* 7, 717-732.
- Mulholland, D.A., Taylor, D.A.H., 1988. Limonoid extractives from the genera *Capuronianthus*, *neobegonia* and *Quivisanthe*. *Phytochemistry* 27, 1741-1743. doi:10.1016/0031-9422(88)80435-7
- Munro G., Ahring P.K., Mirza N.R. 2009. Developing analgesics by enhancing spinal inhibition after injury: GABAA receptor subtypes as novel targets., *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 453-459. doi:10.1016/j.tips.2009.06.004.
- Nachar, A., Vallerand, D., Musallam, L., Lavoie, L., Badawi, A., Arnason, J., Haddad, P.S., 2013. The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013, 189819. doi:10.1155/2013/189819
- Nakai K., Nakae A., Oba S., Mashimo T., Ueda K. 2010. 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain., *Eur. J. Pain.* 14, 999-1006. doi:10.1016/j.ejpain.2010.04.008.
- Nature News Blog. US agency reverses stance on controversial diabetes drug. Página web. <http://blogs.nature.com/news/2013/11/fda-reverses-stance-on-controversial-diabetes-drug.html> (Acceso Enero 2016).
- Navarrete, A., Flores, A., Sixtos, C., Reyes, B., 2003. Análisis isoblográfico de la interacción entre α -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida y piperina sobre la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus* Say. *Rev. la Soc. Quim. México* 47, 178-185.
- Ndengele M.M., Cuzzocrea S., Esposito E., Mazzon E., Di Paola R., Matuschak G.M., et al., 2008. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity., *FASEB J.* 22, 3154-3164. doi:10.1096/fj.08-108159.
- Nemmani, K.V.S., Mogil, J.S., 2003. Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia. *Neuropharmacology* 44, 304-10. doi:10.1016/S0028-3908(02)00374-X
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., Lange, A.J., 1999. Regulation of Glucose Production By the Liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 379-406.
- Norma Oficial Mexicana, 1999. NOM-062- ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Secretaría de Salud, 58 p.
- SSA. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana, 2010. NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. México, 36 p.

- O'Rahilly, S., 2009. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462, 307-314. doi:10.1038/nature08532
- Obata, H., Saito, S., Sasaki, M., Goto, F., 2002. Possible involvement of a muscarinic receptor in the anti-allodynic action of a 5-HT₂ receptor agonist in rats with nerve ligation injury. *Brain Res.* 932, 124-128.
- Obrosova, I.G., 2009. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics* 6, 638-47. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.004
- Okorie, D.A., Taylor, D.A.H., 1971. Meliaceae limonoids from *Swietenia humilis* d. a. *Phytochem. Reports* 10, 469-470.
- Ono, E., Inoue, J., Hashidume, T., Shimizu, M., Sato, R., 2011. Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 677-681. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.055
- OMS, 2011. Organización Mundial de la Salud. Essential Medicines and Health Products Information Portal. Página web. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/> (Acceso en Julio 2013).
- OMS, 2015. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva no. 312. Página web. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> (Acceso Noviembre 2015)
- Ovalle-Magallanes, B., Déciga-Campos, M., Mata, R., 2015a. Antinociceptive and hypoglycaemic evaluation of *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron Asteraceae. *J. Pharm. Pharmacol.* 67, 1733-1743 doi:10.1111/jphp.12477
- Ovalle-Magallanes, B., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Mata, R., 2015b. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 110, 111-119. doi:10.1016/j.phytochem.2014.11.004
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevšek, M., Fink, H., Rupnik, M., Walther, D.J., 2009. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* 7, 1-10. doi:10.1371/journal.pbio.1000229
- Pérez-Fuentes, R., Baez-Duarte, B.G., Zamora-Ginez, I., Ruiz-Vivanco, G., Pulido-Pérez, P., Nieva-Vázquez, A., Gonzalez-Mejia, M.E., Torres-Rasgado, E., 2014. Early decrease of insulin sensitivity in offspring of individuals with type 2 diabetes. The Mexican Diabetes Prevention Study. *Arch. Med. Res.* 45, 217-22. doi:10.1016/j.arcmed.2014.01.007
- Pérez-Rubio, V., Basilio-Heredia, J., et al., 2012. Physicochemical characterization and fatty acid content of 'venadillo' (*Swietenia humilis* Zucc.) seed oil. *African J. Biotechnol.* 11, 6138-6142. doi:10.5897/AJB11.2674
- Pichon, X., Wattiez, A.S., Becamel, C., Ehrlich, I., Bockaert, J., Eschalier, A., Marin, P., Courteix, C., 2010. Disrupting 5-HT_{2A} receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol. Ther.* 18, 1462-1470. doi:10.1038/mt.2010.101
- Polakof, S., Mommsen, T.P., Soengas, J.L., 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 160, 123-149. doi:10.1016/j.cbpb.2011.07.006
- Prabhakar P. K., Doble M., 2009. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine* 16, 1119-1126. doi:10.1016/j.phymed.2009.05.021
- Prabhakar P. K., Doble M., 2011. Interaction of Cinnamic Acid Derivatives with Commercial Hypoglycemic Drugs on 2-Deoxyglucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 9835-9844. dx.doi.org/10.1021/jf2015717
- Prabhakar, P.K., Kumar, A., Doble, M., 2014. 10. Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. *Phytomedicine* 21, 123-30. doi:10.1016/j.phymed.2013.08.020
- Prentki, M., Matschinsky, F.M., Madiraju, S.R.M., 2013. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab.* 18, 162-185. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.018
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., Felšöci, M., 2011. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res.* 60, 15-25. doi:931903 [pii]
- Richmond, J.E., Codignola, A., Cooke, I.M. and Sher, E., 1996. Calcium- and barium-dependent exocytosis

- from the rat insuli- noma cell line RINm5F assayed using membrane capacitance measurements and serotonin release. *Pflugers Arch.* 432(2):258-69. doi: 10.1007/s004240050132 432, 258-269
- Robertson, R.P., Harmon, J., Oahan Tran, P., Tanaka, Y., Takahashi, H., 2003. Glucose Toxicity in beta Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes* 52, 581-587. doi:10.1016/S0891-5849(02)01371-0
- Rodriguez-Diaz, R., Abdulreda, M.H., Formoso, A.L., Gans, I., Ricordi, C., Per-Olof, B., Caicedo, A., 2011. Autonomic Axons in the Human Endocrine Pancreas. *Cell Metab.* 14, 45-54. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.008.
- Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L. et al, 2009. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos , Mexico. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* 8, 380-388.
- Roy, A., Saraf, S., 2006. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 191-201. doi:10.1248/bpb.29.191
- Russo, G.L., Russo, M., Ungaro, P., 2013. AMP-activated protein kinase: A target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 86, 339-350. doi:10.1016/j.bcp.2013.05.023
- Sachs, D., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3680-3685. doi:10.1073/pnas.0308382101
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806. doi:10.1038/414799a
- Sandoval, D. a, Obici, S., Seeley, R.J., 2009. Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 386-398. doi:10.1038/nrd2874
- Sato, R., 2013. *Nomilin as an Anti-Obesity and Anti-Hyperglycemic Agent*, 1.^a ed, Vitamins and Hormones. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-407766-9.00018-3
- Scheepers, A., Joost, H.-G., Schurman, A., 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 28: 364-371, doi: 10.1177/0148607104028005364
- Schmoll, D., Walker, K.S., Alessi, D.R., Grempler, R., Burchell, a, Guo, S., Walther, R., Unterman, T.G., 2000. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J. Biol. Chem.* 275, 36324-36333. doi:10.1074/jbc.M003616200
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B., 1993. New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 1567-1574.
- Seeliger, D., De Groot, B.L., 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24, 417-422. doi:10.1007/s10822-010-9352-6
- Shang, N., Saleem, A., Musallam, L., Walshe-Roussel, B., Badawi, A., Cuerrier, A., Arnason, J.T., Haddad, P.S., 2015. Novel Approach to Identify Potential Bioactive Plant Metabolites: Pharmacological and Metabolomics Analyses of Ethanol and Hot Water Extracts of Several Canadian Medicinal Plants of the Cree of Eeyou Istchee. *PLoS One* 10, e0135721. doi:10.1371/journal.pone.0135721
- Shi, X., Li, X., Clark, J.D., 2005. Formalin injection causes a coordinated spinal cord CO/NO-cGMP signaling system response. *Mol. Pain* 1, 33. doi:10.1186/1744-8069-1-33
- Srinivasan, K., Ramarao, P., 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 125, 451-472.
- Standley, PC. *Trees and Shrubs of Mexico*. United States National Herbarium, Washington, D.C., 1920-1926, pp. 560-568.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537-546.
- Tahara, a., Matsuyama-Yokono, a., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M., 2008. Effects of antidiabetic drugs on glucose tolerance in streptozotocin- nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic mice. *Horm. Metab. Res.* 40, 880-886. doi:10.1055/s-0028-1087167
- Tallarida, R.J., 2000. *Drug synergism and dose-effect data analysis*. Champman & Hall/CRC Press, Boca

- Raton. Florida.
- Tan, Q.G., Luo, X.D., 2011. Meliaceous limonoids: Chemistry and biological activities. *Chem. Rev.* 111, 7437-7522. doi:10.1021/cr9004023
- Tassorelli C., Greco R., Wang D., Sandrini G., Nappi G., 2006. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 103-7. doi:10.1016/j.ejphar.2006.01.023.
- Tesfaye, S., 2015. Neuropathy in diabetes. *Medicine (Baltimore)*. doi:10.1016/j.mpmed.2010.08.012
- Thorens, B., Mueckler, M., 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, 141-145. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455-61. doi:10.1002/jcc.21334
- Verspohl, E.J., 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med.* 68, 581-590. doi:10.1055/s-2002-32894
- Viguier, F., Michot, B., Kayser, V., Bernard, J.F., Vela, J.M., Hamon, M., Bourgoin, S., 2012. GABA, but not opioids, mediates the anti-hyperalgesic effects of 5-HT7 receptor activation in rats suffering from neuropathic pain. *Neuropharmacology* 63, 1093-1106. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.023
- Vuong, T., Benhaddou-Andaloussi, a, Brault, a, Harbilas, D., Martineau, L.C., Vallerand, D., Ramassamy, C., Matar, C., Haddad, P.S., 2009. Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice. *Int. J. Obes. (Lond)*. 33, 1166-1173. doi:10.1038/ijo.2009.149
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97-110. doi:10.1016/j.fitote.2010.11.016
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369-376. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
- Williamson, E.M., 2001. A9.Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8, 401-409. doi:10.1078/0944-7113-00060
- Wilson, R.D., Islam, M.S., 2012. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol. Rep.* 64, 129-39. doi:10.1016/S1734-1140(12)70739-9
- Witters, L. a., 2001. The blooming of the French lilac. *J. Clin. Invest.* 108, 1105-1107. doi:10.1172/JCI200114178
- Wojcikowski, K., Gobe, G., 2014. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytother. Res.* 28, 22-7. doi:10.1002/ptr.4966
- Xiao, B., Sanders, M.J., Carmena, D., Bright, N.J., Haire, L.F., Underwood, E., Patel, B.R., Heath, R.B., Walker, P. a, Hallen, S., Giordanetto, F., Martin, S.R., Carling, D., Gamblin, S.J., 2013. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* 4, 1-17. doi:10.1038/ncomms4017
- Yabe, D., Seino, Y., 2011. Two incretin hormones GLP-1 and GIP : Comparison of their actions in insulin secretion and b cell preservation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 107, 248-256. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.010
- Zeilhofer H.U., Möhler H., Di Lio A.. 2009. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists, *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 397-402. doi:10.1016/j.tips.2009.05.007.
- Zhang, Q., Zhu, Y., Zhou, W., Gao, L., Yuan, L., Han, X., 2013. Serotonin Receptor 2C and Insulin Secretion. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0054250
- Zhao, L., Wientjes, M.G., Au, J.L.S., 2004. Evaluation of combination chemotherapy: Integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin. Cancer Res.* 10, 7994-8004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1087
- Zhou, L., Sutton, G.M., Rochford, J.J., Semple, R.K., Lam, D.D., Oksanen, L.J., Thornton-Jones, Z.D., Clifton, P.G., Yueh, C.Y., Evans, M.L., McCrimmon, R.J., Elmquist, J.K., Butler, A. a., Heisler, L.K., 2007. Serotonin 2C Receptor Agonists Improve Type 2 Diabetes via Melanocortin-4 Receptor Signaling Pathways. *Cell Metab.* 6, 398-405. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.008
- Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.

Pain. 16, 109–110.

Zuo, Z., Chen, G., Luo, X., Puah, C., Zhu, W., Chen, K., Jiang, H., 2007. Pharmacophore-directed homology modeling and molecular dynamics simulation of G protein-coupled receptor: Study of possible binding modes of 5-HT_{2C} receptor agonists. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39, 413-422. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00295.x

Anexos

Anexo 1: Espectros de RMN de las mexicanólidas aisladas en la presente investigación.

Anexo 2: Espectros de masas y de infrarrojo de las humilinólidas G (13) y H (15).

Anexo 3: Datos cristalográficos de la Humilinólida G (13).

Anexo 4: Parámetros de selectividad del método por CLAE para la cuantificación de las mexicanólidas de *S. humilis*.

Anexo 5: Cursos temporales del efecto hipoglucemiante agudo de preparados y compuestos de *S. humilis* en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.

Anexo 6: Diagramas de Ramachandran de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{2B}, y modelo del receptor 5-HT_{2C} con residuos de aminoácidos selectos.

Anexo 7: Publicación derivada del trabajo doctoral: Ovalle-Magallanes B., Medina-Campos O. N., Pedraza-Chaverri J., Mata R. **2015**. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*, 110: 111–119.

Anexo 1: Espectros de RMN de las mexicanólidas aisladas en la presente investigación.

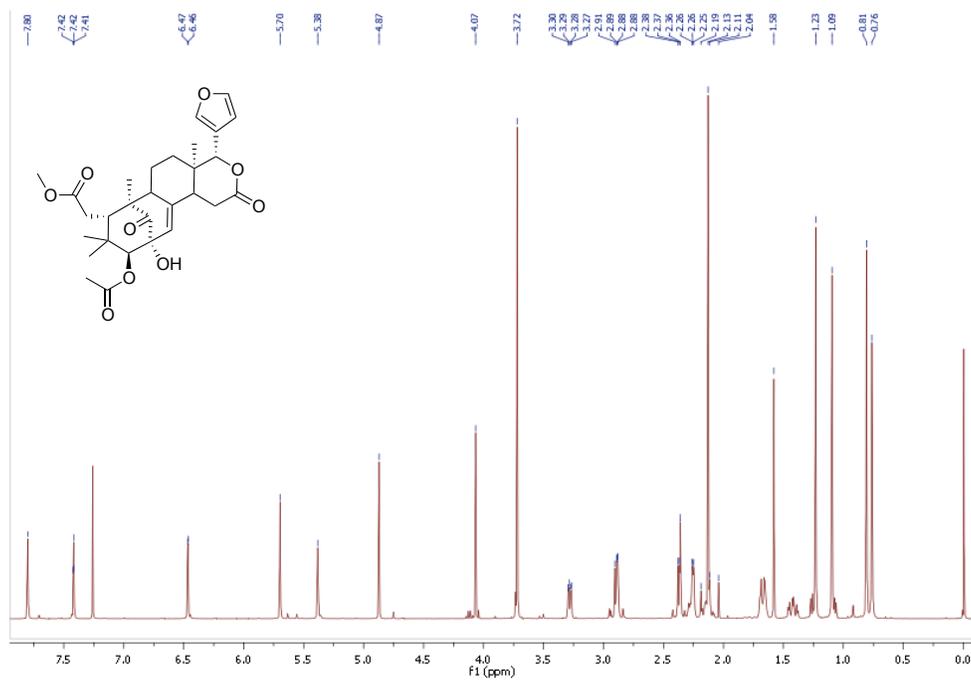


Figura A1. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) del acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**).

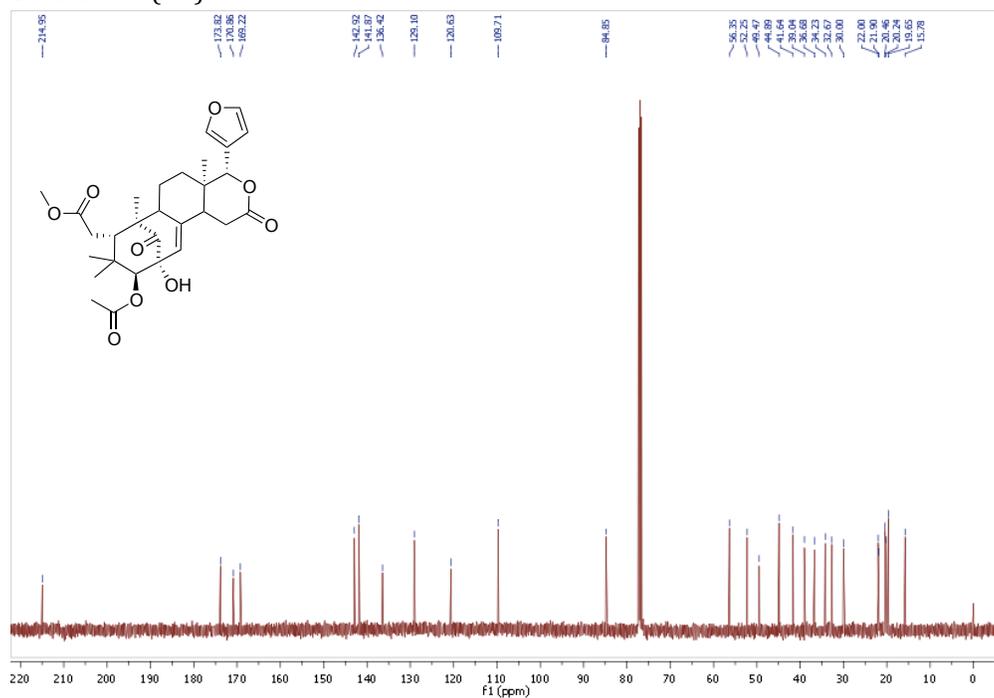


Figura A2. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) del acetato de 2-hidroxi-destigloil-6-deoxiswietenina (**12**).

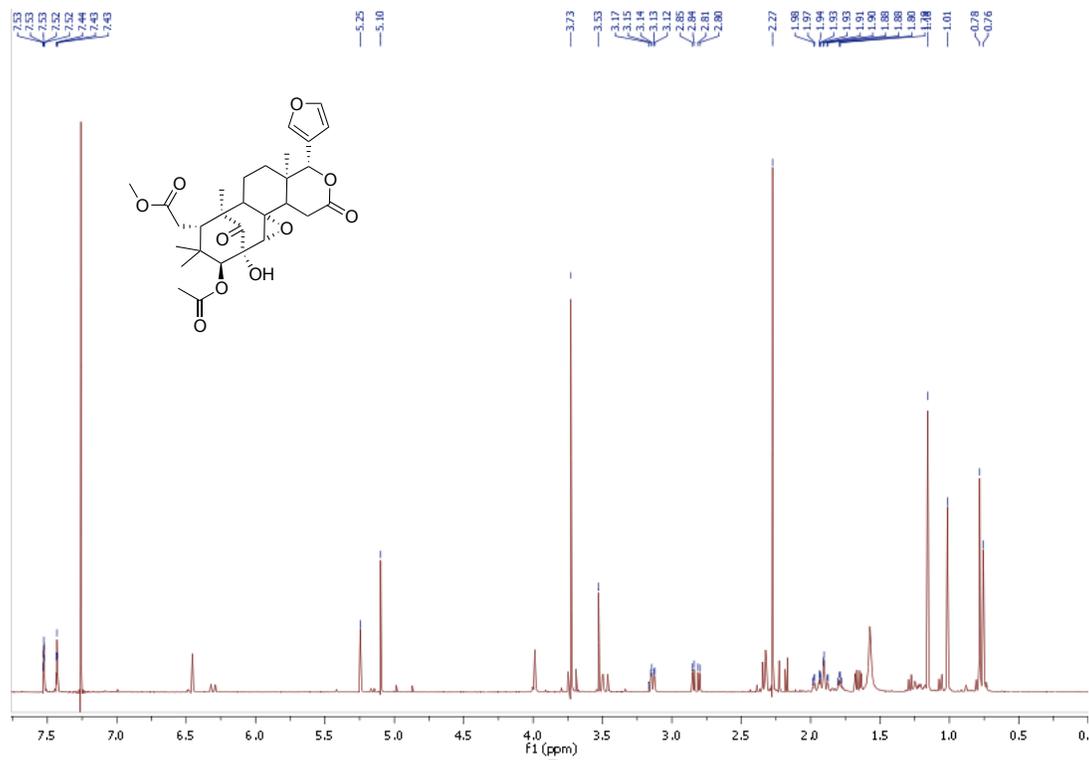


Figura A3. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) de la humilina B (1).

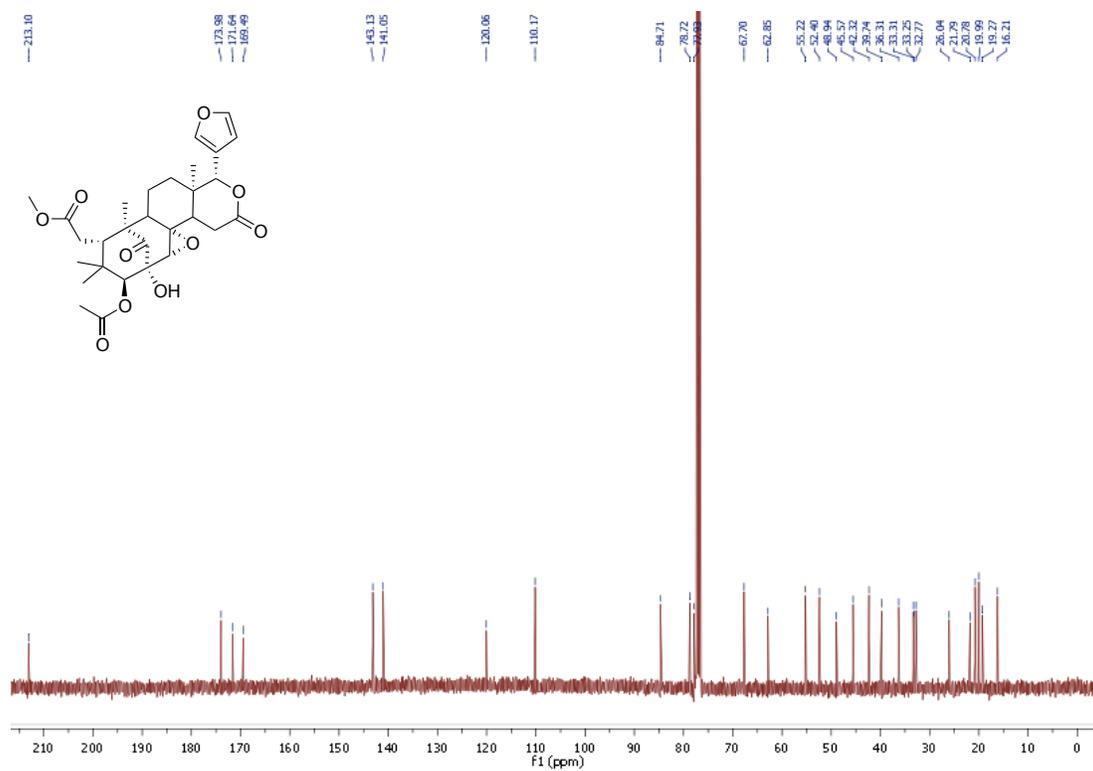


Figura A4. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) de la humilina B (1).

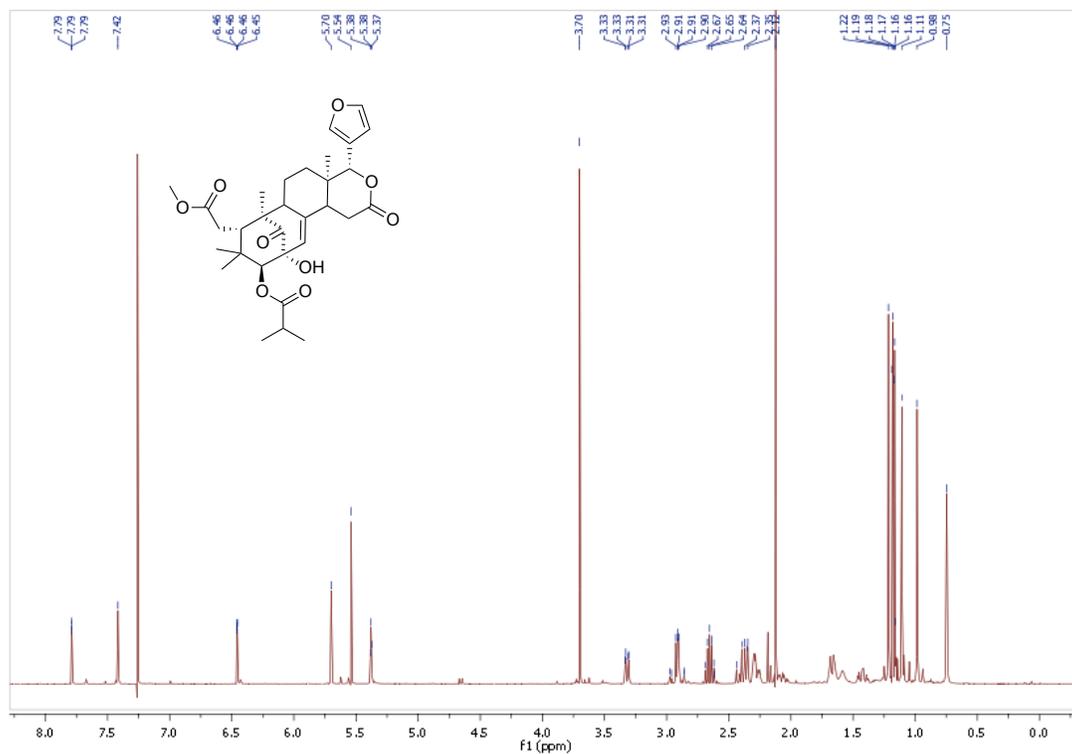


Figura A5. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (2).

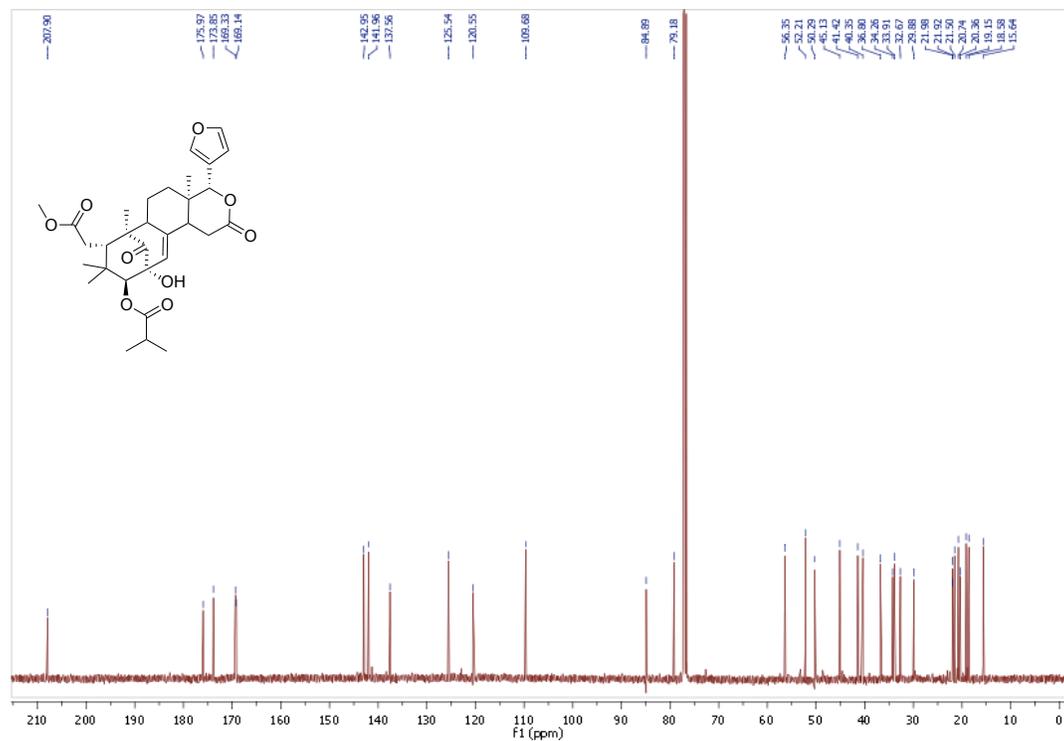


Figura A6. Espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) del metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (2).

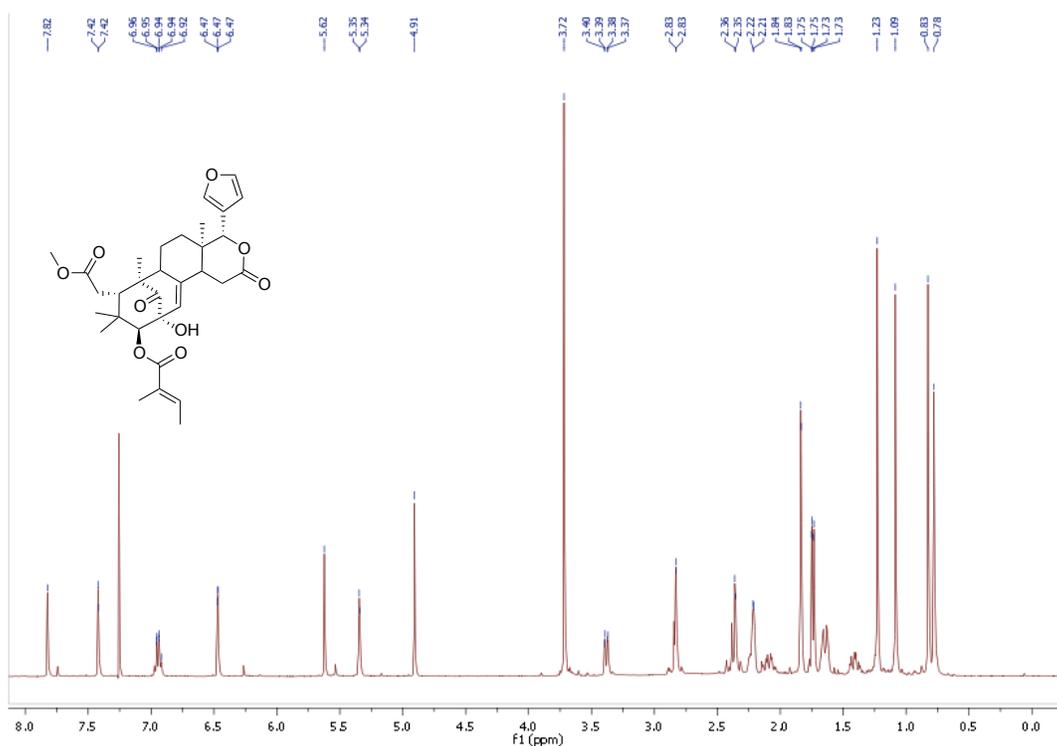


Figura A7. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) del metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**).

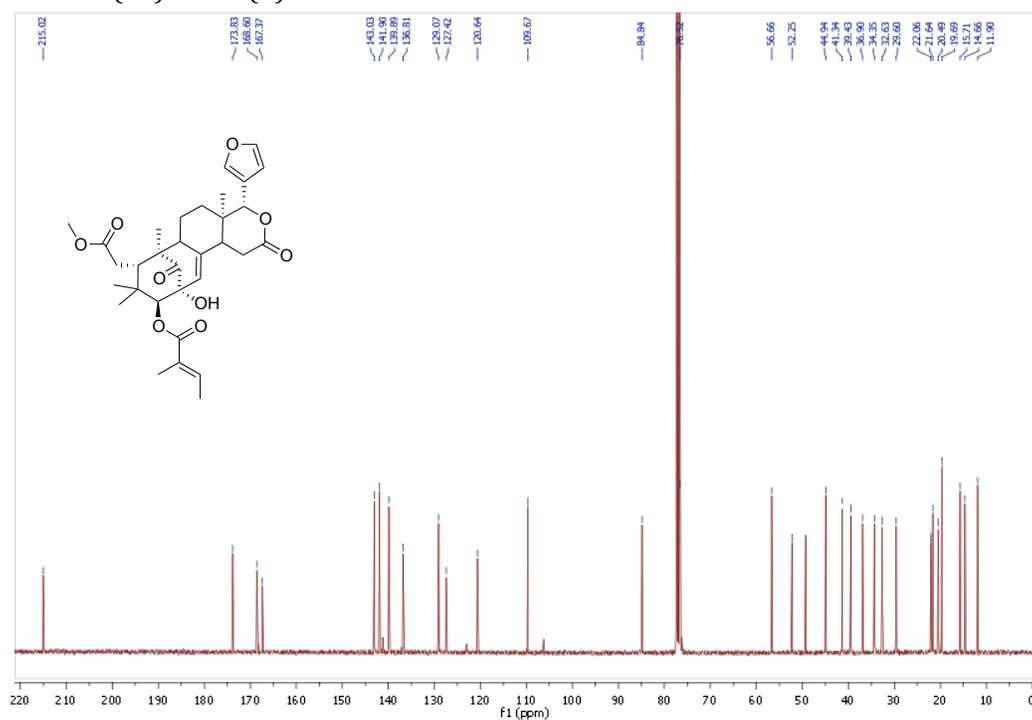


Figura A8. Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) del metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**).

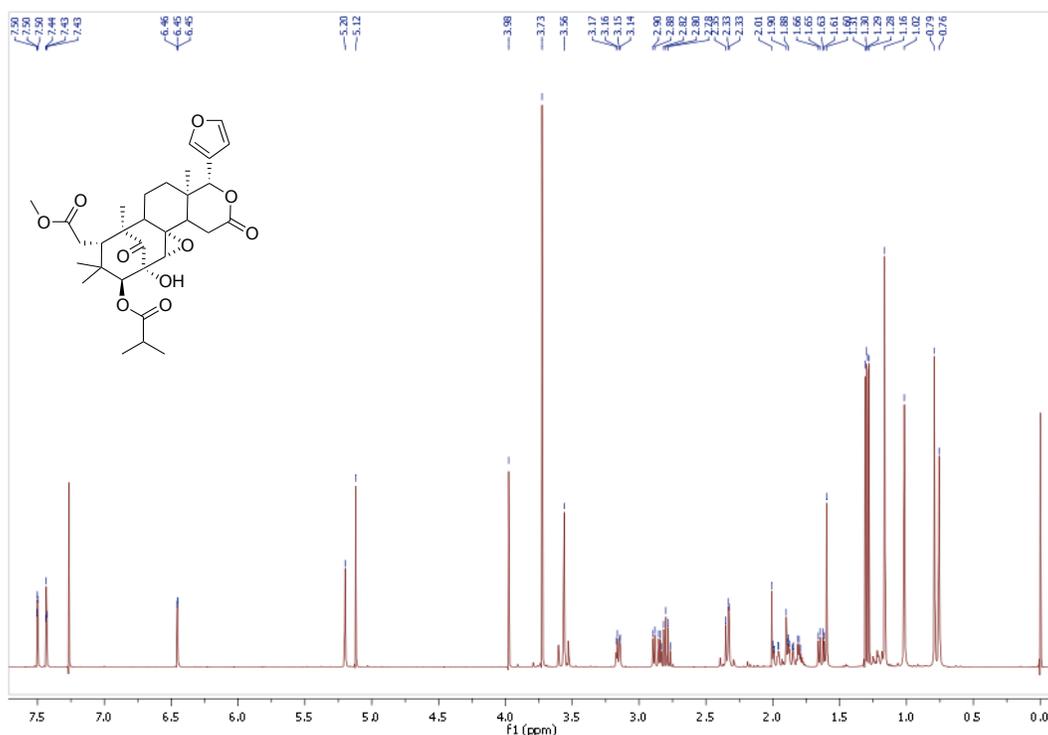


Figura A9. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) del metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**13**).

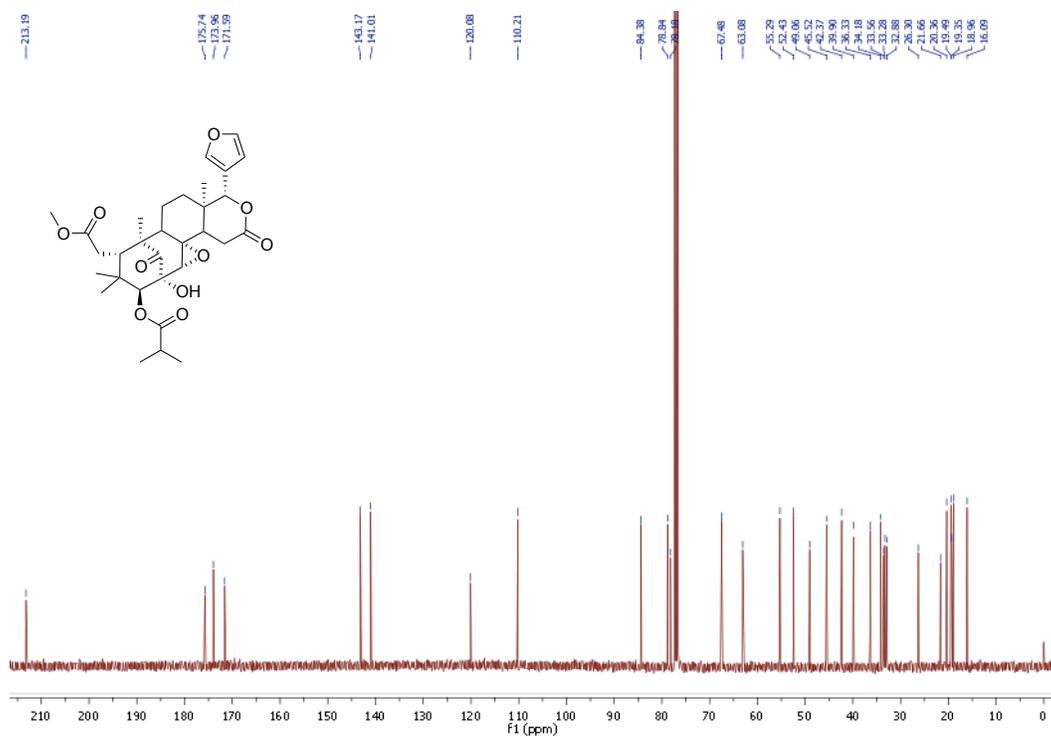


Figura A10. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) metil-2-hidroxi-3- β -isobutiroxi-8 α ,30 α -epoxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**13**).

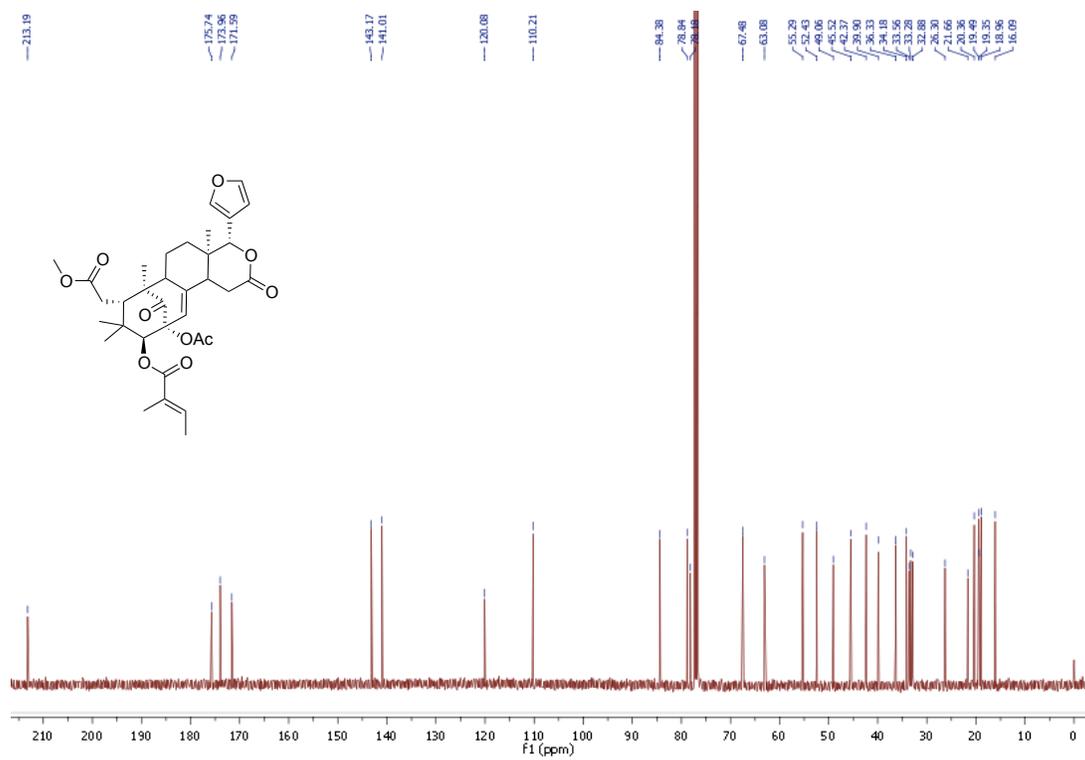


Figura A11. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) de la humilinólida C (6).

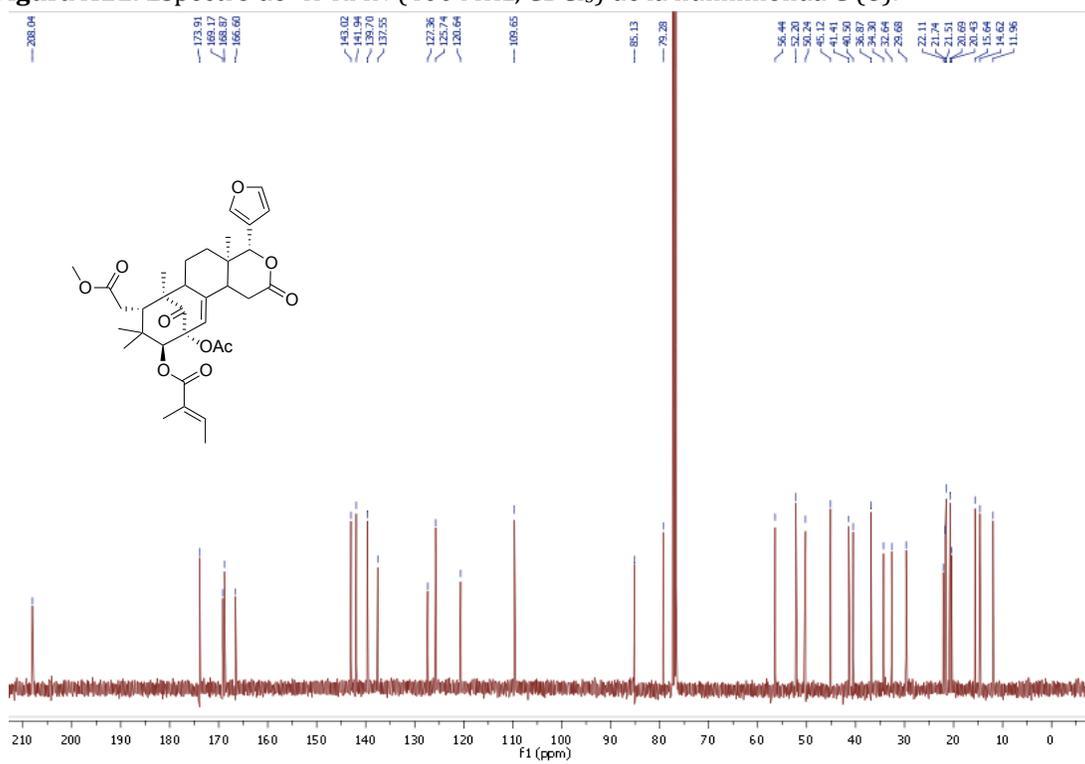


Figura A12. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) de la humilinólida C (6).

Anexo 2: Espectros de masas y de infrarrojo de las humilinólidas G (13) y H (15)

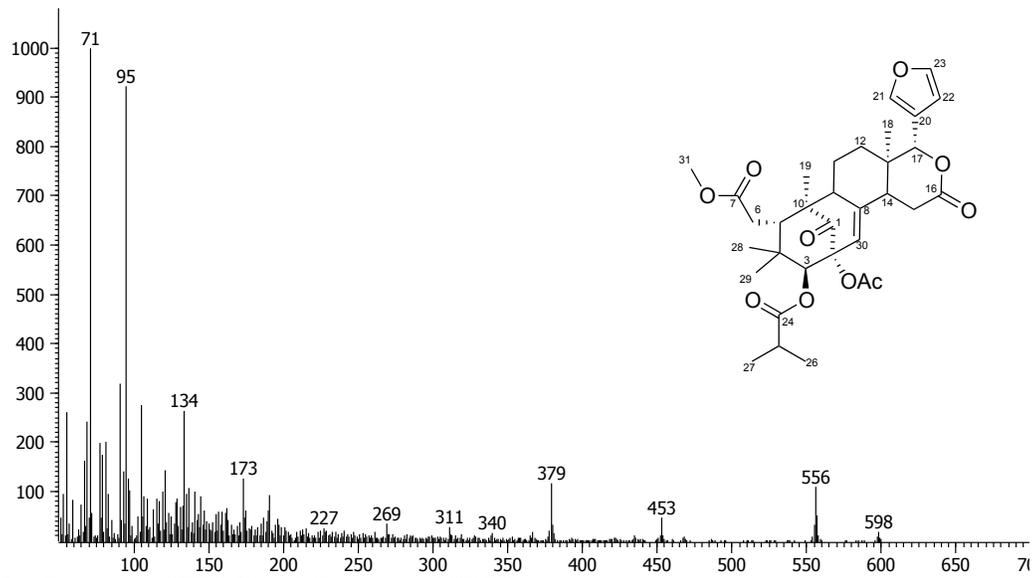


Figura A1. Espectro de masas obtenido por la técnica de impacto electrónico de la Humilinólida G (13).

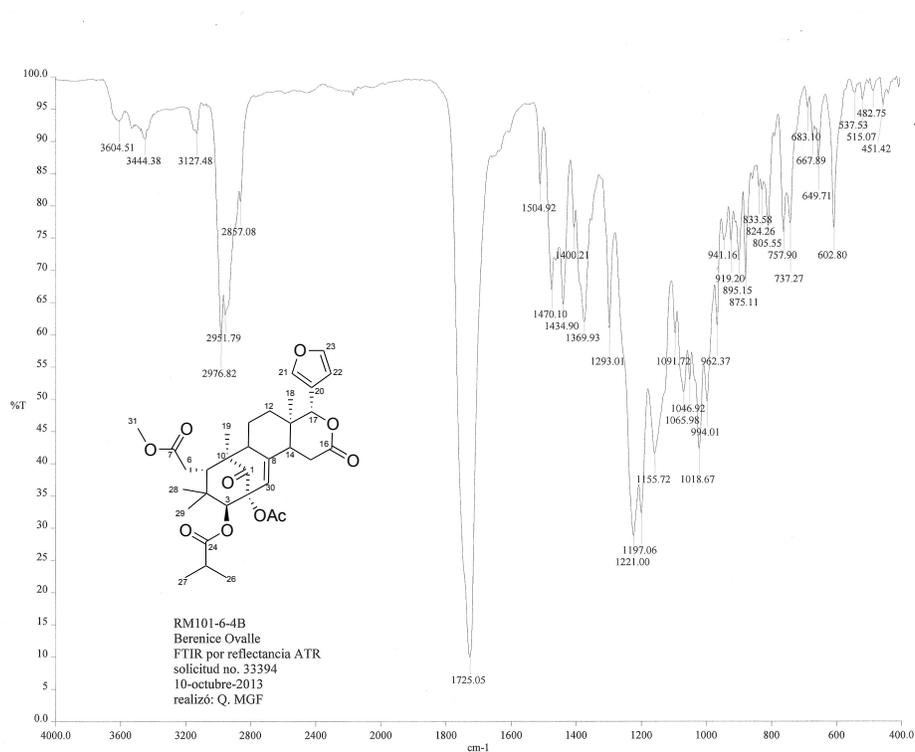


Figura A2. Espectro de infrarrojo de la Humilinólida G (13).

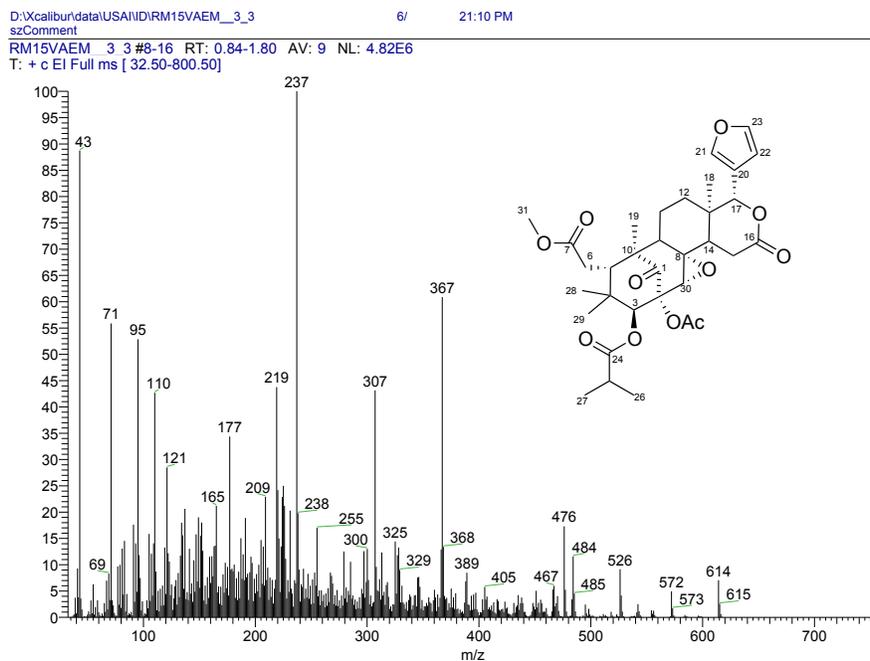


Figura A3. Espectro de masas obtenido por la técnica de impacto electrónico de la Humilinólida H (15).

Anexo 3: Datos cristalográficos de la Humilinólida G (13)**Tabla A1.** Datos cristalográficos y refinamiento para la humilinólida G (13).

Fórmula empírica	$C_{33}H_{42}O_{10}$	
Peso molecular	598.66	
Temperatura	298(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Orthorhombic	
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$	
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 12.5734(2)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 15.7095(3)$ Å	$\beta = 90^\circ$
	$c = 16.0262(3)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$3165.52(10)$ Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.256 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.092 mm ⁻¹	
$F(000)$	1280	
Tamaño del cristal / color / forma	0.476 × 0.378 × 0.330 mm / incoloro / prisma	
Rango theta para colección de datos	2.433 a 27.491°	
Rangos de índice	$-16 \leq h \leq 16, -20 \leq k \leq 20, -20 \leq l \leq 20$	
Reflecciones colectadas	31115	
Reflecciones independientes	7263 [$R(\text{int}) = 0.0394$]	
Integridad para theta = 25.242°	99.8 %	
Dispositivo de medición	Bruker Smart Apex CCD diffractometer 01-670-01	
Corrección de absorción	Semi-empirical from equivalents	
Transmisión max. y min	0.9713 and 0.9589	
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F^2	
Datos / restricciones / parámetros	7263 / 179 / 474	
Ajuste en F^2	1.024	
Índices R finales [$I > 2s(I)$]	$R1 = 0.0466, wR2 = 0.1148$	
Índices R (todos los datos)	$R1 = 0.0646, wR2 = 0.1284$	
Parámetro de estructura absoluta	? (Merged data)	
Mayor diferencia	0.206 and -0.251 e.Å ⁻³	
Notas	Desorden residual medio 14%	

Tabla A2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópicos equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para la humilinólida G (**13**). $U(\text{eq})$ es un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij} .

	x	y	z	U(eq)
O(1)	8726(2)	3044(1)	5389(1)	66(1)
O(2)	9072(2)	4724(1)	5711(1)	56(1)
O(3)	8181(2)	5001(1)	7563(1)	51(1)
O(4)	6006(2)	3444(2)	8805(1)	66(1)
O(5)	6675(3)	2317(2)	9466(1)	80(1)
O(6)	5443(2)	6732(2)	6577(2)	78(1)
O(7)	4623(2)	5600(1)	7026(1)	54(1)
O(8)	2527(2)	3913(2)	8553(2)	87(1)
C(1)	8288(2)	3324(2)	6002(2)	49(1)
C(2)	8409(2)	4244(2)	6275(2)	45(1)
C(3)	8788(2)	4309(2)	7191(2)	46(1)
C(4)	8595(2)	3486(2)	7692(2)	49(1)
C(5)	7487(2)	3134(2)	7441(2)	44(1)
C(6)	7078(3)	2442(2)	8046(2)	56(1)
C(7)	6532(3)	2809(2)	8795(2)	57(1)
C(8)	6431(2)	4188(2)	5993(2)	42(1)
C(9)	6391(2)	3225(2)	6086(2)	48(1)
C(10)	7436(2)	2866(2)	6492(2)	48(1)
C(11)	5369(2)	2929(2)	6531(2)	57(1)
C(12)	4381(3)	3329(2)	6165(2)	61(1)
C(13)	4404(2)	4309(2)	6131(2)	50(1)
C(14)	5409(2)	4596(2)	5663(2)	49(1)
C(15)	5434(3)	5572(2)	5636(2)	55(1)
C(16)	5201(2)	6007(2)	6442(2)	53(1)
C(17)	4483(2)	4668(2)	7020(2)	45(1)

C(18)	3398(3)	4628(3)	5681(2)	68(1)
C(19)	7526(3)	1905(2)	6332(2)	67(1)
C(20)	3547(2)	4497(2)	7569(2)	49(1)
C(21)	3498(3)	3904(3)	8174(2)	72(1)
C(22)	2528(3)	4905(2)	7566(2)	64(1)
C(23)	1965(3)	4534(3)	8170(3)	77(1)
O10a	9604(13)	5522(12)	8247(9)	76(3)
C24a	8680(20)	5551(18)	8091(15)	63(3)
C25a	7889(8)	6123(6)	8576(8)	73(2)
C26a	6812(9)	5798(10)	8625(10)	85(4)
C27a	8219(14)	7027(7)	8570(10)	86(3)
O10Bb	9643(15)	5700(10)	7951(10)	113(4)
C24Bb	8680(20)	5646(13)	7916(12)	72(3)
C25Bb	7947(7)	6321(5)	8186(5)	76(2)
C26Bb	6904(11)	6044(10)	8485(11)	94(4)
C27Bb	8370(20)	6892(12)	8845(8)	107(5)
C267b	7789(8)	6893(6)	7476(6)	82(3)
C(28)	9508(3)	2857(2)	7512(2)	67(1)
C(29)	8645(3)	3691(2)	8624(2)	63(1)
C(30)	7317(2)	4625(2)	6117(2)	43(1)
C(31)	6153(5)	2604(4)	10217(3)	113(2)
C(32)	10102(3)	4498(3)	5596(2)	67(1)
O9a	10520(20)	3910(20)	5982(15)	94(7)
C33a	10500(20)	4890(20)	4841(16)	85(5)
O9Bb	10579(13)	4045(18)	6034(10)	62(3)
C33Bb	10650(30)	5110(30)	4980(20)	108(9)

Tabla A3. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para la humilínólida G (**13**).

O(1)-C(1)	1.209(3)	C(9)-H(9)	0.9800
O(2)-C(32)	1.356(4)	C(10)-C(19)	1.536(4)
O(2)-C(2)	1.443(3)	C(11)-C(12)	1.510(5)
O(3)-C24Bb	1.32(2)	C(11)-H(11A)	0.9700
O(3)-C24a	1.36(3)	C(11)-H(11B)	0.9700
O(3)-C(3)	1.455(3)	C(12)-C(13)	1.541(4)
O(4)-C(7)	1.197(4)	C(12)-H(12A)	0.9700
O(5)-C(7)	1.336(4)	C(12)-H(12B)	0.9700
O(5)-C(31)	1.444(5)	C(13)-C(17)	1.536(4)
O(6)-C(16)	1.199(4)	C(13)-C(14)	1.537(4)
O(7)-C(16)	1.346(4)	C(13)-C(18)	1.540(4)
O(7)-C(17)	1.474(3)	C(14)-C(15)	1.534(4)
O(8)-C(23)	1.351(5)	C(14)-H(14)	0.9800
O(8)-C(21)	1.363(4)	C(15)-C(16)	1.491(4)
C(1)-C(10)	1.511(4)	C(15)-H(15A)	0.9700
C(1)-C(2)	1.517(4)	C(15)-H(15B)	0.9700
C(2)-C(30)	1.520(4)	C(17)-C(20)	1.494(4)
C(2)-C(3)	1.547(4)	C(17)-H(17)	0.9800
C(3)-C(4)	1.541(4)	C(18)-H(18A)	0.9600
C(3)-H(3)	0.9800	C(18)-H(18B)	0.9600
C(4)-C(29)	1.530(4)	C(18)-H(18C)	0.9600
C(4)-C(28)	1.542(4)	C(19)-H(19A)	0.9600
C(4)-C(5)	1.551(4)	C(19)-H(19B)	0.9600
C(5)-C(6)	1.545(4)	C(19)-H(19C)	0.9600
C(5)-C(10)	1.581(4)	C(20)-C(21)	1.345(5)
C(5)-H(5)	0.9800	C(20)-C(22)	1.432(4)
C(6)-C(7)	1.498(4)	C(21)-H(21)	0.9300
C(6)-H(6A)	0.9700	C(22)-C(23)	1.333(5)
C(6)-H(6B)	0.9700	C(22)-H(22)	0.9300
C(8)-C(30)	1.323(4)	C(23)-H(23)	0.9300

C(8)-C(9)	1.521(4)	O10a-C24a	1.19(3)
C(8)-C(14)	1.531(4)	C24a-C25a	1.55(3)
C(9)-C(11)	1.541(4)	C25a-C26a	1.449(6)
C(9)-C(10)	1.570(4)	C25a-C27a	1.481(7)
C25a-H25a	0.9800	C267b-H26Db	0.9600
C26a-H26Aa	0.9600	C267b-H26Eb	0.9600
C26a-H26Ba	0.9600	C267b-H26Fb	0.9600
C26a-H26Ca	0.9600	C(28)-H(28A)	0.9600
C27a-H27Aa	0.9600	C(28)-H(28B)	0.9600
C27a-H27Ba	0.9600	C(28)-H(28C)	0.9600
C27a-H27Ca	0.9600	C(29)-H(29A)	0.9600
O10Bb-C24Bb	1.21(3)	C(29)-H(29B)	0.9600
C24Bb-C25Bb	1.47(2)	C(29)-H(29C)	0.9600
C25Bb-C26Bb	1.463(7)	C(30)-H(30)	0.9300
C25Bb-C267b	1.463(6)	C(31)-H(31A)	0.9600
C25Bb-C27Bb	1.482(7)	C(31)-H(31B)	0.9600
C25Bb-H25Ab	0.9799	C(31)-H(31C)	0.9600
C25Bb-H25Bb	0.9799	C(32)-O9Bb	1.166(17)
C25Bb-H25Cb	0.9800	C(32)-O9a	1.23(2)
C26Bb-H25Cb	0.5015	C(32)-C33a	1.45(2)
C26Bb-H26Ab	0.9600	C(32)-C33Bb	1.55(2)
C26Bb-H26Bb	0.9600	C33a-H33Aa	0.9600
C26Bb-H26Cb	0.9600	C33a-H33Ba	0.9600
C27Bb-H25Bb	0.5221	C33a-H33Ca	0.9600
C27Bb-H27Ab	0.9600	C33Bb-H33Ab	0.9600
C27Bb-H27Bb	0.9600	C33Bb-H33Bb	0.9600
C27Bb-H27Cb	0.9600	C33Bb-H33Cb	0.9600
C267b-H25Ab	0.4892		
C(32)-O(2)-C(2)	120.0(2)	C(4)-C(5)-H(5)	105.7
C24Bb-O(3)-C(3)	119.8(11)	C(10)-C(5)-H(5)	105.7
C24a-O(3)-C(3)	119.2(12)	C(7)-C(6)-C(5)	112.6(2)
C(7)-O(5)-C(31)	115.4(3)	C(7)-C(6)-H(6A)	109.1

C(16)-O(7)-C(17)	122.2(2)	C(5)-C(6)-H(6A)	109.1
C(23)-O(8)-C(21)	105.8(3)	C(7)-C(6)-H(6B)	109.1
O(1)-C(1)-C(10)	124.9(3)	C(5)-C(6)-H(6B)	109.1
O(1)-C(1)-C(2)	122.4(3)	H(6A)-C(6)-H(6B)	107.8
C(10)-C(1)-C(2)	112.0(2)	O(4)-C(7)-O(5)	123.1(3)
O(2)-C(2)-C(1)	112.0(2)	O(4)-C(7)-C(6)	125.7(3)
O(2)-C(2)-C(30)	102.2(2)	O(5)-C(7)-C(6)	111.1(3)
C(1)-C(2)-C(30)	103.7(2)	C(30)-C(8)-C(9)	122.0(2)
O(2)-C(2)-C(3)	112.5(2)	C(30)-C(8)-C(14)	122.8(2)
C(1)-C(2)-C(3)	111.6(2)	C(9)-C(8)-C(14)	115.0(2)
C(30)-C(2)-C(3)	114.2(2)	C(8)-C(9)-C(11)	111.9(2)
O(3)-C(3)-C(4)	109.4(2)	C(8)-C(9)-C(10)	111.7(2)
O(3)-C(3)-C(2)	106.1(2)	C(11)-C(9)-C(10)	113.4(2)
C(4)-C(3)-C(2)	113.0(2)	C(8)-C(9)-H(9)	106.4
O(3)-C(3)-H(3)	109.5	C(11)-C(9)-H(9)	106.4
C(4)-C(3)-H(3)	109.5	C(10)-C(9)-H(9)	106.4
C(2)-C(3)-H(3)	109.5	C(1)-C(10)-C(19)	109.2(2)
C(29)-C(4)-C(3)	108.9(2)	C(1)-C(10)-C(9)	101.9(2)
C(29)-C(4)-C(28)	106.7(3)	C(19)-C(10)-C(9)	110.3(2)
C(3)-C(4)-C(28)	108.9(2)	C(1)-C(10)-C(5)	110.1(2)
C(29)-C(4)-C(5)	111.4(2)	C(19)-C(10)-C(5)	114.8(2)
C(3)-C(4)-C(5)	107.8(2)	C(9)-C(10)-C(5)	109.7(2)
C(28)-C(4)-C(5)	113.1(2)	C(12)-C(11)-C(9)	112.4(3)
C(6)-C(5)-C(4)	112.8(2)	C(12)-C(11)-H(11A)	109.1
C(6)-C(5)-C(10)	113.7(2)	C(9)-C(11)-H(11A)	109.1
C(4)-C(5)-C(10)	112.4(2)	C(12)-C(11)-H(11B)	109.1
C(6)-C(5)-H(5)	105.7	C(9)-C(11)-H(11B)	109.1
H(11A)-C(11)-H(11B)	107.9	O(7)-C(17)-H(17)	107.8
C(11)-C(12)-C(13)	114.5(2)	C(20)-C(17)-H(17)	107.8
C(11)-C(12)-H(12A)	108.6	C(13)-C(17)-H(17)	107.8
C(13)-C(12)-H(12A)	108.6	C(13)-C(18)-H(18A)	109.5
C(11)-C(12)-H(12B)	108.6	C(13)-C(18)-H(18B)	109.5

C(13)-C(12)-H(12B)	108.6	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
H(12A)-C(12)-H(12B)	107.6	C(13)-C(18)-H(18C)	109.5
C(17)-C(13)-C(14)	107.0(2)	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
C(17)-C(13)-C(18)	111.6(2)	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(14)-C(13)-C(18)	110.6(3)	C(10)-C(19)-H(19A)	109.5
C(17)-C(13)-C(12)	109.6(2)	C(10)-C(19)-H(19B)	109.5
C(14)-C(13)-C(12)	109.0(2)	H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5
C(18)-C(13)-C(12)	109.0(2)	C(10)-C(19)-H(19C)	109.5
C(8)-C(14)-C(15)	114.3(2)	H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5
C(8)-C(14)-C(13)	113.5(2)	H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5
C(15)-C(14)-C(13)	108.9(2)	C(21)-C(20)-C(22)	105.7(3)
C(8)-C(14)-H(14)	106.5	C(21)-C(20)-C(17)	125.8(3)
C(15)-C(14)-H(14)	106.5	C(22)-C(20)-C(17)	128.5(3)
C(13)-C(14)-H(14)	106.5	C(20)-C(21)-O(8)	110.8(3)
C(16)-C(15)-C(14)	115.4(2)	O10a-C24a-C25a	123(2)
C(16)-C(15)-H(15A)	108.4	C(20)-C(21)-H(21)	124.6
C(14)-C(15)-H(15A)	108.4	O(8)-C(21)-H(21)	124.6
C(16)-C(15)-H(15B)	108.4	C(23)-C(22)-C(20)	106.1(3)
C(14)-C(15)-H(15B)	108.4	C(23)-C(22)-H(22)	127.0
H(15A)-C(15)-H(15B)	107.5	C(20)-C(22)-H(22)	127.0
O(6)-C(16)-O(7)	117.6(3)	C(22)-C(23)-O(8)	111.6(3)
O(6)-C(16)-C(15)	122.8(3)	C(22)-C(23)-H(23)	124.2
O(7)-C(16)-C(15)	119.4(3)	O(8)-C(23)-H(23)	124.2
O(7)-C(17)-C(20)	105.7(2)	O10a-C24a-O(3)	124(2)
O(7)-C(17)-C(13)	112.2(2)	O(3)-C24a-C25a	112.7(19)
C(20)-C(17)-C(13)	115.4(2)	C26a-C25a-C27a	126.9(11)
C26a-C25a-C24a	114.9(13)	C24Bb-C25Bb-H25Bb	108.3
C27a-C25a-C24a	111.9(14)	H25Ab-C25Bb-H25Bb	111.4
C26a-C25a-H25a	98.3	C267b-C25Bb-H25Cb	110.4
C27a-C25a-H25a	98.3	C24Bb-C25Bb-H25Cb	110.1
C24a-C25a-H25a	98.3	C27Bb-C25Bb-H25Cb	110.4
C25a-C26a-H26Aa	109.5	H25Ab-C25Bb-H25Cb	108.0

C25a-C26a-H26Ba	109.5	H25Bb-C25Bb-H25Cb	112.5
H26Aa-C26a-H26Ba	109.5	C25Bb-C26Bb-H26Ab	109.5
C25a-C26a-H26Ca	109.5	H25Cb-C26Bb-H26Ab	103.9
H26Aa-C26a-H26Ca	109.5	C25Bb-C26Bb-H26Bb	109.5
H26Ba-C26a-H26Ca	109.5	H25Cb-C26Bb-H26Bb	122.1
C25a-C27a-H27Aa	109.5	H26Ab-C26Bb-H26Bb	109.5
C25a-C27a-H27Ba	109.5	C25Bb-C26Bb-H26Cb	109.5
H27Aa-C27a-H27Ba	109.5	H25Cb-C26Bb-H26Cb	101.8
C25a-C27a-H27Ca	109.5	H26Ab-C26Bb-H26Cb	109.5
H27Aa-C27a-H27Ca	109.5	H26Bb-C26Bb-H26Cb	109.5
H27Ba-C27a-H27Ca	109.5	C25Bb-C27Bb-H27Ab	109.5
O10Bb-C24Bb-O(3)	123.4(19)	H25Bb-C27Bb-H27Ab	109.2
O10Bb-C24Bb-C25Bb	124.2(19)	C25Bb-C27Bb-H27Bb	109.5
O(3)-C24Bb-C25Bb	112.2(19)	H25Bb-C27Bb-H27Bb	98.1
C26Bb-C25Bb-C267b	108.4(8)	H27Ab-C27Bb-H27Bb	109.5
C26Bb-C25Bb-C24Bb	116.4(12)	C25Bb-C27Bb-H27Cb	109.5
C267b-C25Bb-C24Bb	107.3(9)	H25Bb-C27Bb-H27Cb	120.3
C26Bb-C25Bb-C27Bb	105.5(8)	H27Ab-C27Bb-H27Cb	109.5
C267b-C25Bb-C27Bb	103.4(8)	H27Bb-C27Bb-H27Cb	109.5
C24Bb-C25Bb-C27Bb	114.9(15)	C25Bb-C267b-H26Db	109.5
C26Bb-C25Bb-H25Ab	106.3	H25Ab-C267b-H26Db	102.3
C24Bb-C25Bb-H25Ab	106.3	C25Bb-C267b-H26Eb	109.5
C27Bb-C25Bb-H25Ab	106.9	H25Ab-C267b-H26Eb	113.3
C26Bb-C25Bb-H25Bb	108.2	H26Db-C267b-H26Eb	109.5
C267b-C25Bb-H25Bb	107.9	C25Bb-C267b-H26Fb	109.5
H25Ab-C267b-H26Fb	112.5	C(32)-C33a-H33Aa	109.5
H26Db-C267b-H26Fb	109.5	C(32)-C33a-H33Ba	109.5
H26Eb-C267b-H26Fb	109.5	H33Aa-C33a-H33Ba	109.5
C(4)-C(28)-H(28A)	109.5	C(32)-C33a-H33Ca	109.5
C(4)-C(28)-H(28B)	109.5	H33Aa-C33a-H33Ca	109.5
H(28A)-C(28)-H(28B)	109.5	H33Ba-C33a-H33Ca	109.5
C(4)-C(28)-H(28C)	109.5	C(32)-C33Bb-H33Ab	109.5

H(28A)-C(28)-H(28C)	109.5	C(32)-C33Bb-H33Bb	109.5
H(28B)-C(28)-H(28C)	109.5	H33Ab-C33Bb-H33Bb	109.5
C(4)-C(29)-H(29A)	109.5	C(32)-C33Bb-H33Cb	109.5
C(4)-C(29)-H(29B)	109.5	H33Ab-C33Bb-H33Cb	109.5
H(29A)-C(29)-H(29B)	109.5	H33Bb-C33Bb-H33Cb	109.5
C(4)-C(29)-H(29C)	109.5		
H(29A)-C(29)-H(29C)	109.5		
H(29B)-C(29)-H(29C)	109.5		
C(8)-C(30)-C(2)	125.5(2)		
C(8)-C(30)-H(30)	117.2		
C(2)-C(30)-H(30)	117.2		
O(5)-C(31)-H(31A)	109.5		
O(5)-C(31)-H(31B)	109.5		
H(31A)-C(31)-H(31B)	109.5		
O(5)-C(31)-H(31C)	109.5		
H(31A)-C(31)-H(31C)	109.5		
H(31B)-C(31)-H(31C)	109.5		
O9Bb-C(32)-O(2)	124.7(7)		
O9a-C(32)-O(2)	122.6(11)		
O9a-C(32)-C33a	126.2(16)		
O(2)-C(32)-C33a	109.5(12)		
O9Bb-C(32)-C33Bb	122.5(15)		

Tabla A4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) [$^\circ$] para la humilínólida G (13). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico tiene la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^* 2U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$.

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
O(1)	76(2)	69(1)	55(1)	-11(1)	19(1)	16(1)
O(2)	44(1)	63(1)	60(1)	11(1)	11(1)	4(1)
O(3)	48(1)	48(1)	58(1)	-13(1)	1(1)	5(1)
O(4)	78(2)	64(1)	58(1)	1(1)	13(1)	10(1)
O(5)	107(2)	83(2)	51(1)	19(1)	5(1)	10(2)
O(6)	79(2)	54(1)	101(2)	-1(1)	7(1)	-13(1)
O(7)	53(1)	50(1)	59(1)	-12(1)	6(1)	-9(1)
O(8)	76(2)	99(2)	85(2)	11(2)	27(2)	-10(2)
C(1)	51(2)	50(2)	44(1)	-3(1)	4(1)	13(1)
C(2)	41(1)	48(1)	46(1)	3(1)	8(1)	4(1)
C(3)	39(1)	49(1)	51(2)	-6(1)	4(1)	6(1)
C(4)	50(2)	51(1)	47(1)	0(1)	-1(1)	10(1)
C(5)	54(2)	36(1)	41(1)	-2(1)	6(1)	6(1)
C(6)	72(2)	44(1)	53(2)	9(1)	9(2)	5(1)
C(7)	67(2)	56(2)	48(2)	9(1)	1(2)	-3(2)
C(8)	46(1)	46(1)	33(1)	-5(1)	4(1)	3(1)
C(9)	58(2)	44(1)	42(1)	-15(1)	0(1)	-2(1)
C(10)	62(2)	38(1)	46(1)	-8(1)	5(1)	5(1)
C(11)	62(2)	43(1)	66(2)	-12(1)	5(2)	-12(1)
C(12)	55(2)	65(2)	62(2)	-26(2)	-1(1)	-16(1)
C(13)	41(1)	61(2)	47(1)	-13(1)	-7(1)	-5(1)
C(14)	50(2)	61(2)	36(1)	-5(1)	-2(1)	3(1)
C(15)	45(2)	63(2)	58(2)	15(1)	-2(1)	10(1)
C(16)	41(1)	52(2)	66(2)	1(1)	-3(1)	1(1)
C(17)	39(1)	46(1)	49(1)	-9(1)	-3(1)	-5(1)

Tabla A4 (continuación). Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) [$^\circ$] para la humilínólida G (**13**). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico tiene la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^* 2U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$.

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C(18)	48(2)	97(3)	60(2)	-17(2)	-16(1)	-4(2)
C(19)	89(2)	42(1)	70(2)	-14(1)	7(2)	7(2)
C(20)	44(1)	53(1)	50(1)	-14(1)	3(1)	-8(1)
C(21)	64(2)	89(2)	63(2)	11(2)	12(2)	0(2)
C(22)	51(2)	62(2)	78(2)	-9(2)	8(2)	-2(1)
C(23)	55(2)	83(2)	93(3)	-20(2)	19(2)	-11(2)
O10a	47(4)	83(8)	100(7)	-32(5)	-10(4)	-5(5)
C24a	51(4)	66(6)	74(7)	-18(5)	-6(5)	-3(5)
C25a	73(4)	65(4)	80(6)	-26(4)	-8(5)	5(4)
C26a	86(5)	65(9)	105(7)	-7(6)	57(6)	0(4)
C27a	81(7)	69(4)	107(8)	-5(6)	14(7)	2(4)
O10Bb	85(4)	80(6)	175(12)	-37(7)	11(8)	-22(4)
C24Bb	74(4)	51(4)	90(8)	-14(4)	7(6)	-3(3)
C25Bb	103(4)	57(4)	66(4)	-17(3)	13(4)	6(3)
C26Bb	104(6)	45(7)	133(10)	-25(6)	59(7)	-1(5)
C27Bb	124(10)	102(9)	96(8)	-35(7)	-2(8)	-5(8)
C267b	80(6)	62(5)	104(6)	3(4)	7(5)	11(4)
C(28)	64(2)	66(2)	72(2)	5(2)	0(2)	21(2)
C(29)	66(2)	75(2)	46(2)	1(1)	-7(1)	-3(2)
C(30)	45(1)	41(1)	43(1)	-1(1)	6(1)	6(1)
C(31)	157(5)	128(4)	53(2)	17(2)	26(3)	11(4)
C(32)	47(2)	84(2)	70(2)	9(2)	9(2)	8(2)
O9a	75(9)	88(8)	118(11)	15(6)	9(7)	22(6)
C33a	40(7)	116(12)	98(8)	28(7)	21(6)	-4(7)
O9Bb	38(5)	88(8)	61(5)	19(5)	13(4)	17(4)
C33Bb	55(11)	146(18)	121(14)	80(14)	18(9)	7(11)

Tabla A5. Coordinadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para la humilinólida G (**13**).

	x	y	z	U(eq)
H(3)	9547	4450	7203	56
H(5)	6994	3614	7499	53
H(6A)	6585	2074	7751	67
H(6B)	7673	2096	8229	67
H(9)	6360	2991	5519	58
H(11A)	5314	2315	6489	68
H(11B)	5415	3075	7118	68
H(12A)	3772	3152	6493	73
H(12B)	4283	3113	5603	73
H(14)	5327	4403	5085	59
H(15A)	6133	5750	5447	66
H(15B)	4922	5764	5224	66
H(17)	5110	4414	7286	54
H(18A)	3451	4503	5096	102
H(18B)	3331	5232	5757	102
H(18C)	2784	4348	5909	102
H(19A)	7510	1798	5742	100
H(19B)	6941	1617	6594	100
H(19C)	8183	1698	6560	100
H(21)	4051	3538	8314	87
H(22)	2305	5340	7214	77
H(23)	1273	4684	8311	92
H25a	8118	5980	9144	87
H26Aa	6766	5386	9065	128
H26Ba	6626	5534	8104	128
H26Ca	6331	6259	8736	128
H27Aa	7855	7328	9006	129

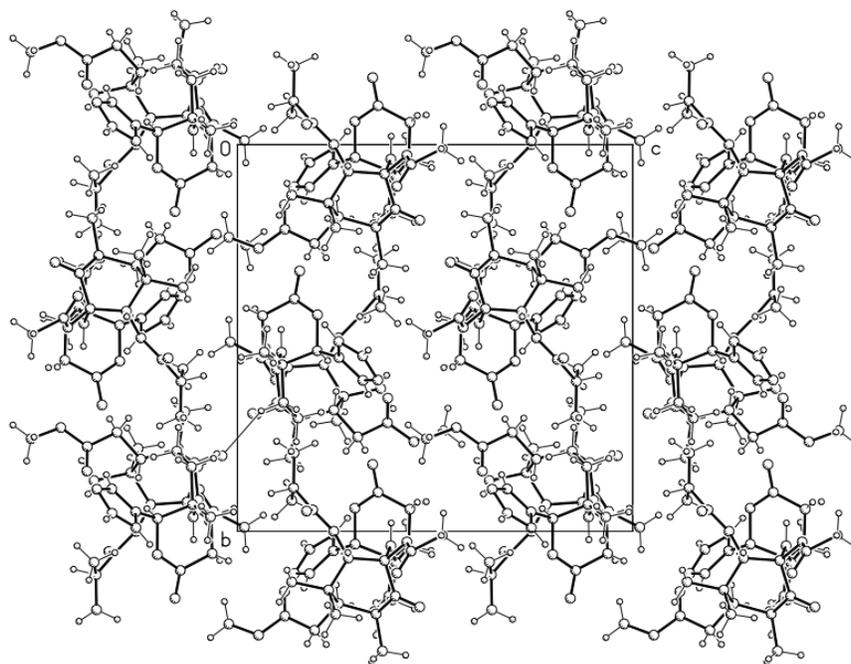
Tabla A5 (Continuación). Coordinadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para la humilínólida G (**13**).

	x	y	z	U(eq)
H27Ba	8042	7277	8040	129
H27Ca	8972	7064	8658	129
H25Ab	7814	6676	7694	91
H25Bb	8290	6647	8633	91
H25Cb	7269	6072	8361	91
H26Ab	6463	5899	8017	141
H26Bb	6577	6496	8796	141
H26Cb	6987	5554	8837	141
H27Ab	8868	7282	8604	161
H27Bb	8714	6558	9267	161
H27Cb	7791	7205	9091	161
H26Db	7387	6605	7052	123
H26Eb	8468	7058	7254	123
H26Fb	7410	7390	7655	123
H(28A)	9559	2761	6922	101
H(28B)	9369	2327	7790	101
H(28C)	10166	3091	7713	101
H(29A)	9288	3998	8742	94
H(29B)	8637	3171	8939	94
H(29C)	8043	4033	8776	94
H(30)	7267	5216	6107	52
H(31A)	6357	3181	10332	169
H(31B)	6360	2247	10676	169
H(31C)	5396	2574	10144	169
H33Aa	11265	4918	4864	127
H33Ba	10221	5458	4794	127
H33Ca	10288	4563	4366	127
H33Ab	11225	4822	4700	161
H33Bb	10929	5595	5274	161
H33Cb	10146	5304	4569	161

Tabla A6. Enlaces de hidrógeno para para la humilinólida G (**13**) [\AA y $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
C(3)-H(3)...O9a	0.98	2.46	2.99 (2)	113.1
C(3)-H(3)...O9Bb	0.98	2.37	2.947(14)	117.2
C(21)-H(21)...O(4)	0.93	2.59	3.390(5)	145.1
C(23)-H(23)...O10a#1	0.93	2.48	3.353(18)	156.5
C(23)-H(23)...O10Bb#1	0.93	2.66	3.465(19)	145.2
C(31)-H(31B)...O(8)#2	0.96	2.65	3.542(6)	155.5

Transformaciones de simetría usadas para generar los átomos equivalentes: #1 $x-1,y,z$ #2 $x+1/2,-y+1/2,-z+2$

**Figura A1.** Celda cristalográfica de la humilinólida G (**13**).

Anexo 4: Parámetros de selectividad del método CLAE para la cuantificación de las mexicanólicas de *S. humilis*

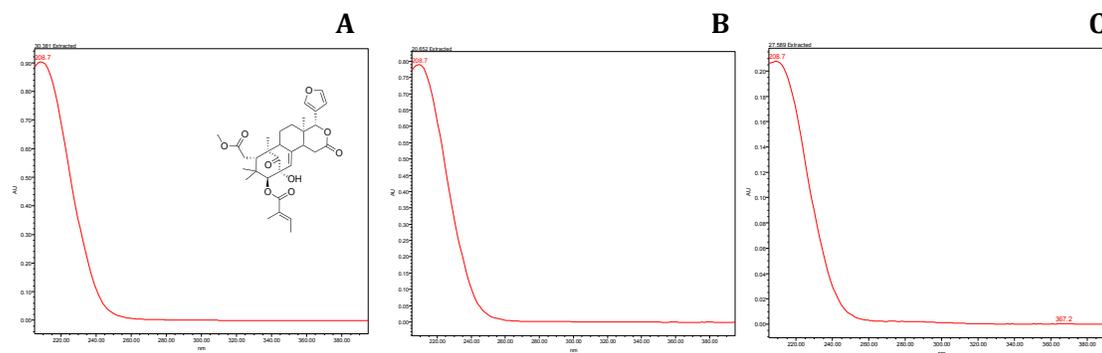


Figura A1. Espectros UV de la mexicanólida metil-2-hidroxi-3- β -tigloiloxi-1-oxomeliac-8(30)-enato (**3**) (panel A, 1 mg/ml), de **3** en la matriz de trabajo (panel B, 1 mg/ml) y de una mezcla de **3** con la matriz de trabajo (panel C, 0.5 mg/ml).

Anexo 5: Cursos temporales del efecto hipoglucemiante agudo de preparados y compuestos de *S. humilis* en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.

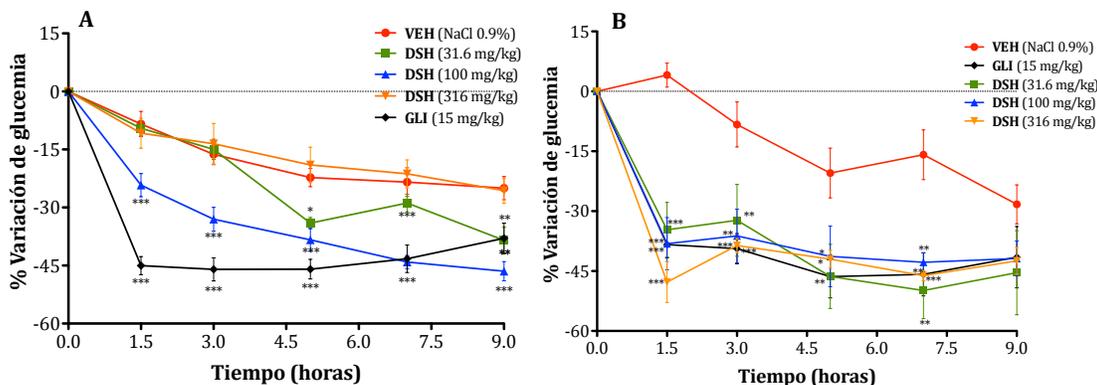


Figura A1. Efecto hipoglucemiante agudo de la decocción de *S. humilis* (DSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

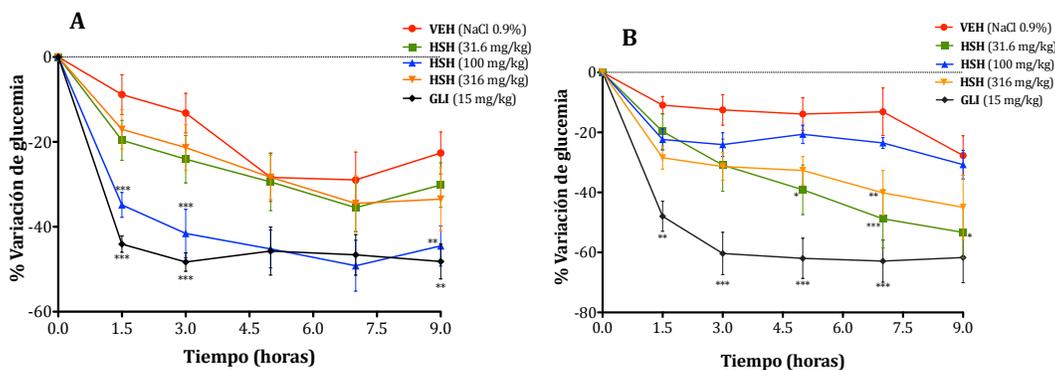


Figura A2. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto hexánico de *S. humilis* (HSH) en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

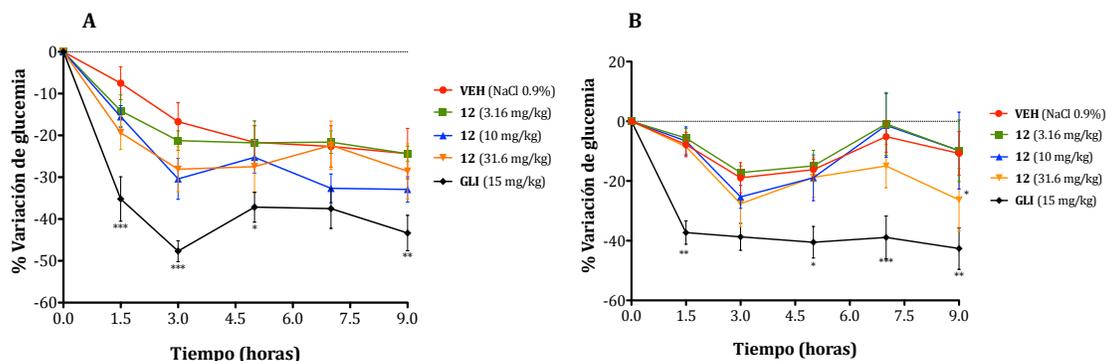


Figura A3. Efecto hipoglucemiante agudo de la mexicanólida **12** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

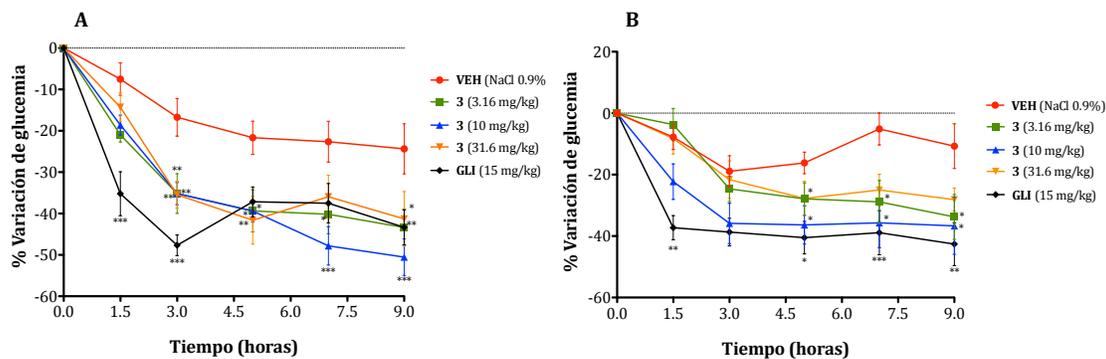


Figura A4. Efecto hipoglucemiante agudo de la mexicanólida **3** en ratones normoglucémicos (Panel A) e hiperglucémicos (Panel B). VEH, vehículo (NaCl 0.9%); GLI, glibenclamida (15 mg/kg). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n = 6$). ANADEVa de 2 vías, *post hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$.

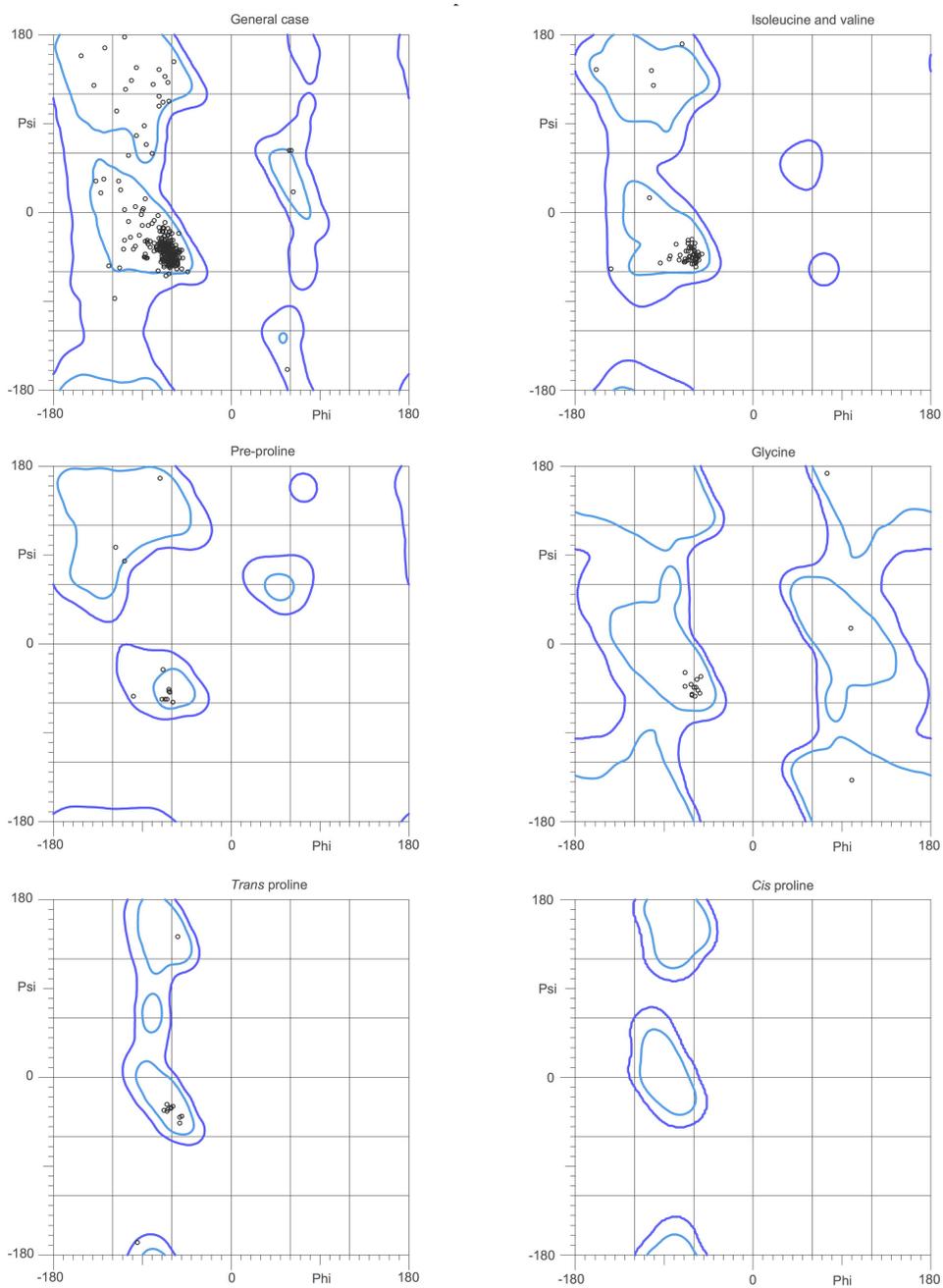
Anexo 6: Diagramas de Ramachandran de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{2B}.

Figura A1. Diagramas de Ramachandran del receptor 5-HT_{2C} obtenidos usando la herramienta MolProbity.

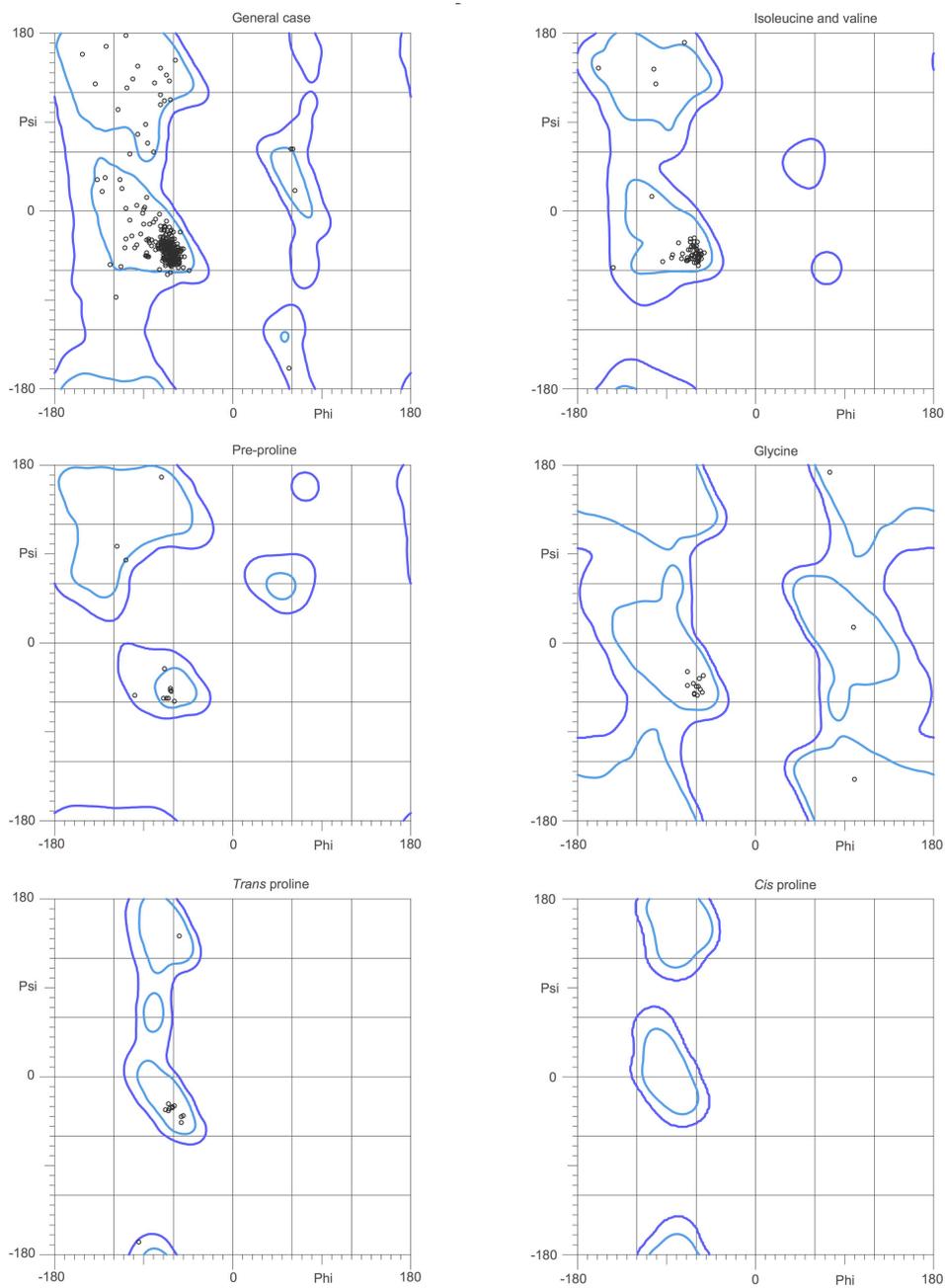


Figura A2. Diagramas de Ramachandran del receptor 5-HT_{2B} obtenidos usando la herramienta MolProbity.

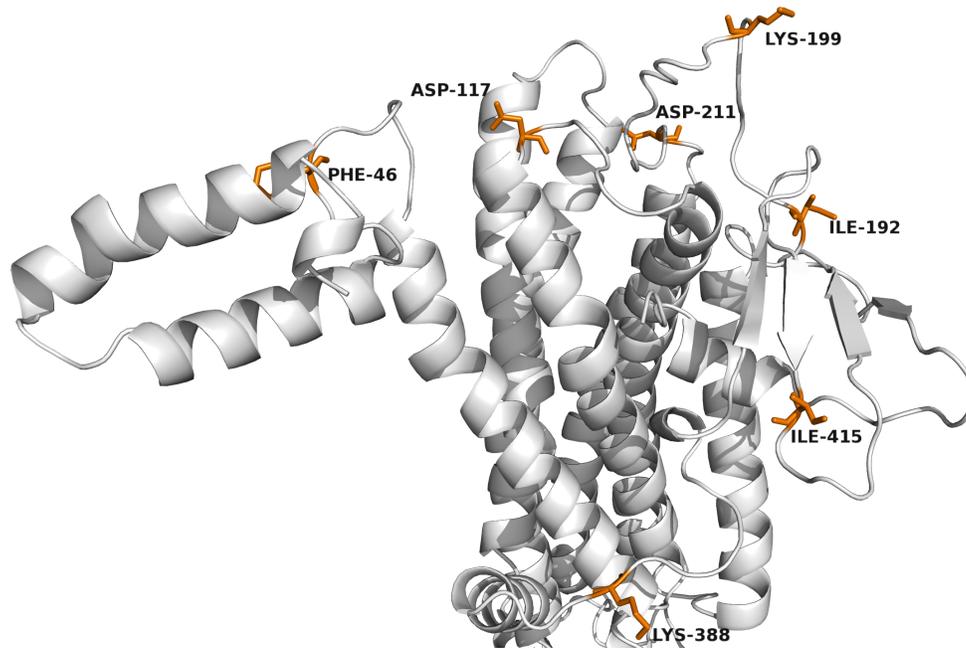


Figura A3. Modelo del receptor 5-HT_{2C} con los residuos de aminoácido que no pertenecen a regiones permitidas y/o favorecidas señalados. Se muestran los siete dominios transmembranales (cartón gris) y los aminoácidos en bastones naranja. Imagen preparada con PyMOL.



Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*



Berenice Ovalle-Magallanes¹, Omar N. Medina-Campos, José Pedraza-Chaverri, Rachel Mata^{*}

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2014

Received in revised form 13 October 2014

Accepted 4 November 2014

Available online 19 December 2014

Keywords:

Swietenia humilis

Meliaceae

Mexicanolides

Type 2 diabetes mellitus

Antihyperglycemic agent

ABSTRACT

An aqueous extract from the seeds of *Swietenia humilis* (31.6–100 mg/kg bw) lowered ($p < 0.05$) blood glucose levels in normal and nicotinamide–streptozotocin (NA–STZ)-induced hyperglycemic mice. Furthermore, when administered to fructose-fed rats with metabolic syndrome, the decoction showed significant antihyperglycemic, hypoglycemic and hypolipidemic effects, as well as an augmentation of hepatic glycogen. Limonoids 2-hydroxy–destigloyl-6-deoxyswietenine acetate (**1**), humulin B (**2**), methyl-2-hydroxy-3- β -isobutyroxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**3**), methyl-2-hydroxy-3- β -tigloyloxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**4**), humilinolide G (**5**), humilinolide C (**6**), methyl-2-hydroxy-3- β -isobutyroxy-1-oxo-3,30-epoxy-1-oxo-meliacate (**7**), and humilinolide H (**8**), were isolated from a CH₂Cl₂–MeOH (1:1) extract of the seeds. Compounds **5** and **8** are analogs of compounds **6** and **7**. The structure of **5** was unequivocally established by X-ray analysis. When tested in normal and NA–STZ-hyperglycemic mice, compounds **1**, **2**, and **4** (3.16–31.6 mg/kg bw) decreased glycemia during an oral glucose tolerance test. The present investigation sustains the contemporary popular uses of *S. humilis* seeds for treating metabolic disorders, including diabetes and dyslipidemia and demonstrates the potential of the mexicanolides as antihyperglycemic agents.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The prevalence of chronic metabolic disorders, such as obesity, dyslipidemia, hypertension and fasting hyperglycemia, is dramatically increasing worldwide. These conditions, clustered as metabolic syndrome, are among the major economic and medical burdens in middle-income countries. They are also related to an augmentation in morbidity and mortality of cancer, cardiovascular accidents, and type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Guarente, 2008). According to the International Diabetes Federation, T2DM affects 382 million people (IDF, 2013). As a result, diabetic patients are demanding safer and more efficient treatments to ameliorate their impaired glycemic condition. In this context, plants used in traditional medicine are valuable sources of phytotherapeutic preparations and leads for development of new antidiabetic drugs (Hung et al., 2012). Of the nearly 3500 species medicinally used in Mexican folk medicine, up to 383 species are employed for the treatment of T2DM (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Mata et al., 2013). One of these species is *Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae), commonly named as “zopilote”, “gateado”, “cobano” and “caobil-

la”, a medium size tree grown in the tropical areas of Mexico. The seeds of the plant are valued as “blood depuratives”, a popular way to define hypoglycemic and hypolipidemic agents (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Romero-Cerecero et al., 2009). Previous phytochemical investigations of the seeds of *S. humilis* led to the isolation and identification of several tetranortriterpenoids of the mexicanolide group, including humulin B (**2**), methyl-2-hydroxy-3- β -isobutyroxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**3**), methyl-2-hydroxy-3- β -tigloyloxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**4**), and humilinolide C (**6**) (Jiménez et al., 1998; Okorie and Taylor, 1971; Segura-Correa et al., 1993) (Scheme 1).

As part of our efforts to establish the efficacy of selected Mexican plants as hypoglycemic agents, in this work the hypoglycemic, antihyperglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract and compounds from the seeds of *S. humilis* are described.

2. Results and discussion

2.1. In vivo assays with the aqueous extract

2.1.1. Acute oral toxicity in mice

Raw and dried (crude drug) *S. humilis* seeds and their decoctions (phytopreparation obtained by boiling the drug with water) are consumed as antidiabetic agents in Mexican folk medicine. Thus,

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

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

¹ Taken in part from the Ph.D. thesis of B. Ovalle-Magallanes.

dried seeds and the corresponding decoction (SHD) were assessed for their potential acute toxicity according to the Lorke procedure (Lorke, 1983). Mice received a single intragastric dose (10–5000 mg/kg) of the phytopreparation or crude drug in two independent stages. In each case, the animals were observed during 14 days. The results showed there were neither changes in behavioral patterns and body weight, nor mice death. Furthermore, no signs of macroscopic organs damage were detected. The calculated LD₅₀'s of the preparation and crude drug were higher than 5000 mg/kg (Lorke, 1983). Therefore, the seeds did not provoke acute toxicity in mice.

2.1.2. Hypoglycemic and antihyperglycemic potential of *S. humilis* decoction (SHD) in mice

The hypoglycemic and antihyperglycemic effects of SHD were evaluated in normoglycemic and nicotinamide–streptozotocin (NA–STZ)-hyperglycemic mice using logarithmic doses chosen according to standard protocols (Fröde and Medeiros, 2008; Kecskemeti et al., 2002; Wojcikowski and Gobe, 2014). The NA–STZ model is widely used for evaluating potential antidiabetic drugs since the cytotoxic action of STZ in pancreatic β -cells is partially diminished by NA, affording mice with hyperglycemia and glucose intolerance as in T2DM (Szkudelski, 2001; Tahara et al., 2008). As shown in Figs. S1 and 1, SHD (100 mg/kg) caused a significant reduction in blood glucose levels in both normal and hyperglycemic mice when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$); hyperglycemic mice treated with 31.6 mg/kg and 316 mg/kg of SHD also showed an attenuation in glycemia (Table S1). The antihyperglycemic action of SHD (100–316 mg/kg) was established during an oral glucose tolerance test (OGTT); all doses tested inhibited the postprandial peak provoked by the glucose load in normal and hyperglycemic mice, although the effect was not dose-dependent (Figs. S2A and 2A, respectively). On the other hand, SHD (100–316 mg/kg) did not inhibit the postprandial peak at any of the doses tested during an oral sucrose tolerance test in normoglycemic mice; but when tested in hyperglycemic mice a significant reduction of the postprandial peak was observed (Table S2).

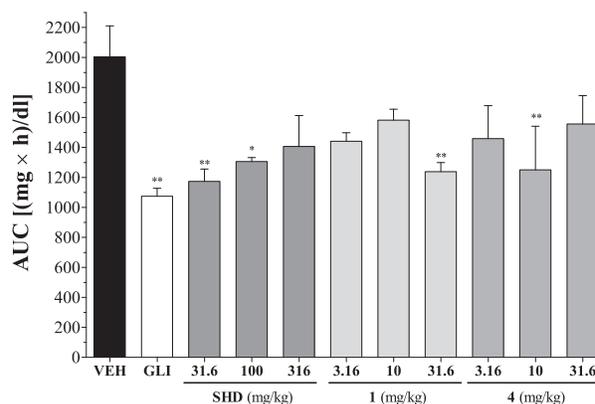
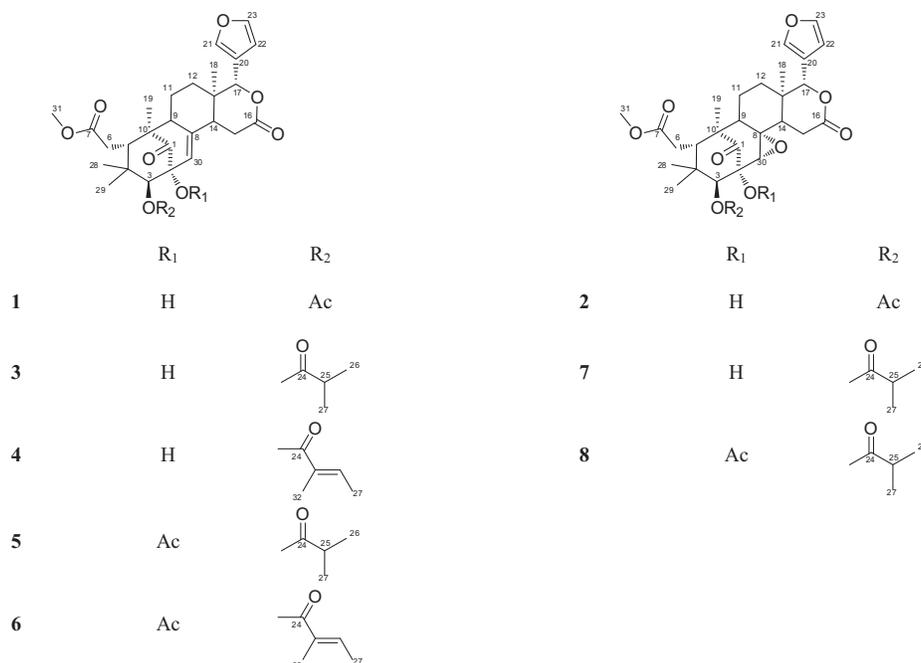


Fig. 1. Hypoglycemic action of SHD and compounds **1** and **4** from *S. humilis* in NA–STZ-hyperglycemic mice. AUC: area under the curve; VEH: vehicle; GLI: glibenclamide. Each bar represents the mean \pm SEM for 6 mice in each group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significantly different ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test for comparison with respect to vehicle control.

2.1.3. Antihyperglycemic, hypoglycemic and hypolipidemic potential of SHD in rats

The antihyperglycemic, hypoglycemic and hypolipidemic effects of *S. humilis* in rats fed with fructose were assessed. This model was also included considering that fructose induces metabolic syndrome in rats (fructose-fed metabolic syndrome, FF-MS); the animals developed typical features of this condition including body weight increment, impaired glucose tolerance, dyslipidemia and hyperglycemia (Lim et al., 2010; Panchal and Brown, 2011; Wilson and Islam, 2012). As shown in Table 1, SHD (100 and 316 mg/kg) caused a significant inhibition of the postprandial peak during an OGTT when compared with vehicle-treated group ($p < 0.01$). Moreover, daily administration of SHD (100 mg/kg) during a week provoked a significant hypoglycemic effect, reduction in both serum triglycerides and



Scheme 1. Mexicanolides isolated from *S. humilis* seeds.

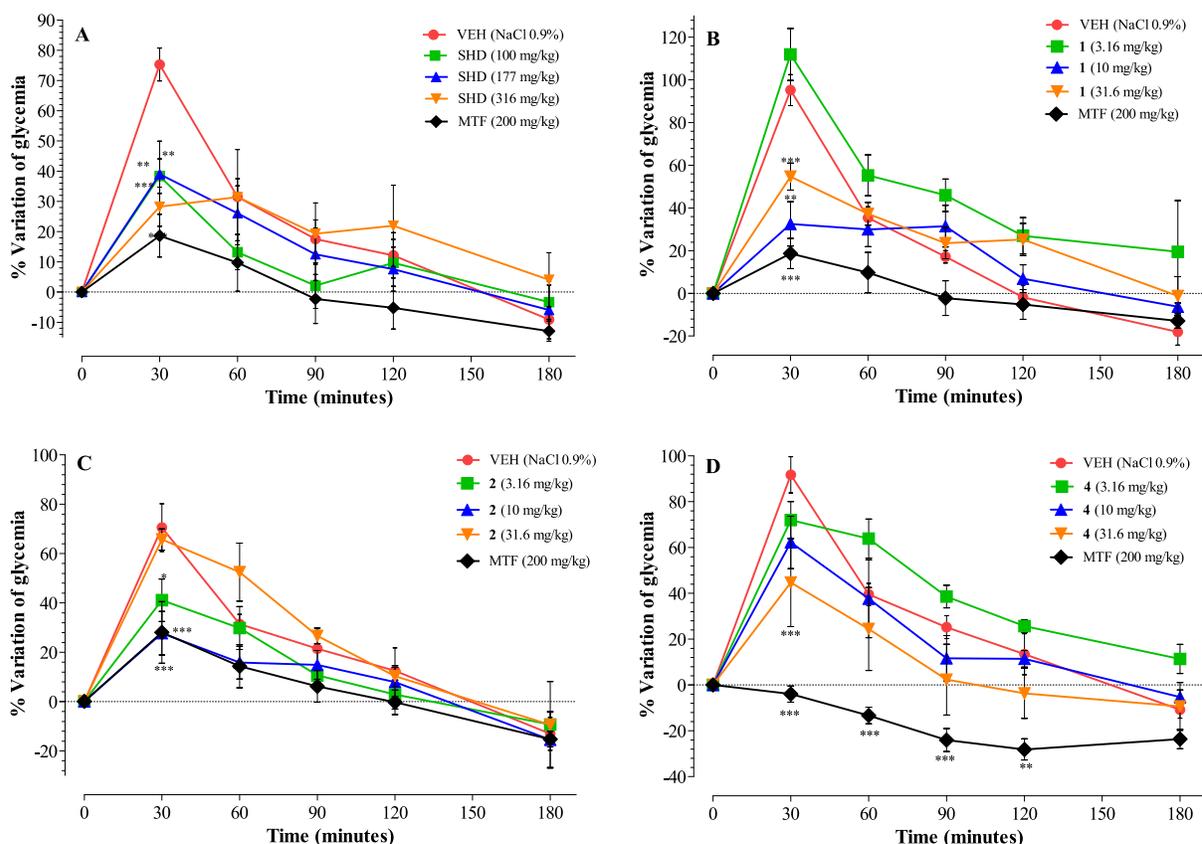


Fig. 2. Effect of SHD (A), 1 (B), 2 (C), and 4 (D) on blood glucose levels in NA–STZ-hyperglycemic mice during an OGTT. VEH: vehicle; MTF: metformin. Each point represents the mean \pm SEM for 6 mice in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test for comparison with respect to vehicle control at the same time.

Table 1

Effect of the decoction of the seeds of *S. humilis* (SHD) on blood glucose levels in Sprague Dawley rats with metabolic syndrome induced with fructose feeding (FF-MS) during an OGTT.^a

Test samples	Dose (mg/kg)	Initial glycemia (mg/dL)		% Variation of glycemia			
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	
Vehicle		96.7 \pm 4.4	87.4 \pm 9.9	29.3 \pm 11.1	12.2 \pm 3.5	12.6 \pm 4.8	
SHD	100	91.3 \pm 2.3	49.2 \pm 4.7 ^b	45.9 \pm 3.8	25.2 \pm 8.8	11.6 \pm 1.1	
SHD	316	91.8 \pm 3.1	61.2 \pm 4.5 ^b	39.2 \pm 4.4	23.8 \pm 5.0	13.7 \pm 3.8	
Metformin	200	92.2 \pm 5.1	30.4 \pm 2.2 ^b	22.8 \pm 2.8	9.9 \pm 3.1	6.5 \pm 2.7	

^a Each value is the mean \pm SEM for six rats in each group.

^b $p < 0.01$ significantly different two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test for comparison with respect to vehicle group values at the same time.

uric acid, without any significant changes in fasting insulin levels or body weight. However, an augmentation of glycogen content and a reduction in abdominal fat were observed when compared with rats fed only with fructose (Table 2). This result contrasts with the effect reported by De and collaborators for an aqueous-methanolic extract of the related species *S. mahagoni*; they found that administration of this extract to STZ-diabetic rats during 21 days lowered glycogen levels (De et al., 2011).

Altogether, the above results showed that the amelioration of the impaired glycemic condition provoked by SHD in NA–STZ mice and in FF-MS rats is due to modifications in peripheral glucose uptake, rather than by inhibition of the intestinal α -glucosidases. The reduction of the postprandial peak observed during the OGTTs, as well as the increment of hepatic glycogen in FF-MS rats indicated that the hypoglycemic effect of the decoction involves an

insulin-sensitizing mechanism (Wilson and Islam, 2012). The fact that the levels of insulin did not increase in treated FF-MS rats is in agreement with this proposal. Furthermore, the reduction in blood triglycerides is compatible with an increment in glucose-uptake in adipose tissue, where energy is stored as triglycerides (Leto and Saltiel, 2012; Lim et al., 2010). These effects are also consistent with the use of this species as blood purpurative agent.

2.2. Phytochemical investigation

In order to identify the compounds responsible for the observed antihyperglycemic and hypoglycemic effects of the species, an organic extract prepared from the seeds was subjected to chromatographic fractionation. This process led to the isolation of eight limonoids of the mexicanolide type, of which 5 and 8 (humilinalides G

Table 2Effect of the decoction of the seeds of *S. humilis* (SHD) on several metabolic parameters in FF-MS rats.^a

	Standard diet	FF-MS	SHD 100 mg/kg	SHD 316 mg/kg
Body weight (g)	381.7 ± 5.2	426.0 ± 2.6 ^b	421.0 ± 5.8 ^b	435.7 ± 9.8 ^b
Liver weight (g)	9.5 ± 1.2	12.5 ± 0.2 ^b	16.1 ± 0.5 ^b	15.8 ± 0.9 ^b
Abdominal fat (g)	8.9 ± 1.0	14.4 ± 0.6 ^b	8.9 ± 0.9 ^c	9.6 ± 1.0 ^c
Lee index	297.1 ± 2.7	311.4 ± 1.1 ^b	312.2 ± 1.4 ^b	313.7 ± 2.7 ^b
Fasting glucose (mmol/L)	6.7 ± 0.2	7.9 ± 0.4 ^b	6.4 ± 0.1 ^c	6.8 ± 0.3 ^c
Fasting triglycerides (mmol/L)	0.89 ± 0.06	1.60 ± 0.08 ^b	1.28 ± 0.12 ^c	1.5 ± 0.08
Fasting total cholesterol (mmol/L)	2.52 ± 0.03	2.48 ± 0.07	2.48 ± 0.07	2.44 ± 0.07
Fasting uric acid (mmol/L)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.003 ^c	0.03 ± 0.01 ^c
Fasting insulin (ng/ml)	0.885 ± 0.070	0.710 ± 0.032 ^b	0.681 ± 0.038	0.724 ± 0.043
Glycogen content (mg glucose/g hepatic tissue)	38.26 ± 6.10	24.24 ± 2.02	47.54 ± 4.0 ^c	25.64 ± 1.97

^a Each value is the mean ± SEM for six rats in each group.^b $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test for comparison with respect to standard diet-fed rats.^c $p < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test for comparison with respect to fructose-fed rats.

and H, respectively) are reported for the first time and **1** is new to the species. All structures were elucidated using one- and two-dimensional NMR spectroscopic techniques and by comparison of their spectroscopic and spectrometric data with those previously described (Jiménez et al., 1998; Segura-Correa et al., 1993; Mulholland and Taylor, 1988).

Compounds **5** and **8** showed molecular formulas of $C_{33}H_{42}O_{10}$ and $C_{33}H_{42}O_{11}$, respectively. The IR spectra of both compounds exhibited typical absorptions related to the presence of ketone (1725 cm^{-1}), carboxymethyl (1223 cm^{-1}), furan (1504 cm^{-1}), and ester (1197 cm^{-1}) Moieties. Analysis of the NMR spectroscopic data (Table 3) clearly indicated that both compounds were limonoids from the mexicanolide group. Comparative analysis of the ^{13}C and

^1H NMR spectra indicated that compounds **5** and **6** were very similar (Segura-Correa et al., 1993), varying only in the signals for the acid residue esterifying the hydroxyl group at C-3. Thus, the resonances for the tigloyl group in **6** were replaced by those of an isobutyryl moiety [δ_{C} 176.1, 34.1, 18.7, and 19.3; δ_{H} 2.65 (m), 1.18 (d) and 1.17 (d)] in **5**. The NMR spectra of **5** also showed common signals for a trisubstituted olefin (δ_{C} 137.7 and 125.7; δ_{H} 5.38), and a quaternary carbon bearing an acetoxy group (δ_{C} 169.3, 85.1 and 21.7; δ_{H} 2.12). The resonances due to H-3 (δ_{H} 5.54) and H-30 (δ_{H} 5.38) appeared as a sharp singlet and as a triplet, respectively, and were consistent with the presence of an ester residue at C-2. The placement of the isobutyryloxy group at C-3 was confirmed by analysis of the HMBC spectrum, since the carbonyl signal at 176.1 (C-24)

Table 3NMR spectroscopic data [^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz)] for **5** and **8** in CDCl_3 .

Position	5		8	
	δ_{C} , Type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , Type	δ_{H} (J in Hz)
1	208.1, C		205.1, C	
2	85.1, C		85.5, C	
3	79.3, CH	5.54 (s)	79.7, CH	5.84 (s)
4	40.5, C		41.1, C	
5	41.6, CH	3.32 (dd, 9.73, 1.86)	42.1, CH	3.11 (m)
6a	32.8, CH ₂	2.41 (dd, 17.03, 9.77)	33.1, CH ₂	2.39 (dd, 16.82, 9.66)
6b		2.32 (m) ^a		2.31 (m) ^a
7	174.0, C		174.2, C	
8	137.7, C		62.9, C	
9	56.5, CH	2.27 (m)	55.6, CH	1.90 (m) ^a
10	50.5, C		50.4, C	
11a	20.5, CH ₂	2.08 (m)	19.6, CH ₂	1.90 (m) ^a
11b		1.68 (m)		1.82 (m)
12a	34.4, CH ₂	1.68 (m)	33.4, CH ₂	2.0 (m)
12b		1.42 (ddd, 17.18, 7.85, 3.34)		1.2 (m)
13	37.0, C		36.5, C	
14	45.3, CH	2.27 (m) ^a	45.9, CH	1.60 (m)
15	30.0, CH ₂	2.91 (dd, 5.71, 3.93)	33.4, CH ₂	2.91 (m)
16	169.5, C		171.8, C	
17	77.4, CH	5.70 (s)	79.1, CH	5.15 (s)
18	22.1, CH ₃	1.11 (s)	26.7, CH ₃	1.01 (s)
19	15.8, CH ₃	1.22 (s)	16.3, CH ₃	1.16 (s)
20	120.7, C		120.2, C	
21	142.1, CH	7.79 (m)	141.1, CH	7.46 (m)
22	109.8, CH	6.46 (dd, 1.86, 0.80)	110.3, CH	6.44 (dd, 1.67, 0.63)
23	143.1, CH	7.42 (t, 1.72)	143.3, CH	7.43 (t, 1.68)
24	176.1, C		175.8, C	
25	34.1, CH	2.65 (m)	34.3, CH	2.80 (m)
26	18.7, CH ₃	1.18 (d, 1.74)	19.6, CH ₃	1.31 (d, 2.85)
27	19.3, CH ₃	1.17 (d, 1.58)	19.4, CH ₃	1.29 (d, 2.73)
28	20.9, CH ₃	0.98 (s)	21.1, CH ₃	0.99 (s)
29	22.2, CH ₃	0.75 (s)	22.2, CH ₃	0.78 (s)
30	125.7, CH	5.38 (t, 2.06)	65.4, CH	3.66 (s)
31	52.4, CH ₃	3.70 (s)	52.5, CH ₃	3.72 (s)
2-COCH ₃	169.3, C		169.4, C	
2-COCH ₃	21.7, CH ₃	2.12 (s)	21.5, CH ₃	2.17 (s)

^a Signal partially obscured.

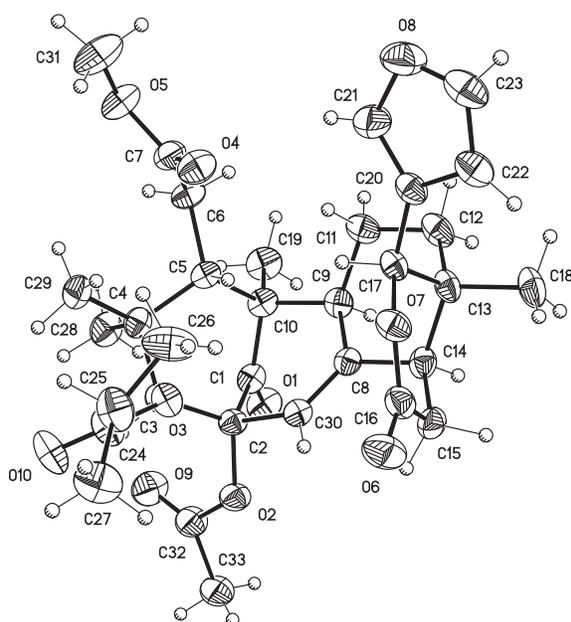


Fig. 3. ORTEP drawing of crystal structure of humilinolide G (5).

showed a long range correlation not only with the doublet at δ_{H} 1.17 (H-27) but also with the resonance at δ_{H} 5.54 (H-3). The structure of **5** was confirmed by X-ray analysis (Fig. 3). The information regarding the resolution of the structure is included in the Supplementary material (Tables S3–S8).

Humilinolide H (**8**), on the other hand, differed from **5** in the signals attributable to C-8 and C-30 nuclei in the ^1H and ^{13}C NMR spectra. Hence, the resonances for the 8(30)-trisubstituted olefin were missing in the spectra of **8**, and were replaced by those of an epoxy moiety (δ_{C} 62.9 and 65.4; δ_{H} 3.66). The placement of the isobutyryloxy at C-3 and of the acetyl at C-2 of the methyl 2,3-dihydroxy-1-oxomeliacate nucleus was also confirmed by analysis of the HMBC experiment; relevant correlations were observed between H-3 and C-24, C-27 and C-28. Moreover, the NOESY spectrum showed the interaction between H-30 (δ_{H} 3.66)/H-12 (δ_{H} 2.91) and H-14 (δ_{H} 1.60), supporting the α orientation of the epoxy ring. The absolute configuration at the stereogenic centers in both compounds was determined considering the negative Cotton effect at 290 nm in the CD spectra.

Since the active preparation was the decoction, the next step was to identify its chemical composition via an HPLC analysis as described in Section 4. According to the chromatogram obtained (Fig. S3), compounds **1**, **2** and **4** are the major components of the decoction, although the remaining limonoids isolated from the organic extract were also identified. Thus, the limonoids are the major active principles found in the decoction of the seeds. It is important to point out that the compounds were isolated from the organic extract in order to secure better yields for the pharmacological investigation.

2.2.1. Hypoglycemic and antihyperglycemic potential of compounds **1**, **2**, and **4** in mice

The hypoglycemic and antihyperglycemic effects of **1**, **2** and **4** (3.16–31.6 mg/kg) were evaluated in the NA-STZ mice model using the acute hypoglycemic assay and the OGTT, respectively. These limonoids were selected for testing because they represented the main constituents of the decoction (Fig. S3) and were isolated in adequate amounts to perform *in vivo* assays. As shown in Fig. S1 and Fig. 1, compounds **1** and **4** caused a significant

hypoglycemic effect in normoglycemic and hyperglycemic mice when compared with vehicle-treated groups ($p < 0.05$). The effect was not dose-dependent. When tested in normoglycemic mice during an OGTT (Fig. S2B–D), compounds **1**, **2**, and **4** diminished the postprandial peak in a dose-dependent fashion ($p < 0.05$); compound **4** showed the maximum antihyperglycemic effect since it almost completely abolished the postprandial peak (augmentation of 1.0% and 0.44% of glycemia for the doses of 10 and 31.6 mg/kg, respectively). In hyperglycemic mice (Fig. 2B–D), compounds **1** and **2** (3.16–31.6 mg/kg) reduced the postprandial peak in an independent dose-manner; and **4** was only active at the higher dose evaluated ($p < 0.05$, 31.6 mg/kg). Thus, mexicanolides are not only hypoglycemic but also antihyperglycemic agents. Previously, it was reported that swietenine (25 and 50 mg/kg), a mexicanolide isolated from the seeds of the related species *S. macrophylla*, showed a moderate hypoglycemic action in a neonatal-STZ diabetic rat model (Dewanjee et al., 2009); however its antihyperglycemic action was not tested.

Although limonoids **1**, **2** and **4** were the major hypoglycemic and antihyperglycemic limonoids of the decoction, the remaining compounds could also contribute to the pharmacological action displayed by SHD. Furthermore, they could be acting synergistically on different molecular targets to produce antidiabetic and hypolipidemic effects (Wagner and Merzenich, 2009). Likewise, the mixture of components in SHD could enhance the bioavailability of one or several compounds of the extract, thus improving their pharmacological actions (Wagner and Merzenich, 2009).

2.3. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of SHD, and compounds **1**, **2**, and **4**

Many reports have documented that oxidative stress is partially responsible for diminution of insulin secretion and impairment of glucose utilization in peripheral tissues, accelerating the development and progression of T2DM. Because of these presumptions, antioxidants could be ideal supplements to reverse oxidative stress and its consequences. Along these lines, SHD and compounds from *S. humilis* were tested for their radical scavenging actions using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay (De la Rosa et al., 2014; Huang et al., 2002). The results obtained for the decoction and compounds **1**, **2**, and **4**, demonstrated a moderate capacity (SHD, 115.64 ± 6.45 ; **1**, 2.02 ± 0.29 ; **2**, 16.24 ± 0.30 ; **4**, 12.29 ± 0.54 μmol Trolox equivalent per gram) to inhibit free radical damage to fluorescein induced by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH). This action could be of benefit for eliminating reactive oxygen species (ROS), and in turn for attenuating the complications of T2DM.

3. Concluding remarks

This is the first report of the preclinical efficacy of *S. humilis* and some of its limonoids as hypoglycemic and antihyperglycemic agents, which in turn supports the use of its seeds for treating diabetes in contemporary Mexico. Compounds **5** and **8**, identified in the aqueous active extract along with compounds **1–4**, **6** and **7**, are new chemical entities. The results of this investigation are relevant considering that almost ten percent of the Mexican population is affected by T2DM (IDF, 2013). *S. humilis* and/or its limonoids could be a suitable alternative for the development of safer and cheaper phytotherapeutic agents.

4. Experimental

4.1. Reagents

Analytical grade solvents (CH_2Cl_2 , EtOAc, and *n*-hexane) and high performance liquid chromatography (HPLC) grade solvents

(CH₃CN and H₂O) were purchased from Tecrom (Mexico City, Mexico). Analytical reagents [amyloglucosidase, glibenclamide (GLI), metformin (MTF), glucose, nicotinamide (NA), streptozotocin (STZ), Tween 80, Trolox, and AAPH] were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or from EMD Millipore (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

4.2. General experimental procedures

Melting points were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. IR spectra were obtained in a Fourier Transform Infrared (FTIR) 1605 Perkin-Elmer apparatus (4000–400 cm⁻¹). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) experiments (¹H, ¹³C, HMBC, HSQC, COSY, and NOESY) were recorded in CDCl₃ on a Varian Unity Plus 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. Tetramethylsilane (TMS) was used as internal standard. Mass spectra were obtained on an Agilent 6890 N series gas chromatograph coupled with a LECO time of flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, CA, USA) with ionization voltage of 70 eV. X-ray diffraction analysis was conducted on a Bruker Smart Apex CCD diffractometer 01-670-01. Column chromatography (CC) was accomplished using silica gel 60 (Merck, 70–230 mesh; Darmstadt, Germany). Reversed-phase HPLC was carried out using a Waters liquid chromatography system equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector (HPLC-PDA), a quaternary pump, and a manual injector (Waters Corp., Milford, MA, USA). Waters Empower 2 software was used for data handling and setting of chromatographic conditions. Analytical chromatography was performed using either a Symmetry[®] C-18 column (250 mm × 4.6 mm, *i.d.*, 5 μm; Waters), a gradient elution mode with CH₃CN–H₂O (65–35 → 70–30 in 15 min or CH₃CN–H₂O 80–20 → 75–25 in 10 min) at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹, or a Hiba[®] RT LiChrospher[®] 100 RP-18 column (250 mm × 4.0 mm, *i.d.*, 5 μm; Merck), a gradient elution mode with CH₃OH–CH₃CN–H₂O acidified with HCO₂H at 0.05% (6–55–39 → 6–60–34 in 30 min, pH 4) at a flow rate of 0.4 ml/min. Separations with semi-preparative RP-HPLC were achieved using a Symmetry Prep[™] C-18 column (300 mm × 7.8 mm, *i.d.*, 7 μm; Waters) and a gradient elution mode with CH₃CN–H₂O (65–35 → 70–30 in 15 min or CH₃CN–H₂O 80–20 → 75–25 in 10 min) at a flow rate of 3.45 ml min⁻¹. Detection was carried out from 210 to 400 nm.

4.3. Plant material and preparation of the extracts

Seeds of *S. humilis* were collected in Santa Úrsula, Temixco Municipality (Morelos, Mexico) on April 2013. A voucher specimen (1355304) is deposited at the National Herbarium (MEXU). For compound isolation, an organic extract was prepared. Seeds (1 kg) were grounded (mesh 2 mm) and defatted with *n*-hexane (7 L) four times. The defatted plant material was then exhaustively extracted by maceration at room temperature with CH₂Cl₂–MeOH (1:1; 7 L) during 10 days. After filtration, the extract was concentrated under reduced pressure to yield a yellow residue (112 g). For biological testing an aqueous extract was prepared by heating 15 g of ground seeds in H₂O (300 ml) during 45 min at 70 °C. The extract (SHD) was filtrated and concentrated *in vacuo* to yield a brownish residue (0.75 g); the process was repeated as needed.

4.4. Isolation of compounds 1–8

The organic extract (100 g) was fractionated by silica gel CC (2.0 kg) eluting with hexane–CH₂Cl₂ (80:20 → 20:80) to yield 10 primary fractions (F_I–F_X). Fraction F_{VII} (22 g) was further fractionated by silica gel CC (850 g) using hexane–EtOAc (100:0 → 0:100) and EtOAc–MeOH (100:0 → 80:20) to afford 10 secondary fractions (F_{VII-1}–F_{VII-10}). From fraction F_{VII-5} crystallized 1.2 g of 2-hydroxy-des-

tigloyl-6-deoxyswietenine acetate (**1**), a crystalline solid, mp 248–250 °C (Mulholland and Taylor, 1992). Fraction F_{VII-4} (6 g) was fractionated by silica gel (320 g) CC eluting with hexane–EtOAc (100:0 → 0:100) to obtain seven tertiary fractions (F_{VII-4a}–F_{VII-4g}). From fraction F_{VII-4d} precipitated [hexane–EtOAc (99.5:0.5)] a white powder (2.8 g) which was purified using semi-preparative RP-HPLC-PDA (gradient elution mode: CH₃CN–H₂O 65–35 → 70–30 in 15 min; flow rate of 3.45 ml min⁻¹) to yield compounds humulin B (**2**, 20 mg), methyl-2-hydroxy-3-β-isobutyroxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**3**, 14 mg), and methyl-2-hydroxy-3-β-tigloyloxy-1-oxomeliac-8(30)-enate (**4**, 20 mg). Fraction F_{VII} (8 g) was fractionated using silica gel (410 g) CC using hexane–EtOAc (100:0 → 50:50) to yield 10 secondary fractions (F_{VI-1}–F_{VI-10}). RP-HPLC-PDA of fraction F_{VI-4} (600 mg; gradient elution mode: CH₃CN–H₂O 80–20 → 77–23 in 3 min and 77–23 → 75–25 in 10 min; flow rate of 3.45 ml min⁻¹) yielded new compound humilinolide G (**5**, 15 mg) and humilinolide C (**6**, 15 mg). Fraction F_{VII-3} (3 g) was fractionated by silica gel (200 g) CC using hexane–EtOAc (100:0 → 60:40) to yield six tertiary fractions (F_{VII-3a}–F_{VII-3f}). Analytical RP-HPLC-PDA chromatography of fraction F_{VII-3c} (1.2 g) showed a complex mixture. 100 mg of this fraction were resolved using argentation chromatography (Cardoso-Taketa et al., 2004; Morris, 1966) on silica gel eluting with hexane–EtOAc (90:10 → 70:30). Three groups of fractions were obtained, analyzed and purified using RP-HPLC (gradient elution mode: CH₃CN–H₂O 65–35 → 70–30 in 15 min; flow rate of 3.45 ml min⁻¹) to yield compound methyl-2-hydroxy-3-β-isobutyroyl-8α,30α-epoxy-1-oxomeliacate (**7**, 11 mg). Finally, fraction F_V (10 g) was further fractionated using silica gel (510 g) CC with hexane–EtOAc (100:0 → 60:40) as eluents; this process yielded six secondary fractions (F_{V-1}–F_{V-6}). RP-HPLC-PDA of secondary fraction F_{V-5} (450 mg; isocratic elution mode: CH₃CN–H₂O 73–27 in 10 min; flow rate of 4.0 ml min⁻¹) afforded **5** (10 mg), **6** (15 mg), and new compound humilinolide H (**8**, 15 mg). The structures of the isolates were characterized by spectroscopic and spectrometric analyses and by comparison with literature data.

4.5. Humilinolide G (**5**)

Colorless crystal; m.p. 245 °C; [α]_D²⁵ –124.77 (c. 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 208 (0.728) nm; IR (FTIR) ν_{max}: 3604, 2976, 2951, 1725, 1504, 1470, 1434, 1293, 1221, 1197 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (CDCl₃), see Table 3; EIMS *m/z* (rel. int.): 598 (3, [M]⁺), 71 (100), 95 (96), 134 (30), 379 (15); HREIMS *m/z* 598.2775 (calcd. for C₃₃H₄₂O₁₀, 598.2778).

4.6. Humilinolide H (**8**)

White powder; m.p. 203–204 °C; [α]_D²⁵ –104.27 (c. 1.0, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 207.6 (0.609) nm; IR (FTIR) ν_{max}: 3444, 2950, 1725, 1506, 1139 cm⁻¹; for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (CDCl₃), see Table 3; EIMS *m/z* (rel. int.): 614 (6, [M]⁺), 367 (63), 237(100); HREIMS *m/z* 614.2725 (calcd. for C₃₃H₄₂O₁₁, 614.2727).

4.7. Crystal data of compound 5

A suitable crystal for X-ray analysis of humilinolide G (**5**) was obtained from a mixture hexane–EtOAc. Figures were plotted with the aid of the ORTEP program. Crystallographic data for compound **5** was deposited in the Cambridge Crystallographic Data Center. CCDC 1012328 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

4.8. Establishment of the chromatographic profile of the aqueous extract

The dried extract (0.5 g) was dissolved in distilled H₂O (20 ml) and defatted with hexane (20 ml). Next, the organic fraction of the aqueous extract was obtained by means of a partition process with EtOAc (20 ml). This fraction was concentrated under reduced pressure to yield a yellowish residue (0.06 g). Nine milligrams of this fraction were dissolved in CH₃CN (500 μl) and filtered through a 0.45 μm GHP filter (Milford, MA, USA) before HPLC analysis. Peaks in the chromatogram were identified by co-elution with compounds **1–8**.

4.9. Pharmacological study

4.9.1. Animals

Male ICR mice weighing 25–30 g and male Sprague Dawley rats (200–260 g) were obtained from Centro UNAM-Harlan (Harlan Laboratories S.A. de C.V., Mexico). Animals were kept on a 12 h light/dark cycle under controlled temperature (22 ± 1 °C) and given standard pellet diet and H₂O *ad libitum* until the beginning of each experiment. Animal experimental protocols followed recommendations of the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and were in conformity with international ethical guidelines for the care and use of laboratory animals. The Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-FQ) of Facultad de Química, UNAM, approved the experimental protocols (FQ/CICUAL/021/11).

4.9.2. Preparation of samples

Glibenclamide (GLI, 15 mg/kg) and metformin (MTF, 200 mg/kg) were used as positive controls as hypoglycemic and antihyperglycemic drugs, respectively. These drugs as well as the crude drug of *S. humilis* (seeds), the decoction prepared from it (SHD) and compounds **1**, **2** and **4** were suspended in the vehicle (VEH, 0.05% Tween 80 in saline solution). A glucose solution (1.0 g/kg for mice and 2.0 g/kg for rats) was used for the oral glucose tolerance test; a sucrose solution (2 g/kg) was fed to mice during the oral sucrose tolerance test. All treatments were administered by intragastric route (0.2 ml/10 g bw for mice and 0.2 ml/100 g bw for rats).

4.9.3. Acute oral toxicity study in mice

Acute oral toxicity of the seeds and of the decoction of *S. humilis* was assessed applying the Lorke procedure (Lorke, 1983). The samples were administered by intragastric route in two independent phases; in both, twelve mice were divided into four groups ($n = 3$). Doses administered in the first phase were 10, 100, and 1000 mg/kg. In the second phase, the doses were 1600, 2900, and 5000 mg/kg. Control animals received 0.05% Tween 80 in saline solution. In both phases animals were observed to identify acute toxic effects, changes in behavior pattern or mortality. Mice weight was registered daily during 14 days. At the end of the experiments all animals were sacrificed in a CO₂ chamber in order to obtain heart, lungs, liver and kidneys to detect macroscopic organ damage.

4.9.4. Induction of experimental hyperglycemia in mice

Mice received a single intraperitoneal (*i.p.*) administration of nicotinamide (50 mg/kg) dissolved in saline solution. Thirty minutes later, streptozotocin (130 mg/kg) dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) was administered *i.p.* to all animals. One week later, blood glucose levels were measured using a commercial glucometer.

4.9.5. Collection of blood samples and determination glycemia

Blood samples were collected by means of a small incision at the end of the tail. Glycemia (mg/dL) was measured using a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA). The percentage variation of glycemia for each animal was calculated with respect to its basal level as follows: % variation of glycemia = $[(G_t - G_i)/G_i] \times 100$, where G_i is the basal glycemia and G_t are the different glycemia values after treatment administration.

4.9.6. Acute hypoglycemic assay in normoglycemic and hyperglycemic mice

Normal and hyperglycemic mice were randomly divided in five groups ($n = 6$) and deprived of food before experimentation with access to simple water *ad libitum*. SHD was tested in the range of doses between 31.6 and 316 mg/kg; compounds **1** and **4** were tested in the range of 3.16–316 mg/kg; GLI (15 mg/kg) was used as positive control. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after treatment administration. Percentage variation of glycemia was calculated as previously stated. Area under the curve (AUC) was calculated with the trapezoidal method applying the following formula: $AUC [(mg \times h)/dL] = \sum \{[(G_{T1} + G_{T2})/2] \times (T_2 - T_1)\}$, where G_{T1} and G_{T2} represent glycemia at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after treatment administration.

4.9.7. Oral glucose tolerance test (OGTT) in normoglycemic and hyperglycemic mice

Normal and hyperglycemic mice were deprived of food 4 h before the experiment with free access to drinking water. SHD was tested in the range of 100–316 mg/kg, and compounds **1**, **2** and **4** in the range from 3.16 to 316 mg/kg. Vehicle group received saline solution. MTF (200 mg/kg) was used as positive control. Basal glycemia was recorded before intragastric administration of treatments; 30 min later all animals received a glucose load (1 g/kg). Blood samples were collected at 30, 60, 90, 120 and 180 min after glucose load. Percentage variation of glycemia was calculated as previously described.

4.9.8. Oral sucrose tolerance test (OSTT) in normoglycemic and hyperglycemic mice

The procedure for evaluating SHD (100, 177 and 316 mg/kg) during an OSTT was identical to that used for the OGTT. However, in this case the carbohydrate load was sucrose (2 g/kg) and the positive control was acarbose (5 mg/kg).

4.10. Induction of metabolic syndrome in Sprague Dawley rats (FF-MS)

After adaptation during seven days, rats were randomly divided into four groups ($n = 6$) and housed as couples in acrylic cages. Rats were given regular rodent chow (2018S pellets: 44.2% carbohydrate, 18% protein, 6.2% fat; 3.1 kcal/g; Teklad Global Diets, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN, USA). In addition, control group I received H₂O, and control group II and groups III and IV were fed with a 10% fructose solution as drinking H₂O. The fructose solution was administered throughout the experiment. The animals were weighed and measured (nose to anus length) at the beginning and at the end of the experiment period; Lee index was calculated by dividing the cubic root of the final body weight (g) by the final body length (cm) and multiplying by 1000 (Ferreira de Moura et al., 2009). The period for inducing metabolic syndrome was 12 weeks.

4.10.1. Oral glucose tolerance test in FF-MS-induced rats

OGTT was conducted as previously described. Twelve weeks FF-MS-induced rats were divided in three groups ($n = 6$). Fructose control group (group II) received saline solution and groups III and IV

were treated with SHD (100 mg/kg and 316 mg/kg). Metformin was used as positive control. Basal glycemia was recorded before intragastric administration of treatments; 30 min later all animals received a glucose load (2 g/kg). Blood samples were collected at 30, 60, 90, and 120 min after glucose challenge. Percentage variation of glycemia was calculated as previously stated.

4.10.2. Effects of daily treatment with SHD in FF-MS-induced rats

After the OGTT the animals were allowed to recover during six days while feeding with the fructose solution. At week 14 (day 98), animals from groups III and IV were treated during seven days with the decoction of *S. humilis* (group III: 100 mg/kg and group IV: 316 mg/kg, $n = 6$) while maintaining the fructose feeding. Group I was treated with 0.05% Tween 80 in saline solution, water and normal diet, whereas group II received 0.05% Tween 80 in saline solution and the fructose solution until day 104.

4.10.3. Collection of blood and liver samples

At day 105, all animals were fasted during 4 h, with free access to H₂O, and anesthetized with ketamine–xilazine (80–10 mg/kg *i.p.*) to obtain blood by means of a retro-orbital puncture. The serum was separated by centrifuging the blood at 3000 rpm during 5 min. After collecting blood samples, livers were excised immediately. All serum and tissue samples were stored at -80°C until use for determination of biochemical parameters.

4.10.4. Determination of biochemical parameters

The serum glucose, triglycerides, total cholesterol and uric acid levels were determined using colorimetric procedures and commercial reagents (Glucose Randox, Triglyceride Assay Randox, Cholesterol Randox, Uric acid assay Randox; Randox Laboratories-US, Ltd., Kearneysville, WV, USA).

4.10.5. Measurement of hepatic glycogen content and serum insulin levels

Hepatic glycogen content was analyzed according to the Murat and Serfaty (1974) procedure (Murat and Serfaty, 1974). Briefly, liver samples (50 mg) were homogenized in ice-cold citrate buffer (1 ml, 0.1 M, pH 4.2). Homogenates were diluted with citrate buffer to yield 5 mg of tissue/ml. Ten microliter of the latter sample was mixed with 10 μl of amyloglucosidase (exo-1,4- α -glucosidase, EC 3.2.1.3; 1 mg/ml); the mixture was allowed to stand at room temperature for 2 h; 10 μl of this mixture were employed to determine free glucose by means of the glucose oxidase method (Glucose TR, Spinreact, Girona, Spain). Glycogen content was expressed as mg of glucose *per* mg of hepatic tissue. Plasma insulin levels were estimated using a commercial kit (ALPCO Rat Insulin ELISA. ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA).

4.11. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of SHD, and compounds 1, 2, and 4

The ORAC assay method was performed to assess peroxy radical scavenging activity of the decoction of the seeds of *S. humilis* (SHD) as well of compounds 1, 2, and 4, as previously described (De la Rosa et al., 2014; Huang et al., 2002). Briefly, 25 μl of samples [water, Trolox standard, SHD (2.5 mg/ml), 1, 2, and 4 (1.25 mg/ml)] were mixed with 25 μl of 153 mM AAPH (peroxy radical generator) and with 150 μl of 50 nM fluorescein (fluorescent probe). Samples were incubated at 37°C for 10 min. The fluorescence was read every minute for 35 min using fluorescence filters at 485 nm and 520 nm using a Multi-Mode Microplate Reader (BioRad Benchmark Plus, BioRad Laboratories, Inc., USA). The ORAC values were calculated using the net area under the decay curves. Results were expressed as the mean \pm SEM of the μmol equivalents of Trolox *per* gram of tested sample ($n = 4$).

4.12. Statistical analysis

The results of the biological evaluations are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). Statistical differences were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's *post hoc* test or two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test ($p < 0.05$). For the analyses, Prism software was used (version 5.0; GraphPad Inc., La Jolla, USA).

Acknowledgments

This work was supported by a grant from CONACYT (99395). We thank R.I. Del Villar, G. Duarte, M. Gutiérrez, I. Rivero, R. Del Carmen and A. Pérez for their valuable technical assistance. B. Ovalle-Magallanes acknowledges a fellowship from CONACYT (240053) to pursue graduate studies in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.004>.

References

- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348.
- Cardoso-Taketa, A.T., Lozada-Lechuga, J., Frago-Serrano, M., Villarreal, M., Pereda-Miranda, R., 2004. Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *J. Nat. Prod.* 67, 644–649.
- De la Rosa, L., Vázquez-Flores, A., Álvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Medina-Campos, O.N., Ávila-Nava, A., González-Reyes, S., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. *J. Funct. Food.* 7, 219–228.
- De, D., Chatterjee, K., Monjur-Ali, K., Bera, T.K., Ghosh, D., 2011. Antidiabetic potentiality of the aqueous-methanolic extract of seed of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. in streptozotocin-induced diabetic male albino rat: a correlative and evidence-based approach with antioxidative and antihyperlipidemic activities. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2011, 1–11.
- Dewanjee, S., Maiti, A., Das, A.K., Mandal, S.C., Dey, S.P., 2009. Swietenine: a potential oral hypoglycemic from *Swietenia macrophylla* seed. *Fitoterapia* 80, 249–251.
- Ferreira de Moura, R., Ribeiro, C., Aparecida de Oliveira, J., Stevanato, E., Rostom de Mello, M., 2009. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Brit. J. Nutr.* 101, 1178–1184.
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J. Ethnopharmacol.* 115, 173–183.
- Guarente, L., 2008. Mitochondria—a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132 (2), 171–176.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L., 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4437–4444.
- Hung, H., Ojan, K., Morris-Natschke, S., Hsu, C., Lee, K., 2012. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 580–606.
- IDF Atlas, 2013. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, sixth ed. [Online], International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2013, pp. 11–13. <<http://www.idf.org/diabetesatlas>> (accessed Nov 15, 2013).
- Jiménez, A., Villarreal, C., Toscano, R., Cook, M., Arnason, J.T., Bye, R., Mata, R., 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry* 49 (7), 1981–1988.
- Kecskemeti, V., Bagi, Z., Pacher, P., Posa, I., Kocsis, E., Koltai, M., 2002. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. *Curr. Med. Chem.* 9, 53–71.
- Leto, D., Saltiel, A.R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (6), 383–396.
- Lim, J.S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J., Lustig, R., 2010. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 251–264.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275–287.
- Mata, R., Cristians, S., Escandón-Rivera, S., Juárez-Reyes, K., Rivero-Cruz, I., 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -Glucosidases. *J. Nat. Prod.* 76 (3), 468–483.
- Morris, L.J., 1966. Separations of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid. Res.* 7, 717–732.

- Mulholland, D.A., Taylor, D.A.H., 1992. Limonoids from Australian members of the Meliaceae. *Phytochemistry* 31 (12), 4163–4166.
- Mulholland, D.A., Taylor, D.A.H., 1988. Limonoid extractives from the genera *Capuroniantiyus*, *Neobeguea* and *Quivisianthe*. *Phytochemistry* 27 (6), 1741–1743.
- Murat, J.C., Serfaty, A., 1974. Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clin. Chem.* 20, 1576–1577.
- Okorie, D.A., Taylor, D.A.H., 1971. Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 10, 469–470.
- Panchal, S., Brown, L., 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 351982–351995.
- Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Huerta-Reyes, M., Tortoriello-García, J., 2009. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *BLACPM* 8 (5), 380–388.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M., Bye, R., Linares, E., 1993. New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J. Nat. Prod.* 56 (9), 1567–1574.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 536–546.
- Tahara, A., Yokono, M., Nakano, R., Someya, Y., Shibasaki, M., 2008. Effects of antidiabetic drugs on glucose tolerance in streptozotocin–nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic mice. *Horm. Metab. Res.* 40, 880–886.
- Wagner, H., Merzenich, U., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.
- Wilson, R., Islam, S., 2012. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol. Rep.* 64, 129–139.
- Wojcikowski, K., Gobe, G., 2014. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value. *Phytother. Res.* 28, 22–27.