



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

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti Y DE LA PARTE AÉREA DE *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. SOBRE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA EN RATAS STZ-NA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FERNANDA ARTEMISA ESPINOZA HERNÁNDEZ

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

COMITÉ TUTOR: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Ciudad de México

FEBRERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

OFICIO FCIE/DEP/801/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **ESPINOZA HERNÁNDEZ FERNANDA ARTEMISA** con número de cuenta **306072679** con la tesis titulada **"EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti Y DE LA PARTE AÉREA DE *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. SOBRE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA EN RATAS STZ-NA"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Vocal: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
Secretario: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA
Suplente: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de diciembre de 2016


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad que me brindó para fortalecer mis conocimientos y crecer académicamente.

A CONACYT por la beca otorgada (CVU: 625227) y al proyecto DGAPA PAPIIT IN228216 por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto.

A mi tutor, el Dr. Adolfo Andrade Cetto, por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para la elaboración de este proyecto. Agradezco la confianza y el tiempo que me brindó para guiarme y para resolver los contratiempos que se presentaron a lo largo de los experimentos y la escritura de la tesis.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez y a la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor, miembros de mi comité tutor, por su guía, sus consejos y su tiempo para evaluar y mejorar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el espacio brindado para seguir creciendo profesionalmente.

A los miembros que constituyeron mi jurado: a la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera, a la Dra. Rachel Mata Essayag y al Dr. Sol Cristians Niizawa, por su tiempo y consejos que permitieron mejorar este trabajo.

A mis compañeros, alumnos y amigos del laboratorio de Etnofarmacología, por sus aportaciones académicas y por su apoyo para terminar este proyecto.

A mis amigos Dalia, Vanessa, Armando y Nancy, por apoyarme, escucharme y creer en mí.

A mi familia, mis padres Ana y Manuel y mi hermano Ulises, por ser parte fundamental de mi vida y por brindarme palabras de aliento siempre.

A mi compañero de vida Gerardo, por sus aportaciones académicas durante el desarrollo de todo el proyecto, por su apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado a pesar de todas las dificultades.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	4
ANTECEDENTES	5
1. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DE LA GLUCOSA	5
2. DIABETES MELLITUS	9
2.1. CLASIFICACIÓN	10
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	12
3. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA EN DIABETES	14
3.1. GLUCONEOGÉNESIS	17
3.2. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS	19
4. CONTROL DE LA GLUCONEOGÉNESIS EN EL TRATAMIENTO DE DIABETES	20
4.1. GLUCOSA-6-FOSFATASA COMO BLANCO TERAPÉUTICO PARA LA INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS	22
4.1.1. Inhibidores naturales de G6Pasa T1	23
5. INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS POR EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES	26
5.1. PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES	27
5.1.1. <i>Smilax moranensis</i> M. Martens & Galeotti	29
5.1.2. <i>Ageratina petiolaris</i> (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob.	34

METODOLOGÍA	37
1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	37
1.1. OBTENCIÓN DE PLANTAS	37
1.2. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS	37
1.2.1. Extracto etanol-agua de la raíz de <i>S. moranensis</i>	37
1.2.2. Extracto acuoso de la parte aérea de <i>A. petiolaris</i>	38
2. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS <i>IN VIVO</i>	38
2.1. ANIMALES EXPERIMENTALES	39
2.2. INDUCCIÓN DEL MODELO HIPERGLUCÉMICO STZ-NA	39
2.3. PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO	39
3. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DIRECTA DE G6PASA <i>IN VITRO</i>	40
3.1. OBTENCIÓN DE MICROSOMAS	41
3.2. CURVAS DE INHIBICIÓN CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	41
3.2.1. Ensayo de selección de volumen de microsomas	41
3.2.2. Ensayo de inhibición de la G6Pasa	42
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS	45
1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	45
2. REDUCCIÓN DEL PICO HIPERGLUCÉMICO POR LOS EXTRACTOS EN LAS PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO	45
3. CARACTERIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA G6PASA POR LOS EXTRACTOS MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE LAS IC₅₀	50
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	57
LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la homeostasis de la glucosa por la insulina y el glucagon	6
Figura 2. Papel de la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo	8
Figura 3. Regiones categorizadas por la Federación Internacional de Diabetes (IDF) que proporcionan las cifras de número de diabéticos en el mundo en 2015 y 2040	13
Figura 4. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2	14
Figura 5. Factores involucrados en el desarrollo de la resistencia a la insulina en DM2	16
Figura 6. Esquema general de la vía de gluconeogénesis	18
Figura 7. Mecanismos de acción de la metformina involucrados en la inhibición de la gluconeogénesis	21
Figura 8. Sistema enzimático de G6Pasa	23
Figura 9. Estructuras de algunos ejemplos de inhibidores naturales de G6Pasa T1	25
Figura 10. Características morfológicas de <i>S. moranensis</i>	29
Figura 11. Distribución de <i>S. moranensis</i> en la República Mexicana.	30
Figura 12. Ejemplos de metabolitos presentes en especies del género <i>Smilax</i>	32
Figura 13. Características morfológicas de <i>A. petiolaris</i>	34
Figura 14. Distribución de <i>A. petiolaris</i> en la República Mexicana	35
Figura 15. Estructuras del ácido clorogénico y L-quirositol, compuestos aislados en los extractos acuoso y metanólico de <i>A. petiolaris</i>	36
Figura 16. Diseño experimental de los ensayos <i>in vitro</i> para la realización de las curvas de inhibición concentración-respuesta	43
Figura 17. Comportamiento general de los niveles de glucosa plasmática de los grupos en la prueba de tolerancia a piruvato	46
Figura 18. Reducción del pico hiperglucémico observado a los 30 minutos de la prueba de tolerancia a piruvato	49
Figura 19. Curvas de inhibición concentración-respuesta de la actividad de la enzima G6Pasa	51
Figura 20. Inhibición colorimétrica de la actividad de la enzima G6Pasa	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de diabetes	11
Tabla 2. Inhibidores de G6Pasa T1 derivados del ácido clorogénico	24
Tabla 3. Ejemplos de metabolitos secundarios con efecto hipoglucemiante y su mecanismo de acción	28
Tabla 4. Información taxonómica de <i>S. moranensis</i>	29
Tabla 5. Compuestos químicos identificados en extractos de la raíz de <i>S. moranensis</i>	32
Tabla 6. Información taxonómica de <i>A. petiolaris</i>	34
Tabla 7. Grupos experimentales asignados a las pruebas de tolerancia a piruvato con su respectivo tratamiento y dosis correspondiente	40
Tabla 8. Valores presentados como promedios de glucosa plasmática (mg/dl± EEM) de los grupos en la prueba de tolerancia a piruvato	45

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADP	adenosín difosfato
AGEs	productos de glicación avanzada
AMP	adenosín monofosfato
AMPC	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína cinasa activada por AMP
ATP	adenosín trifosfato
CO ₂	dióxido de carbono
DER	Drug Extraction Ratio
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
F1,6Pasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
G6P	glucosa-6-fosfato
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GDP	guanosín difosfato
GLUT2	transportador de glucosa 2
GLUT4	transportador de glucosa 4
GTP	guanosín trifosfato
H	grupo control hiperglucémico
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfónico
HP	grupo control hiperglucémico con piruvato
HPAp	grupo experimental hiperglucémico con piruvato y extracto acuoso de la parte aérea de <i>A. petiolaris</i>
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPM	grupo control hiperglucémico con piruvato y metformina
HPSm	grupo experimental hiperglucémico con piruvato y extracto etanol-agua de la raíz de <i>S. moranensis</i>
IC ₅₀	concentración inhibitoria 50

IDF	Federación Internacional de Diabetes
IL6	interleucina 6
IRS	sustratos del receptor de insulina
LADA	diabetes autoinmune latente del adulto
MODY	diabetes de la madurez de inicio en el joven
N	grupo control normoglucémico
NA	nicotinamida
NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NFκB	factor nuclear κB
NP	grupo control normoglucémico con piruvato
PARP-1	poli(ADP-ribosa) polimerasa 1
PC	piruvato carboxilasa
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	proteína cinasa C
SDS	dodecilsulfato sódico
STZ	estreptozotocina
T1	translocasa 1 de glucosa-6-fosfato
T2	translocasa 2 de fosfato
T3	translocasa 3 de glucosa
TLC	cromatografía en capa fina
TNFα	factor de necrosis tumoral α
TZD	tiazolidinedionas
WHO	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está caracterizada por una hiperglucemia crónica que es resultado de la resistencia que presentan los tejidos a la insulina y de su deficiente secreción por las células β del páncreas. La producción hepática de glucosa *de novo* o gluconeogénesis representa uno de los blancos terapéuticos para tratar la enfermedad debido a que su inhibición podría ayudar al control de la glucemia a largo plazo.

En la presente investigación se evaluó el efecto de los extractos de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana sobre la gluconeogénesis: el extracto etanol-agua de la raíz de *Smilax moranensis* y el extracto acuoso de la parte aérea de *Ageratina petiolaris*, mediante un diseño experimental *in vivo*, donde se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato en ratas hiperglucémicas STZ-NA con un ayuno prolongado, administrando los extractos vía oral, y 15 minutos después inyectando piruvato vía intraperitoneal para elevar los niveles de glucosa mediante la gluconeogénesis. Por otro lado, se realizaron curvas concentración-respuesta para caracterizar la inhibición directa del complejo enzimático glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), enzima reguladora implicada en el último paso de la vía gluconeogénica, a través de la obtención de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de cada extracto.

Los resultados mostraron que el extracto etanol-agua de *S. moranensis* disminuyó el pico hiperglucémico observado a los 30 minutos de la prueba de tolerancia a piruvato en un 21% en comparación con el grupo control, mientras que el extracto acuoso de *A. petiolaris* ocasionó la reducción significativa del pico hiperglucémico en un 30% en comparación con el grupo control, manteniendo la diferencia durante la siguiente hora del experimento (60 y 90 minutos). En los ensayos *in vitro*, el extracto de *S. moranensis* inhibió con mayor potencia la G6Pasa con una IC₅₀ de 84 $\mu\text{g/ml}$, y el extracto acuoso de *A. petiolaris* fue menos potente con una IC₅₀ de 223 $\mu\text{g/ml}$.

Se concluye que uno de los mecanismos de acción de ambas plantas que contribuye a su efecto hipoglucemiante es la inhibición de la producción hepática de glucosa *de novo*.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a chronic disease characterized by an elevated blood glucose level associated with peripheral insulin resistance combined with a deficiency in insulin secretion. The inhibition of *de novo* hepatic glucose production or gluconeogenesis represents one of the therapeutic targets to treat the disease in order to control blood glucose in the long term.

The effect of extracts from two plants used by traditional Mexican medicine on gluconeogenesis was evaluated: ethanol-water extract of *Smilax moranensis* root and aqueous extract of the aerial parts of *Ageratina petiolaris*. Pyruvate tolerance tests were performed in fasting hyperglycemic rats STZ-NA: fifteen minutes after the oral administration of the extracts, pyruvate was administered intraperitoneally for raising glucose levels. Furthermore, concentration-response curves were performed to characterize the direct inhibition of the enzymatic complex glucose-6-phosphatase (G6Pase), a gluconeogenic regulatory enzyme, through the obtention of the inhibitory concentration 50 (IC₅₀) from each extract.

The results showed that the ethanol-water extract of *S. moranensis* decreased the hyperglycemic peak by 21% observed at 30 minutes of the test compared to the hyperglycemic control group. The aqueous extract of *A. petiolaris* caused a significant reduction of hyperglycemic peak by 30% compared to the hyperglycemic control group, maintaining the difference during the next hour of the experiment (60 and 90 minutes). In the *in vitro* assay, ethanol-water extract of *S. moranensis* extract inhibited G6Pase with an enhanced IC₅₀ of 84 µg/ml, and the aqueous extract of *A. petiolaris* was less potent with an IC₅₀ of 223 µg/ml.

It is concluded that one of the mechanisms of action of both plants contributing to its hypoglycemic effect, is the inhibition of *de novo* the hepatic glucose production.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia que es resultado de la falla en la secreción de insulina, en su acción, o ambas (American Diabetes Association, 2014). Específicamente, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) comprende individuos que presentan resistencia a la insulina y/o una deficiencia en su secreción por parte de las células β del páncreas, además representa casi del 90 al 95% de los casos a nivel mundial (American Diabetes Association, 2016).

El hígado es parte fundamental en el desarrollo temprano de la enfermedad, ya que al no inhibirse la producción endógena de glucosa o gluconeogénesis, esto contribuye a la hiperglucemia presente (Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005). Debido a que en los pacientes con DM2 la gluconeogénesis se encuentra incrementada, el inhibir esta vía podría disminuir los niveles de glucosa plasmática; por lo que es importante identificar aquellas moléculas que podrían llevar a cabo esta acción y, a futuro, desarrollar nuevos fármacos que traten este padecimiento, o bien, utilizarlos como coadyuvantes en los tratamientos ya estandarizados.

Un enfoque para evaluar el potencial efecto inhibitorio de estas moléculas sobre la gluconeogénesis ha sido realizar pruebas de tolerancia a piruvato, que consisten en administrar piruvato (i.p.) para iniciar la vía y, de esta manera, se han evaluado extractos de plantas para ver si son capaces de reducir los niveles de glucosa inhibiendo algún paso de la vía (Andrade-Cetto, 2011b; Andrade-Cetto & Cárdenas-Vázquez, 2010). Por otro lado, se puede caracterizar la inhibición de la gluconeogénesis *in vitro* midiendo la actividad de enzimas reguladoras, como la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), al obtener la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) a partir de curvas concentración-respuesta (Arion et al., 1997).

En el Laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM se comprobó que tanto los extractos acuoso y etanol-agua de la raíz de *Smilax moranensis* producen un efecto hipoglucemiante en el modelo hiperglucémico de ratas administradas con estreptozotocina a los 5 días de nacidas (n5-STZ), determinándose por medio de cromatografía en capa fina (TLC) que los principales constituyentes de ambos extractos son flavonoides (Andrade-Cetto, 2011a). Adicionalmente, el extracto etanol-agua tiene un efecto hipoglucemiante crónico en el modelo de hiperglucemia inducida con estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA) (Arias-Chávez, 2014).

Por otro lado, se ha determinado que el extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* tiene un efecto hipoglucemiante de forma aguda en ratas hiperglucémicas STZ-NA, y que dos de sus principales componentes, con efecto hipoglucemiante probado, son el ácido clorogénico y el L-quirositol (Bustos-Brito, Andrade-Cetto, Giraldo-Aguirre, Moreno-Vargas, & Quijano, 2016). Específicamente, se sabe que el ácido clorogénico inhibe el transportador de glucosa-6-fosfato (T1) del complejo enzimático de la G6Pasa (Charkoudian, Farrell, & Khosla, 2012; Hemmerle et al., 1997). Debido a lo anterior, es importante dilucidar el mecanismo de acción de los extractos de estas plantas que puede ser, de acuerdo a los antecedentes de las plantas, el de inhibir la producción endógena de glucosa.

OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto de los extractos de la raíz de *Smilax moranensis* y de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* sobre la gluconeogénesis hepática *in vivo* e *in vitro*.

Particulares:

- Estandarizar el modelo de hiperglucemia inducida con STZ-NA en ratas Wistar con ayuno prolongado y administración de piruvato para iniciar la gluconeogénesis.
- Evaluar *in vivo* el efecto de los extractos de la raíz de *S. moranensis* y de la parte aérea de *A. petiolaris* sobre la gluconeogénesis hepática mediante pruebas de tolerancia a piruvato en ratas STZ-NA.
- Evaluar *in vitro* el efecto de los extractos de la raíz de *S. moranensis* y de la parte aérea de *A. petiolaris* sobre la actividad enzimática de la G6Pasa obtenida de microsomas hepáticos de rata utilizando un ensayo enzimático clásico.

HIPÓTESIS

- Los extractos de la raíz de *S. moranensis* y de la parte aérea de *A. petiolaris* inhibirán la gluconeogénesis en las pruebas de tolerancia *in vivo*.

- Los extractos de la raíz de *S. moranensis* y de la parte aérea de *A. petiolaris* inhibirán a la enzima G6Pasa *in vitro*.

ANTECEDENTES

1. Regulación homeostática de la glucosa

La glucosa es un monosacárido que la gran mayoría de los organismos utilizan como combustible para obtener la energía necesaria para vivir, por lo tanto es importante mantener sus niveles constantes en sangre regulando el continuo suministro hacia los tejidos blanco que la requieran. El cerebro es el órgano principal que requiere un aporte continuo de glucosa para realizar sus funciones básicas (Triplitt, 2012). En vertebrados "superiores", la glándula encargada para mantener la homeostasis de la glucosa es el páncreas, que secreta hormonas que tienen funciones específicas en cada tipo celular y que actúan bajo distintos estados energéticos. Estas hormonas son, principalmente, la insulina, secretada por las células β del páncreas localizadas en los islotes de Langerhans, y el glucagon, secretado por las células α (Aronoff, Berkowitz, Shreiner, & Want, 2004).

La insulina es una hormona de carácter peptídico que estimula reacciones anabólicas al incrementar los procesos de almacenamiento y utilización de carbohidratos, lípidos y proteínas promoviendo la entrada de glucosa en células de algunos tejidos, por lo que produce un decremento de los niveles de este glúcido en sangre. Por otro lado, a bajas concentraciones de glucosa, el glucagon entra en acción activando vías catabólicas como la glucogenólisis para que el cuerpo obtenga la energía que necesita; como consecuencia de la función de esta hormona, los niveles de glucosa en la sangre se elevan. De acuerdo a lo anterior, se dice que la insulina y el glucagon son hormonas antagónicas, y son secretadas en respuesta a las continuas alteraciones que afectan los niveles de glucosa sanguínea (**Figura 1**) (Aronoff et al., 2004; Mcclenaghan & Flatt, 2015).

La concentración de glucosa normal en ayuno, que oscila entre 70 mg/dl y 100 mg/dl, se ve afectada por la entrada y salida de ésta en torrente sanguíneo (Cersosimo, Triplitt, Mandarino, & DeFronzo, 2015; Mcclenaghan & Flatt, 2015; Triplitt, 2012). Existen tres fuentes principales que aportan glucosa al organismo: 1) la obtenida por ingesta de alimentos (estado postprandial); 2) la que se libera por la ruptura de glucógeno, mediante un proceso conocido como glucogenólisis; y 3) la producida *de novo* a partir de sustratos que no sean carbohidratos, o gluconeogénesis (Aronoff et al., 2004). Las dos últimas fuentes están encendidas durante los periodos de ayuno reguladas por la acción del glucagon en el hígado.

En estado postprandial, los niveles de glucosa se elevan a 140 mg/dl aproximadamente; las células β pancreáticas sensan este aumento y liberan automáticamente la insulina a torrente sanguíneo para que el cuerpo pueda ser capaz de utilizar la glucosa y/o almacenarla (Triplitt, 2012).

Los órganos blanco en los que actúan la insulina y el glucagón son el hígado, el músculo y el tejido adiposo, principalmente (Mcclenaghan & Flatt, 2015). Cada hormona interviene en procesos específicos que son generados por su unión a receptores localizados en la membrana plasmática de cada tipo celular, promoviendo cascadas de señalización que traen como consecuencia eventos como la regulación transcripcional y/o modificación directa de enzimas involucradas en el metabolismo energético, o bien, la translocación de transportadores de glucosa para que ésta pueda ser captada por la célula.

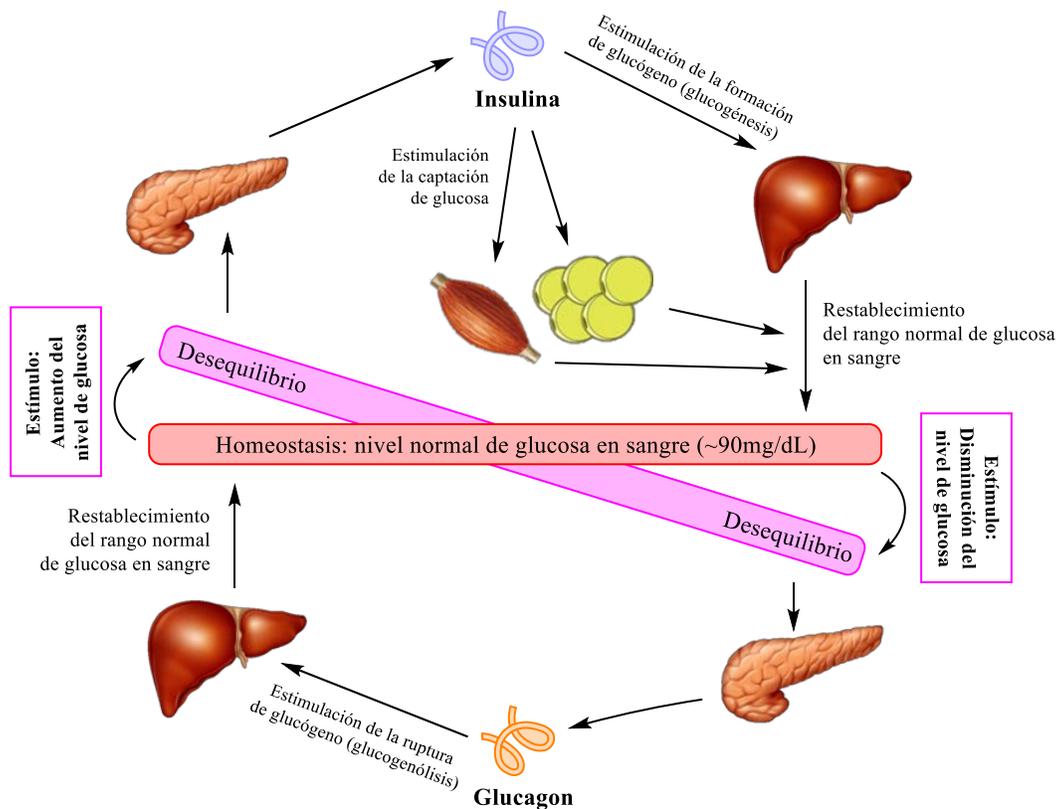


Figura 1. Regulación de la homeostasis de la glucosa por la insulina y el glucagón. El nivel normal de glucosa en torrente sanguíneo se ve afectado continuamente por estímulos como la ingesta de alimentos o el ayuno, provocando un desequilibrio que es censado por el páncreas. Esta glándula libera insulina para estimular la formación de glucógeno en el hígado y la captación de glucosa por músculo y tejido adiposo; por otro lado, libera glucagón para estimular la producción hepática de glucosa y restablecer el nivel normal de glucosa. Figura realizada en ChemDraw Professional 15.

Adaptada de Mcclenaghan & Flatt (2015). *Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon* [Figura].

Específicamente, en hígado, la insulina detiene la glucogenólisis, regulando la actividad de la glucogeno fosforilasa, y la gluconeogénesis, deteniendo la transcripción de las enzimas “paso-limitantes” de la vía, además de promover el incremento en la transcripción de la glucocinasa, enzima encargada de fosforilar la glucosa para que pueda ser convertida a ATP o ser almacenada en forma de glucógeno; de igual manera, está involucrada en la regulación de la enzima glucógeno sintasa que participa en la síntesis de glucógeno y, por otro lado, promueve la lipogénesis *de novo* (**Figura 2a**) (Saltiel & Kahn, 2001).

En el músculo esquelético, la insulina interviene en la formación de glucógeno que, a diferencia del almacenado en hígado, su utilización es para uso exclusivo del propio órgano. En tejido adiposo promueve la síntesis de triglicéridos e inhibe la lipólisis (Olivares & Arellano, 2008). Es importante señalar que tanto las células que conforman el músculo y el tejido adiposo dependen de la insulina para que la glucosa pueda entrar en ellas, es decir, a diferencia del hígado, el transportador que se encarga de introducir la glucosa en estos tejidos (GLUT4) es translocado desde vesículas intracelulares hacia la membrana gracias a la señalización promovida por dicha hormona (**Figura 2b**) (Zhao & Keating, 2007).

En condiciones de ayuno, cuando la concentración de glucosa plasmática comienza a decaer, el glucagon promueve, en primer lugar, la glucogenólisis y, posteriormente, la gluconeogénesis en hígado, la lipólisis en adipocitos y la ruptura de glucógeno en el músculo (Sharabi, Tavares, Rines, & Puigserver, 2015). Como consecuencia de la acción de esta hormona, los niveles de glucosa sanguínea aumentan; sin embargo, la insulina previene el estado hiperglucémico. La función alterada de la insulina en sus órganos blanco provoca anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y a largo plazo, se producen problemas vasculares debido a una aterogénesis acelerada, producto de la hiperglucemia crónica.

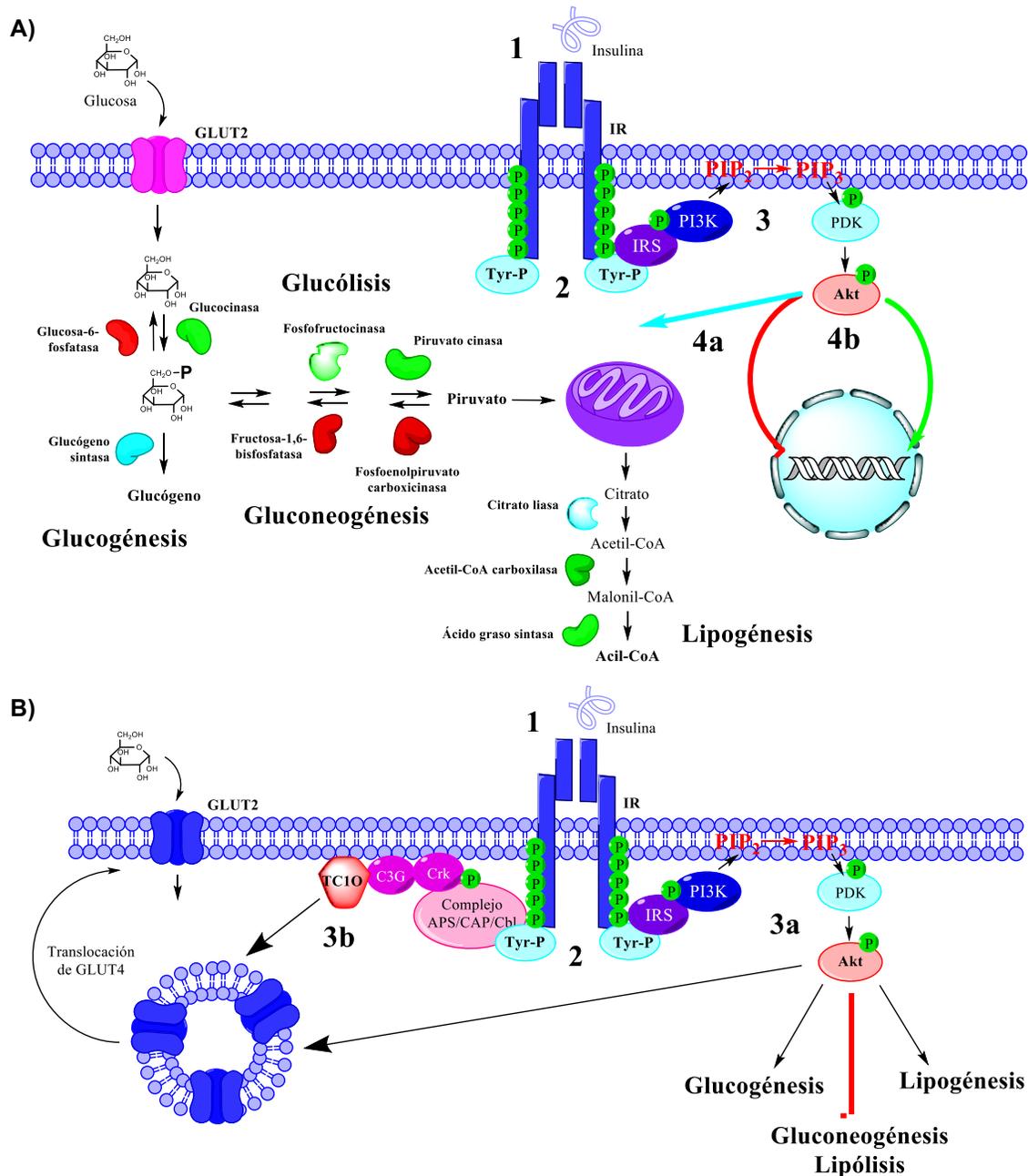


Figura 2. Papel de la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La insulina se une a su receptor (1) promoviendo la autofosforilación del mismo en residuos de tirosina (2), reclutando una serie de proteínas que se van fosforilando a medida que la señal se amplía (3), culminando con la fosforilación de Akt. **A)** En hígado, esta proteína regula la modificación de enzimas (4a) como la glucógeno sintasa y la citrato liasa para su activación y promover la gluconeogénesis y lipogénesis *de novo*; por otro lado, también regula la transcripción de enzimas involucradas en la glucólisis, síntesis de triglicéridos y gluconeogénesis (4b). La línea punteada azul indica **regulación por modificación directa** a las enzimas de color azul; la línea roja indica **regulación transcripcional negativa** a las enzimas de color rojo; la línea verde indica **regulación transcripcional positiva** a las enzimas de color verde. **B)** Akt interviene positivamente en la síntesis de glucógeno (glucogénesis) en músculo esquelético; mientras que, por otro lado, favorece la síntesis de lípidos y la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo. En ambos tejidos, la insulina promueve la translocación del GLUT4 mediante dos mecanismos: la activación de la proteína G pequeña TC10 vía el complejo APS/CAP/Cbl (3b), y la fosforilación de Akt (3a). IR, receptor de insulina; Tyr, tirosina; PI3K, fosfatidilinositol-3-cinasa; PIP₂, fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato; PIP₃, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato; PDK, proteína cinasa de treoninas; Akt, proteína cinasa B; Crk, factor TC10; C3G, factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Figura realizada en ChemDraw Professional 15.

Adaptada de Olivares & Arellano (2008). *Bases moleculares de las acciones de la Insulina* [Figura]; y Saltiel & Kahn (2001). *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism* [Figura].

2. Diabetes mellitus

Cuando la hiperglucemia es persistente, ya sea en ayuno o después de una ingesta de alimentos, se diagnostica diabetes mellitus (DM). Esto ocurre porque la producción de glucosa por el hígado es mucho mayor que el consumo de ella por los demás órganos debido a que hay un desbalance en la proporción de insulina/glucagon, un decremento en la acción de la insulina, o bien, una secreción ineficiente de ésta (Winter & Signorino, 2002).

Los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la DM van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, que se traduce en una deficiencia total en la secreción de insulina, hasta la incapacidad de los tejidos de responder a ella en diversos puntos de la cascada de señalización que la hormona produce normalmente.

Debido a la hiperglucemia sostenida, una persona con DM presenta una necesidad de orinar y beber líquidos en exceso, síntomas conocidos como poliuria y polidipsia. Por otro lado, la resistencia a la insulina produce la necesidad constante de comer (polifagia), debido a la disminución de la entrada de glucosa a las células blanco que utilizan este monosacárido como fuente de energía. Algunas complicaciones que se presentan a largo plazo son la pérdida de peso debido a la obtención de energía a partir de lípidos y proteínas, y la visión borrosa causada por daño vascular (Holmes, Robinson, & Tscheschlog, 2007).

Las complicaciones agudas que se presentan en una diabetes no controlada son la cetoacidosis, en el caso de la diabetes tipo 1, y el síndrome hiperosmolar no cetósico, en el caso de la diabetes tipo 2; mientras que a largo plazo, se producen complicaciones implicadas en el daño a los vasos sanguíneos. Estas complicaciones pueden dividirse en microvasculares, donde se incluyen: retinopatía con la potencial pérdida de la visión; nefropatía que resulta en falla renal; neuropatía periférica con el riesgo de úlceras en pies y amputaciones; y neuropatía autonómica que causa problemas cardiovasculares, gastrointestinales y genitourinarios. Las complicaciones macrovasculares incluyen enfermedad arterial coronaria, vástulo cerebral y arterial periférica (Isea, Vilorio, Ponte, & Gómez, 2012).

2.1. Clasificación

La Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) en el 2016 clasifica los casos de DM en cuatro categorías de acuerdo a su etiopatogenia:

- **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1).** La hiperglucemia desarrollada en este tipo de diabetes es causada por la destrucción autoinmune o idiopática de las células β del páncreas que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Se presenta antes de los 25 años de edad, con mayor frecuencia en blancos y en países nórdicos de Europa. La destrucción de las células β es más rápida en niños y adolescentes, por lo que los síntomas de la enfermedad aparecen en pocos días o semanas conduciendo a la aparición de cetoacidosis; mientras que en adultos, la destrucción ocurre de manera lenta y progresiva (diabetes tipo LADA o diabetes autoinmune del adulto). Representa entre el 5 y 10% de la diabetes en el mundo.
- **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).** Representa entre el 90 y 95% de casos de diabetes en el mundo. Se caracteriza por la inadecuada utilización de la insulina por sus tejidos diana (resistencia a la insulina), por la secreción defectuosa de ésta, o ambas. Su etiología es de carácter multifactorial, aunque se han asociado muchos genes y factores ambientales implicados en su aparición y desarrollo. La obesidad abdominal es el factor predominante en este tipo de diabetes por estar presente en el 85% de los casos, asociado con el síndrome metabólico y, por tanto, con la resistencia a la insulina.

El diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad se dificulta por la escasez de síntomas, debido a la regulación homeostática de la insulina por parte del páncreas; sin embargo, a largo plazo, este órgano comienza a desgastarse debido a la gran demanda de insulina por parte del cuerpo para controlar la glucemia. En ese momento, los síntomas que pudieron haberse ya presentado, se acentúan provocando que la situación funcional del diabético sea insulino dependiente.

Se diagnostica normalmente en la edad adulta (después de los 40 años), aunque en los últimos años, la edad del diagnóstico va disminuyendo hasta afectar a niños con obesidad importante. Los criterios de diagnóstico de acuerdo a la ADA (2016) son presentar valores de glucosa plasmática y/o porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) considerados por encima del umbral establecido para una persona con alteración de la glucosa en ayuno y/o intolerancia a la glucosa (prediabetes) obtenidos

mediante distintas pruebas, así como presentar los síntomas característicos de la enfermedad (**Tabla 1**).

Tabla 1

Criterios de diagnóstico de diabetes

	Prediabetes	Diabetes
Glucosa plasmática en ayuno (FPG, por sus siglas en inglés)*. El paciente no debe haber tenido una ingesta calórica en, al menos, 8 horas.	100 – 125 mg/dl	≥ 126 mg/dl
Glucosa plasmática a las 2 horas durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT, por sus siglas en inglés)*. El paciente debe tomar una carga de 75g de glucosa anhidra en condiciones de ayuno.	140 – 199 mg/dl	≥ 200 mg/dl
Hemoglobina glicada (HbA1c)*	5.7 – 6.4%	≥ 6.5%
Glucosa plasmática casual , en un paciente con los síntomas clásicos de hiperglucemia o en una crisis hiperglucémica.	-	≥ 200 mg/dl

Nota. Tomada de American Diabetes Association (2016).

*En ausencia de hiperglucemia inequívoca, los resultados deben ser confirmados repitiendo las pruebas.

- **Diabetes gestacional.** La diabetes que se diagnostica en estos casos debe ser durante el embarazo para que pueda considerarse dentro de esta categoría, es decir, la mujer no debe haber sido diagnosticada con diabetes antes de quedar embarazada. Se define por presentar intolerancia a la glucosa e hiperglucemia que puede variar en cuanto a su gravedad; además, puede ser un factor que desencadene el desarrollo de DM2 posteriormente.
- **Otros tipos específicos de diabetes.** Esta categoría reúne diferentes casos que no tienen relación entre ellos, con diversas causas y con menor frecuencia que los tipos anteriores de diabetes descritos. Entre ellos se encuentran: defectos monogenéticos que causan disfunción en la secreción de insulina, como la diabetes neonatal y la diabetes de la madurez de inicio en el joven (MODY); alteraciones de etiología genética en el receptor de la insulina y/o proteínas asociadas que afectan la acción de la insulina; enfermedades del páncreas exocrino; endocrinopatías; diabetes inducida por fármacos u otras sustancias químicas; e infecciones.

2.2. Epidemiología

La DM se ha convertido en uno de los problemas de salud más grandes en el siglo XXI debido a que, globalmente, es el tercer factor de riesgo de mortalidad prematura y, en países con ingresos bajos y medios, ha alcanzado proporciones epidémicas (el 75% de la población que padece DM vive en estos países). En el año 2015, 415 millones de personas padecían esta enfermedad (que representan el 8.8% de la población mundial adulta); y se espera que para el año 2040, el número de personas con DM se incremente a 642 millones (10.4% de la población mundial adulta), es decir, un adulto de cada diez padecerá diabetes (International Diabetes Federation, 2015).

Los países que tienen la mayor población con diabetes en edades comprendidas entre 20 y 79 años de edad superan los 10 millones de enfermos; entre ellos, podemos encontrar a México que ocupó el sexto lugar en 2015, mientras que en los primeros lugares se encuentran China (que sobrepasa los 100 millones), India y Estados Unidos.

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), 220 países y territorios del mundo se han dividido en siete regiones que proporcionan datos relativos que permiten comparar las cifras mundiales de una mejor manera: África, Europa, Oriente Medio y Norte de África, América del Norte y Caribe, América Central y del Sur, Sudeste Asiático y Pacífico Occidental (**Figura 3**).

El mayor número de población con diabetes en 2015 se presentó en la región Sudeste Asiático y Pacífico Occidental con casi 153 millones de enfermos con edades comprendidas entre 20 a 79 años de edad; en cambio, el menor número se determinó en África, donde se estimó un número que oscila entre 9.5 y 29.3 millones de personas, y de éstas, tres cuartas partes no han sido diagnosticadas por falta de programas de salud. Por otro lado, el territorio con mayor prevalencia es la región América del Norte y Caribe con 12.9%, donde uno de cada ocho adultos tiene diabetes; en esta región, México ocupa el segundo lugar con el mayor número de personas con diabetes (11.5 millones), además de ser uno de los países con mayor prevalencia de la misma (14.7%). Según la Ensanut (2012) la DM se encuentra entre las primeras causas de muerte en nuestro país con 70 mil muertes en ese año.



Figura 3. Regiones categorizadas por la Federación Internacional de Diabetes (IDF) que proporcionan las cifras de número de diabéticos en el mundo en 2015 y 2040. En cada región se proporciona el número de diabéticos contabilizado en 2015, y se presenta un pronóstico para el 2040; también se presenta la cifra mundial.

Tomada de International Diabetes Federation. (2015). *Diabetes Atlas* [Figura].

3. Importancia de la producción hepática de glucosa en diabetes

En etapas anteriores al desarrollo de DM2 (prediabetes), el páncreas puede producir la insulina necesaria para regular los niveles de glucosa en sangre; no obstante, se presenta una resistencia por parte de los tejidos, por lo que no puede actuar de una manera adecuada. En una persona no diabética, la normoglucemia se mantiene por el balance de la acción insulínica y su secreción, es decir, si la acción de la insulina se ve disminuida, las células β pancreáticas pueden adaptarse y aumentar la secreción de la hormona para compensar el defecto; sin embargo, en las personas con alteración de la glucosa en ayuno y/o intolerancia a la glucosa, la continua secreción compensatoria (hiperinsulinemia) debido a la resistencia que presentan los tejidos tiende a desgastar a las células β . Es en este momento cuando se diagnostica diabetes (Stumvoll et al., 2005).

La resistencia a la insulina es una condición en la cual las células blanco no responden adecuadamente a dicha hormona, lo que desencadena alteraciones en los niveles de glucosa y lípidos en torrente sanguíneo: aumenta tanto la concentración de ácidos grasos libres debido a la lipólisis que no se inhibe en las células del tejido adiposo, así como la concentración de glucosa debido a su captación inadecuada en músculo esquelético y a la producción hepática de glucosa no inhibida (**Figura 4**) (Mlinar, Marc, Janez, & Pfeifer, 2007).

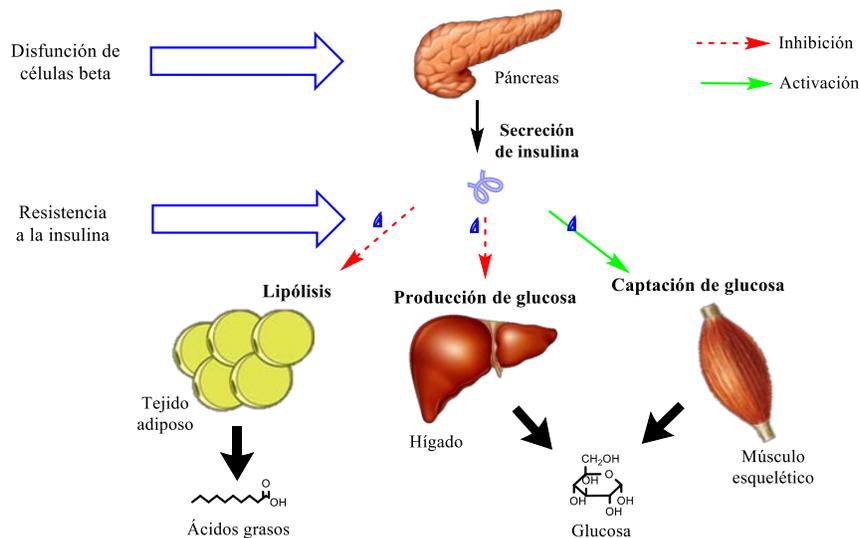


Figura 4. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. La disfunción de las células β pancreáticas que afecta la secreción de insulina y la resistencia que presentan los órganos blanco, impiden el funcionamiento normal de la hormona, provocando una alteración en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. La lipólisis en el tejido adiposo y la producción hepática de glucosa no se inhiben, mientras que hay poca captación de glucosa por parte del músculo esquelético, lo que provoca un aumento en los niveles de glucosa y ácidos grasos libres en torrente sanguíneo. Figura realizada en ChemDraw Professional 15.

Adaptada de Stumvoll et al. (2005). *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy* [Figura].

Las causas de la resistencia a la insulina se han asociado a la obesidad debido al alto consumo de carbohidratos y grasas que son almacenados en el tejido adiposo, a la inactividad física y a la predisposición genética. El excesivo almacén de triglicéridos en tejido adiposo visceral, así como la hiperglucagonemia y la propia resistencia a la insulina que presenta dicho tejido, permiten la lipólisis liberando ácidos grasos al torrente sanguíneo. Los ácidos grasos libres se acumulan en las células no adiposas inhibiendo el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético y estimulando la gluconeogénesis en el hígado (lipotoxicidad), entre otros mecanismos involucrados (Cersosimo et al., 2015).

El tejido adiposo, además de liberar ácidos grasos, actúa como glándula endocrina que libera citocinas que inducen bloqueos en la cascada de señalización de la insulina, principalmente la vía asociada a fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), debido a que promueven fosforilaciones inadecuadas en residuos de serina inhibiendo la función del receptor y los sustratos del receptor de insulina (IRS). Entre ellas se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF α), que promueve la lipólisis y la consecuente secreción de ácidos grasos libres y citocinas a torrente sanguíneo; la interleucina 6 (IL6), que aumenta la producción de enzimas degradadoras de los componentes en la vía de señalización de la insulina; y el factor nuclear κ B (NF κ B), involucrado en la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria. Se ha propuesto que el incremento en las fosforilaciones en los residuos de serina que se producen en el receptor de insulina y en los IRS es de etiología múltiple, englobando la acumulación ectópica de lípidos, disfunción mitocondrial, inflamación y estrés del retículo endoplásmico, que desencadenan la activación de la proteína cinasa C (PKC) (**Figura 5**) (DeFronzo et al., 2015).

En pacientes diabéticos, el incremento de la producción hepática de glucosa está relacionado con la gravedad de la hiperglucemia en ayuno debido a la resistencia a la insulina que presenta el hígado y que se ve reflejada en la inadecuada supresión de la gluconeogénesis; por otro lado, después de la ingesta de alimentos, el hígado no percibe la señal de inhibición de la insulina, por lo que continúa produciendo glucosa, y de esta manera, la hiperglucemia resultante es causada por la aportación de glucosa por parte del hígado y del tracto gastrointestinal (Cersosimo et al., 2015).

Aproximadamente, el 85% de la producción endógena de glucosa es llevada a cabo en el hígado, y de este porcentaje, la mitad es producida a partir de la gluconeogénesis. En estado de ayuno, durante la noche, la tasa de producción en personas sanas es de

alrededor de 1.8 a 2.0 mg/kg.min; sin embargo, esta tasa se duplica en pacientes con DM2 debido a una aceleración de la gluconeogénesis. Los distintos mecanismos involucrados en este incremento son la hiperglucagonemia, un aumento en los niveles de precursores gluconeogénicos en torrente sanguíneo, así como la oxidación de ácidos grasos libres; de igual manera, hay evidencia de que existe un aumento en la actividad de ciertas enzimas reguladoras de la gluconeogénesis.

La producción hepática de glucosa, específicamente la gluconeogénesis, juega un papel importante en el desarrollo de la hiperglucemia en pacientes con DM2 tanto en condiciones de ayuno como en estado postprandial, lo que conlleva a la aparición de complicaciones vasculares a largo plazo, por lo tanto, el entendimiento del funcionamiento y regulación de esta vía es de sumo interés para identificar nuevos blancos terapéuticos que ayuden al control y disminución de los niveles de glucosa.

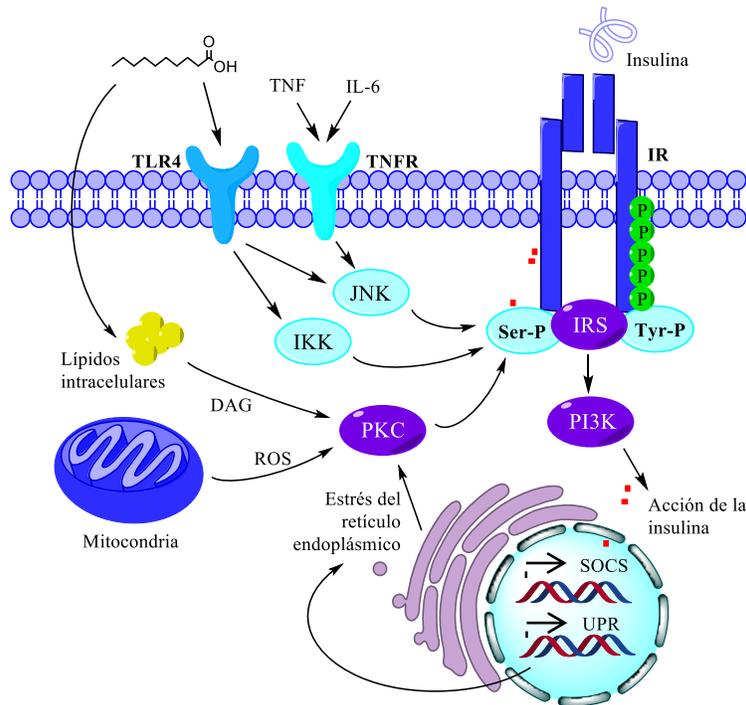


Figura 5. Factores involucrados en el desarrollo de la resistencia a la insulina en DM2. La cascada de señalización de la insulina se ve afectada por fosforilaciones en residuos de serina en el receptor (IR) y en los sustratos del receptor de insulina (IRS), promovidas por ácidos grasos libres y citosinas pro-inflamatorias liberados por el tejido adiposo, especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes de la mitocondria que producen estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Estos factores desencadenan la activación de cinasas como protein cinasa C (PKC), JUN amino-terminal cinasa (JNK) e IκB cinasa (IKK) que inducen los bloqueos en la vía de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), disminuyendo la respuesta de las células blanco a la insulina. TLR4: receptor tipo Toll 4; TNFR: receptor TNF; DAG: diacilglicerol; SOCS: proteínas supresoras de la señalización por citosinas. Figura realizada en ChemDraw Professional 15.

Adaptada de DeFronzo et al. (2015). *Type 2 diabetes mellitus* [Figura].

3.1. Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es una vía anabólica en la cual se sintetiza glucosa *de novo* a partir de precursores que no sean carbohidratos. Se lleva a cabo principalmente en hígado, en la corteza del riñón y, en menor medida, en intestino delgado utilizando como sustratos el lactato (proveniente del músculo y de los glóbulos rojos), piruvato, propionato, acetona, glicerol, y casi todos los aminoácidos (Hanson & Owen, 2013).

El objetivo de la gluconeogénesis es generar glucosa para satisfacer la demanda de energía de los demás órganos. La mayor parte de las enzimas implicadas son de carácter reversible y compartidas con la vía de la glucólisis, que es la encargada de la ruptura de glucosa para la obtención de energía; sin embargo, no es estrictamente la ruta inversa, ya que presenta enzimas únicas que catalizan reacciones irreversibles y que son reguladas dependiendo de las necesidades energéticas de la célula, por lo que son llamadas enzimas “paso-limitante” y cumplen una función específica en diferentes puntos. Concretamente estas enzimas son la piruvato carboxilasa (PC), la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6Pasa) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) (**Figura 6**) (Nordlie, Foster, & Lange, 1999).

El primer punto de regulación de la gluconeogénesis implica la participación de dos enzimas “paso-limitante” para que el piruvato pueda ser convertido a fosfoenolpiruvato. En primer lugar, se lleva a cabo la formación irreversible de oxalacetato a partir de piruvato (obtenido a partir de alanina o lactato) por PC utilizando CO_2 y ATP. Esta enzima mitocondrial es de carácter anaplerótico, es decir, se encarga de reemplazar el oxalacetato utilizado para la síntesis de glucosa y ácidos grasos. Es regulada alostéricamente por acetil-CoA, el cual promueve su actividad (Nuttall, Ngo, & Gannon, 2008). En segundo lugar, PEPCK cataliza la formación de fosfoenolpiruvato, con la liberación de GDP y CO_2 , a partir de oxalacetato y GTP. Posee dos isoformas: la mitocondrial (PEPCK-M) y la citosólica (PEPCK-C); la isoforma citosólica es inducible por dieta y hormonas, mientras que la isoforma mitocondrial es constitutiva (Hanson & Owen, 2013).

La F1,6Pasa es una enzima homotetramérica citosólica implicada en el segundo punto de regulación de la gluconeogénesis, y a su vez es regulada por diversos mecanismos. Su función consiste en remover un fosfato de la molécula fructosa-1,6-bisfosfato, promoviendo el aumento de fructosa-6-fosfato. Sus reguladores alostéricos son el AMP y la fructosa-2,6-fosfato que se unen al sitio regulador de la enzima inhibiéndola; por otro lado el ATP actúa

como regulador positivo. Esta enzima es modificada covalentemente para aumentar su actividad siendo fosforilada por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (van Poelje, Dang, & Erion, 2007).

Finalmente, la glucosa sintetizada se libera gracias a la actividad catalítica de la G6Pasa que se encarga de remover un fosfato de la glucosa-6-fosfato (G6P). Esta enzima está implicada en el último punto de regulación de la gluconeogénesis y, además, forma parte del último paso de la glucogenólisis. La actividad de esta enzima puede ser inducida por condiciones de ayuno, AMPc, ácidos grasos y glucocorticoides (Hanson & Owen, 2013).

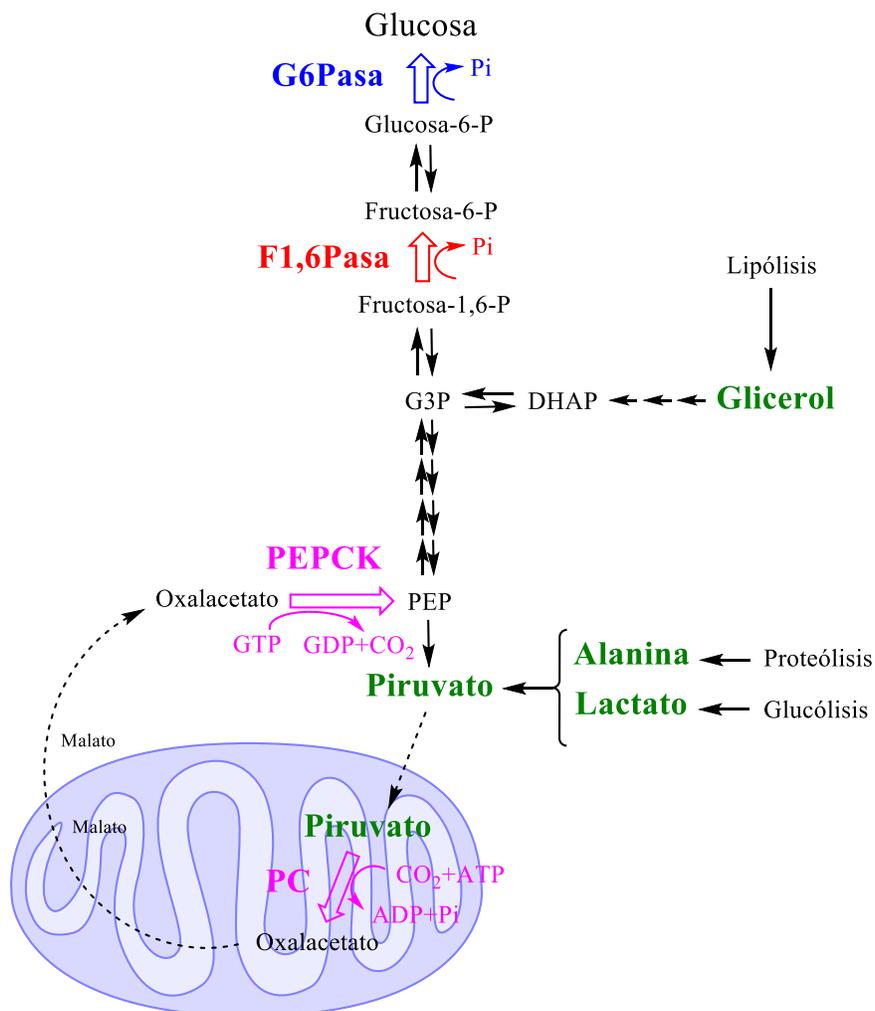


Figura 6. Esquema general de la vía de gluconeogénesis. La figura muestra las reacciones, enzimas y sustratos principales de la ruta, que comienza con los precursores gluconeogénicos provenientes de la ruptura de glucosa, proteínas y ácidos grasos provenientes de distintas fuentes. La alanina y el lactato se convierten en piruvato que es internalizado a la mitocondria para iniciar la vía, mientras que el glicerol es transformado en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en varias reacciones para unirse a la vía. G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; F1,6Pasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxinasa; PC, piruvato carboxilasa. Figura realizada en ChemDraw Professional 15.

Adaptada de Hanson & Owen (2013). *Gluconeogenesis* [Figura].

3.2. Mecanismos de regulación de la gluconeogénesis

La gluconeogénesis es la principal fuente de abastecimiento de glucosa en condiciones de ayuno, sin embargo, en estado postprandial, cuando la glucosa se encuentra disponible, la vía se inhibe para evitar un exceso. Existen varios factores hormonales y nutricionales involucrados en dicha regulación que ocurre a distintos niveles (Barthel & Schmoll, 2003; Hanson & Owen, 2013). El parámetro principal que afecta la tasa de producción de glucosa es la concentración disponible de sustratos gluconeogénicos tales como el lactato liberado de la glucólisis en el músculo esquelético y eritrocitos, el glicerol obtenido de la ruptura de triglicéridos en tejido adiposo, o bien, los aminoácidos obtenidos de la proteólisis en el músculo esquelético. Otros mecanismos involucrados son la regulación de las enzimas gluconeogénicas por acción de masas, activación alostérica, por modificación covalente y alteración en la expresión génica (regulación transcripcional).

El control transcripcional por hormonas es uno de los mecanismos de regulación más importantes. La expresión de los genes que codifican para PEPCK y G6Pasa es inducida por glucagon durante largos periodos de ayuno, ya que su secreción es estimulada por hipoglucemia. El glucagon es la hormona principal que contraregula a la insulina; se une a su receptor generando la cascada de señalización que involucra la activación de la adenilato ciclasa, enzima encargada de convertir ATP a AMPc; el aumento de AMPc intracelular estimula la acción de PKA, que promueve la transcripción de dichas enzimas (**Figura 7**) (Bano, 2013; Jitrapakdee, 2012). Otras hormonas que estimulan la expresión génica de estas enzimas son los glucocorticoides durante periodos de estrés y las catecolaminas durante el ejercicio (Barthel & Schmoll, 2003). En contraparte, la insulina es la hormona que inhibe la gluconeogénesis suprimiendo, predominantemente, la expresión de los genes de PEPCK y G6Pasa a través de la vía de señalización de PI3K, por lo que al desarrollar resistencia hacia dicha hormona, el metabolismo de glucosa hepático se ve alterado.

La expresión de los genes de PEPCK y G6Pasa también pueden ser suprimido por la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), una cinasa de serinas y treoninas que se expresa en una gran variedad de órganos. Su activación está relacionada a estrés metabólico, es decir, se activa al disminuir los niveles de ATP, por lo que es considerada un sensor del estado energético de la célula (Lim, Kola, & Korbonits, 2010; Viollet et al., 2009).

4. Control de la gluconeogénesis en el tratamiento de diabetes

La reducción del flujo de glucosa tiene el potencial de evitar las complicaciones que sufren los pacientes diabéticos a largo plazo, por lo que el conocimiento del metabolismo y sus mecanismos de regulación influyen en el desarrollo de inhibidores o activadores farmacológicos que alcancen ese objetivo. Algunos enfoques utilizados con el fin de reducir la producción hepática de glucosa son: la inhibición directa (alostérica) e indirecta (transcripcional) de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis, el bloqueo del efecto del glucagon, y la activación (o sensibilización) del efecto de la insulina.

La gluconeogénesis puede ser controlada por factores ambientales que incluyen nutrientes, fitoquímicos y medicamentos; por ejemplo, uno de los medicamentos actuales para controlar la hiperglucemia de pacientes con DM2 es la metformina, una biguanida con múltiples mecanismos de acción, siendo la inhibición de la gluconeogénesis uno de sus principales efectos como hipoglucemiante oral. El principio activo, la guanidina, fue aislado de la planta medicinal *Galega officinalis* (galega o ruda cabruna) utilizada en Europa desde el siglo XII para tratar padecimientos como la “sed y micción frecuente” (Hardie, 2013).

La inhibición del flujo gluconeogénico inducida por metformina está dada por múltiples efectos que son producidos por una disminución en la concentración intracelular de ATP, debido a que desacopla la cadena de transporte de electrones de la mitocondria suprimiendo la función del complejo I (Foretz, Guigas, Bertrand, Pollak, & Viollet, 2014; Viollet & Foretz, 2013). La caída de los niveles de ATP, trae como consecuencia un aumento en la concentración de AMP, lo que genera un estrés energético en el hepatocito que es sentido por AMPK. La forma activa de esta enzima promueve la inhibición transcripcional de PEPCK y G6Pasa regulando los factores de transcripción involucrados en su expresión. Por otro lado, el incremento de los niveles de AMP promueve la regulación alostérica de la F1,6Pasa suprimiendo su actividad y, además, la inhibición de la adenilato ciclasa con el consecuente bloqueo de PKA y, por lo tanto, la supresión de la expresión génica de las enzimas gluconeogénicas (**Figura 7**).

Existen algunos moduladores de la señalización de insulina que activan o inhiben algún punto en la cascada de señalización de la insulina. Uno de ellos, el benfluorex, es un derivado de las anfetaminas que ha sido usado en pacientes con DM2 e hipertrigliceridemia de Europa, Asia y Sudáfrica. Presenta múltiples mecanismos de acción que van desde sensibilización a la insulina, retardo en la absorción de triglicéridos y disminución de la

síntesis de colesterol y ácidos grasos. En hepatocitos primarios de rata ha demostrado, junto a su metabolito, reducir los niveles de ARN mensajero de los genes de PEPCK y G6Pasa, y aumentar los niveles de ARN mensajero de los genes de la glucocinasa y la piruvato cinasa de hígado.

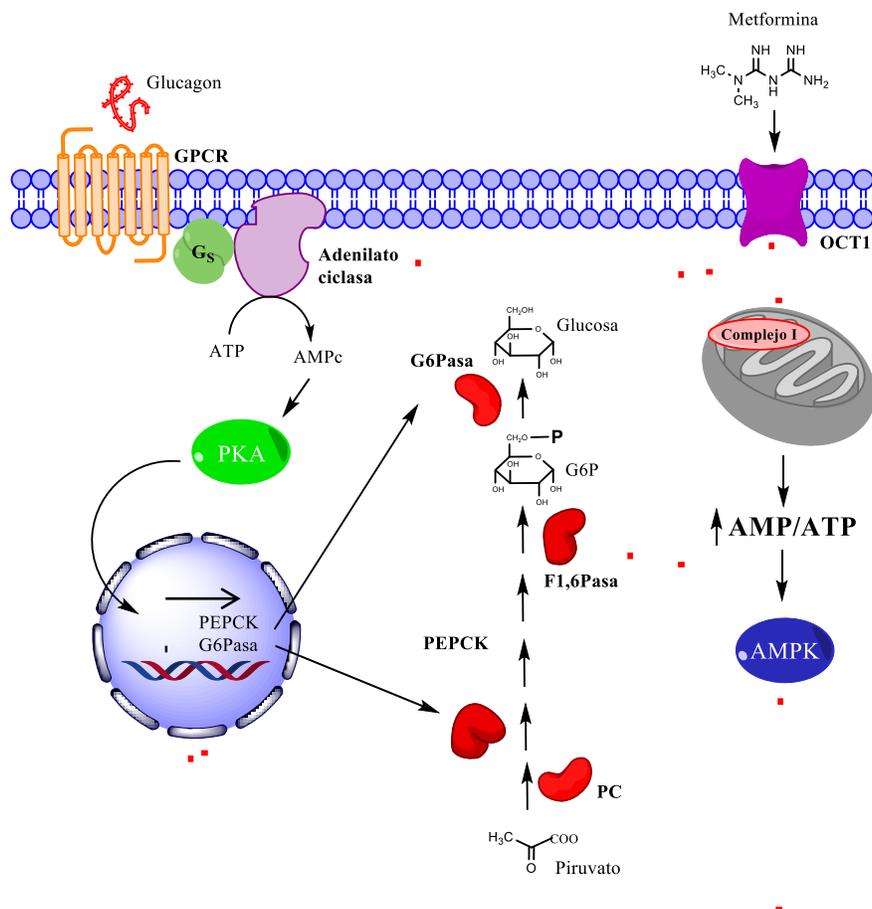


Figura 7. Mecanismos de acción de la metformina involucrados en la inhibición de la gluconeogénesis. La metformina entra al hepatocito por su transportador y se dirige a la mitocondria donde inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones provocando un déficit de ATP y un aumento en la concentración intracelular de AMP. Este incremento suprime la actividad de la adenilato ciclasa (activada por glucagon) y activa AMPK, lo que conlleva a la inhibición de la expresión de los genes de PEPCK y G6Pasa; por otro lado, inhibe alostéricamente la actividad enzimática de la F1,6Pasa. GPCR, receptor acoplado a proteínas G; OCT1; transportador 1 de catión orgánico; AMPK, proteína cinasa activada por AMP; PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc; G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; F1,6Pasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxicinas; PC, piruvato carboxilasa. Figura realizada en ChemDraw Professional 15. Adaptada de Viollet & Foretz (2013). *Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver* [Figura].

Por otro lado, se han reportado fitoquímicos que, de igual manera, disminuyen los niveles de transcripción de PEPCK y G6Pasa, como el resveratrol, principal componente del vino tinto al que se le han atribuido efectos antiateroscleróticos debido a que mejora el perfil lipídico; la berberina, un alcaloide isoquinolino encontrado en las raíces de especies presentes en la medicina tradicional china; y la quercetina, un flavonoide capaz de modular

el metabolismo de glucosa y lípidos a través de la activación de AMPK (Guan & Chen, 2014).

Finalmente, se han descrito varios compuestos que inhiben directamente a las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis. Por ejemplo, para la F1,6Pasa se reportan CS-917 y MB07803, inhibidores alostéricos sintetizados utilizando la estructura del AMP como punto de inicio que han terminado o se encuentran en la fase II de estudios clínicos; ambos compuestos son inhibidores no competitivos y selectivos de esta enzima (van Poelje et al., 2007).

4.1. Glucosa-6-fosfatasa como blanco terapéutico para la inhibición de la gluconeogénesis

La G6Pasa representa uno de los mejores blancos terapéuticos para controlar los niveles de glucosa plasmática ya que determina la producción de glucosa liberada de la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Wu, Okar, Kang, & Lange, 2005). Es un sistema enzimático multifuncional que posee varios componentes asociados a la membrana del retículo endoplásmico, donde la parte encargada de la catálisis está orientada hacia el lumen. Este complejo proteico es el encargado de hidrolizar la G6P a glucosa para que pueda ser liberada a torrente sanguíneo a través del GLUT2; también, es capaz de sintetizarla al comportarse como fosfotransferasa (Arion, Ballas, Lange, & Wallin, 1976).

De acuerdo al modelo “sustrato-transporte”, el sistema G6Pasa está conformado por tres translocasas específicas y la parte enzimática que cumple el rol de fosfatasa. La hidrólisis involucra la función acoplada de estos componentes: la G6P pasa al lumen del retículo endoplásmico a través de la translocasa T1; posteriormente, este sustrato entra en contacto con la parte catalítica donde es hidrolizado; y, finalmente, el fosfato y la glucosa son liberados hacia el citoplasma por las translocasas T2 y T3, respectivamente (**Figura 8**) (van Schaftingen & Gerin, 2002).

Existen varios inhibidores del sistema G6Pasa que se clasifican en dos categorías: los que inhiben a la translocasa T1, y aquellos que inhiben a la enzima que cataliza la hidrólisis. La desventaja de utilizar la parte catalítica como potencial blanco de inhibición farmacológico recae en la posibilidad de inhibir otras fosfatasas; por otro lado, la translocasa T1 es estructuralmente distinta y es considerada el paso que determina la tasa de liberación de

glucosa a torrente sanguíneo debido a su capacidad de selección por la G6P, por lo que representa el blanco terapéutico de inhibición idóneo.

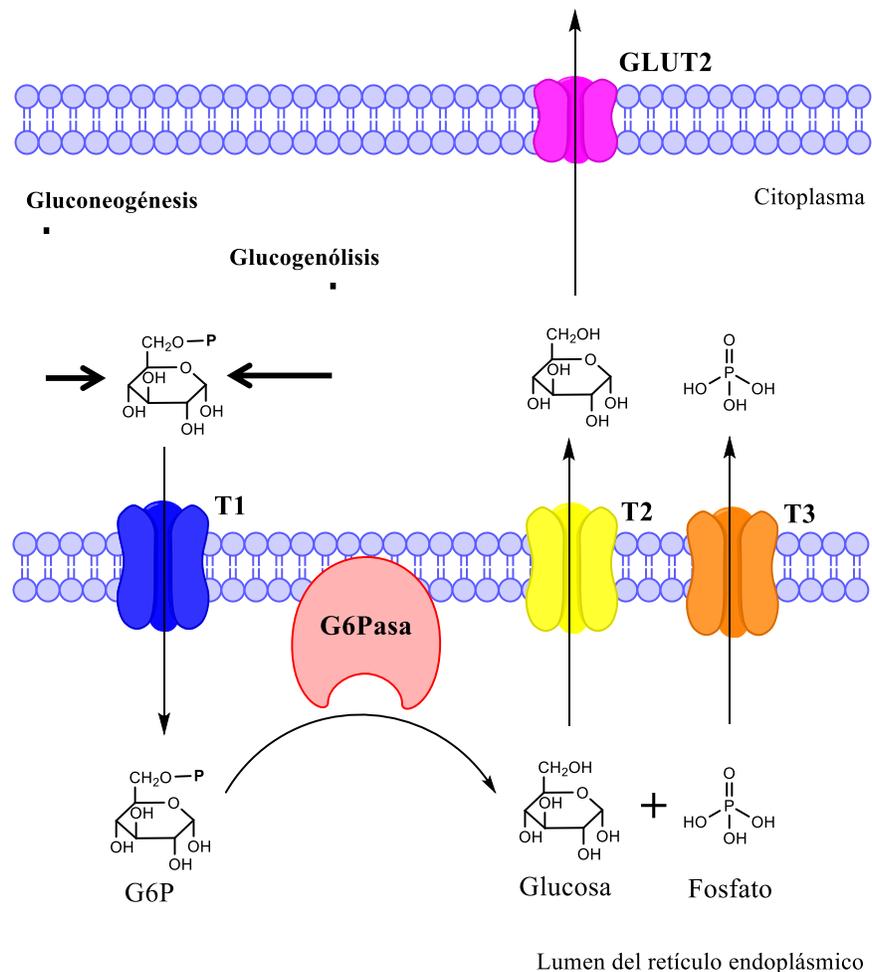


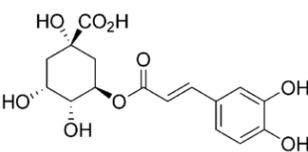
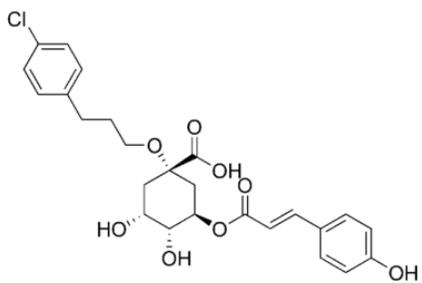
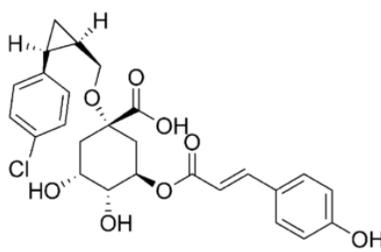
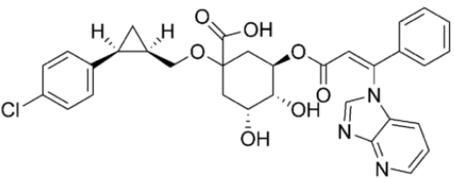
Figura 8. Sistema enzimático de G6Pasa. La G6P proveniente de las vías de producción hepática de glucosa es internalizada por la translocasa T1 al lumen del retículo endoplásmico donde entra en contacto con la parte catalítica de la G6Pasa. La glucosa es liberada junto con el fosfato resultante de la hidrólisis por sus respectivas translocasas al citoplasma del hepatocito, donde finalmente es liberada a torrente sanguíneo a través del GLUT2. G6P, glucosa-6-fosfato. Figura realizada en ChemDraw Professional 15. Adaptada de Charkoudian et al. (2012). *Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase* [Figura].

4.1.1. Inhibidores naturales de G6Pasa T1

Existen varios inhibidores descritos en la literatura para G6Pasa T1 que incluyen compuestos sintéticos y naturales, así como análogos derivados de síntesis parcial o total. El inhibidor más caracterizado de T1 es el ácido clorogénico, presente en una gran cantidad de especies vegetales. Este compuesto es un éster de ácido quínico del ácido caféico que presenta una inhibición competitiva reversible afectando de manera dosis-dependiente a la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

Se han sintetizado análogos de este compuesto por medio de modificaciones en su estructura que presentan una mayor potencia de inhibición que se ve reflejada en los valores de IC₅₀ de ensayos *in vitro* (Charkoudian et al., 2012). En la **Tabla 2** se presentan algunos ejemplos de derivados sintéticos del ácido clorogénico y sus respectivos valores de IC₅₀. La actividad inhibitoria de este compuesto y sus derivados es evaluada por medio de su capacidad de reducir la hidrólisis de G6P en microsomas intactos obtenidos por centrifugación diferencial del hígado de rata (Arion, 1989).

Tabla 2
Inhibidores de G6Pasa T1 derivados del ácido clorogénico

Compuesto	Estructura	Origen	IC ₅₀
Ácido clorogénico		Varias plantas	230 μM
Derivado de ácido clorogénico		Sintético	2.5 μM
S-3483		Sintético	210 nM
S-4048		Sintético	2 nM

Nota. Tomada de Charkoudian et al. (2012).

El ácido clorogénico exhibe múltiples propiedades biológicas que incluyen actividad antibacteriana, antioxidante, anticarcinogénica, hipoglucemiante e hipolipidémica. Particularmente, afecta el metabolismo de la glucosa potenciando la acción de la insulina como sensibilizador a esta hormona; disminuye el pico de glucosa retardando su absorción intestinal; estimula la captación de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético; estimula la secreción de insulina; y, de manera crónica, mejora la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina (Meng, Cao, Feng, Peng, & Hu, 2013).

Otros inhibidores naturales de T1 son la floretina, principal compuesto fenólico presente en la corteza de la raíz, los retoños y las hojas del manzano *Malus* sp. ($IC_{50} = 340 \mu M$); las thielavinas, derivados del ácido salicílico aislados del hongo *Chaetomium carinthiacum* ($IC_{50} = 0.33 \mu M - 340 \mu M$); kodaistatinas, aisladas de la cepa *Aspergillus terreus* Thom DSM 12247 ($IC_{50} \approx 100 \text{ nM}$); y la mumbaistatina, un metabolito secundario producido por *Streptomyces* sp. DSM 11641 conocido por ser el inhibidor natural más potente de la translocasa T1 ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$) (Figura 9) (Charkoudian et al., 2012).

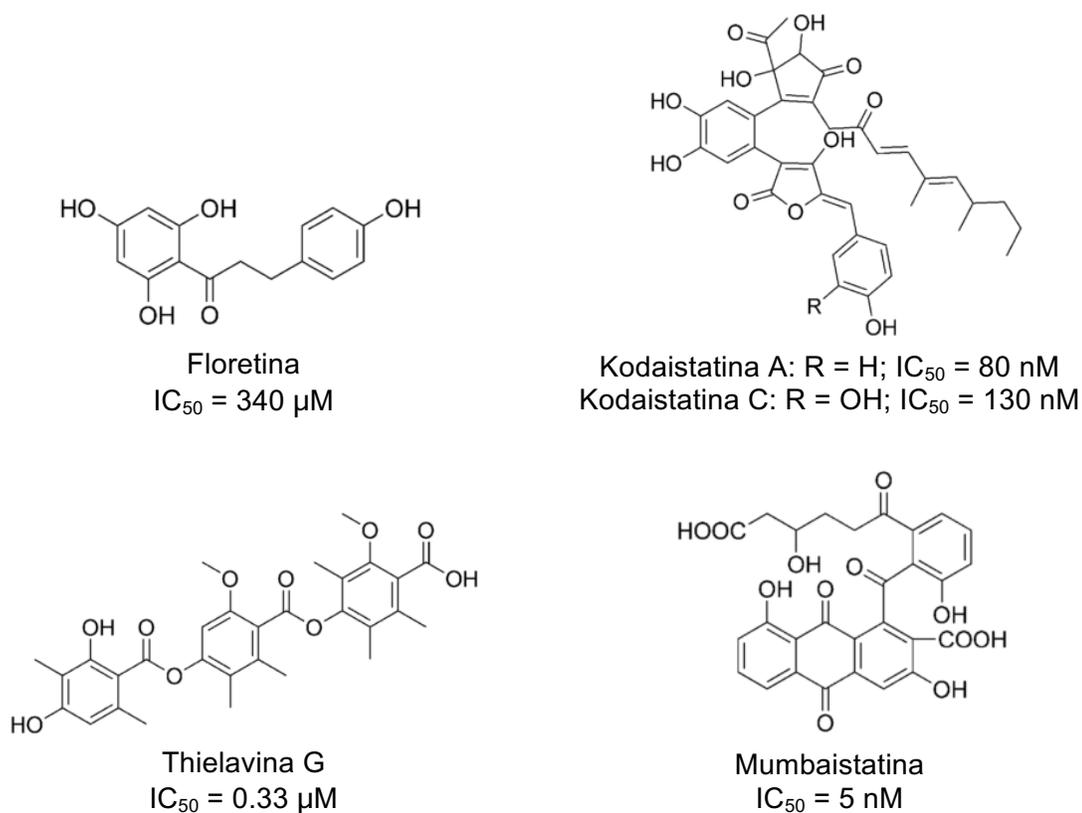


Figura 9. Estructuras de algunos ejemplos de inhibidores naturales de G6Pasa T1.
 Adaptada de Charkoudian et al. (2012). *Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase* [Figura].

5. Inhibición de la gluconeogénesis por extractos de plantas medicinales

Dentro del marco de tratamiento de la DM, el control de los niveles de glucosa representa la meta final de cualquier programa usado por los pacientes que padecen la enfermedad. El plan general comúnmente empleado es la utilización de medicamentos hipoglucemiantes que siempre vienen acompañados por un menor consumo de carbohidratos y grasas en la dieta, y actividad física con el propósito de perder peso.

Los tratamientos con hipoglucemiantes orales están asociados a efectos adversos o tóxicos y pérdida de efectividad a largo plazo (Jarald, Joshi, & Jain, 2008), por lo que la búsqueda de nuevos fármacos con mayor eficacia y que representen un menor riesgo para la salud se ha convertido en el objetivo principal de la industria farmacéutica. Un enfoque utilizado en la actualidad y que está cobrando fuerza es el uso del conocimiento de la medicina tradicional que engloba la etnofarmacología como ciencia multidisciplinaria (Heinrich & Gibbons, 2001).

Las plantas constituyen una fuente potencial de fármacos hipoglucemiantes debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios que poseen, y son utilizadas en distintos sistemas de medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) estima que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria, y que la mayor parte de los remedios usados provienen de plantas. Está reportado que al menos el 25% de los medicamentos de la farmacopea moderna son derivados de plantas, y que muchas otras son síntesis parciales constituidas a partir de compuestos aislados de plantas (Surya et al., 2014). El mejor ejemplo de este hecho, en el tratamiento de la diabetes, particularmente para la disminución de la producción hepática de glucosa, es la metformina.

A principios de los 90's, Alarcon-Aguilar y colaboradores mencionaron que, a nivel mundial, la información etnobotánica reportó alrededor de 800 plantas medicinales con efecto hipoglucemiante, de las cuales, aproximadamente, 150 se encontraban en México. Para el año 2005, Andrade-Cetto y Heinrich documentaron al menos 306 especies de plantas en 235 géneros y 93 familias utilizadas para el tratamiento de la DM en México. Posteriormente, Prabhakar y Doble, en el 2008, realizaron una revisión de los mecanismos de acción de las plantas con efecto hipoglucemiante donde mencionan que hay,

aproximadamente, 410 plantas medicinales con datos experimentales que respaldan este efecto, aunque sólo para 109 de ellas se ha descrito el mecanismo de acción completo.

Las familias botánicas que contribuyen con más especies con efecto hipoglucemiante, de las que se tiene conocimiento hasta el momento, son Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Liliaceae, Poaceae y Euphorbiaceae (Esquivel-Gutiérrez, Noriega-Cisneros, Bello-González, Saavedra-Molina, & Salgado-Garciglia, 2012), de las cuales se han identificado metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos que presentan distintos mecanismos de acción para controlar los niveles de glucosa (Bahmani et al., 2014). En la **Tabla 3** se presenta un ejemplo de cada una de las categorías mencionadas previamente con su respectivo mecanismo de acción descrito.

La información experimental reportada apoya que los extractos de plantas medicinales afectan el metabolismo de la glucosa y lípidos mejorando los síntomas de los pacientes que las consumen mediante la modulación de vías como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la gluconeogénesis, la glucogénesis y glucogenólisis, síntesis de colesterol, o síntesis y liberación de insulina. Concretamente, los extractos de plantas como *Artemisia sacrorum* Ledeb (Asteraceae), *Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae), *Salacia reticulata* (Hippocrateaceae), *Satureja khuzestanica* Jamzad (Lamiaceae) y *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers (Menispermaceae) inhiben la gluconeogénesis mediante la activación de AMPK, la supresión de la expresión génica y la inhibición directa de las enzimas gluconeogénicas (Andrade-Cetto, 2012).

5.1. Plantas hipoglucemiantes

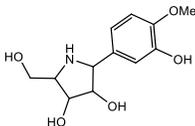
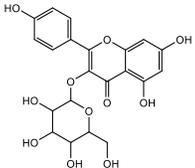
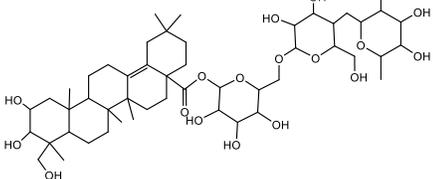
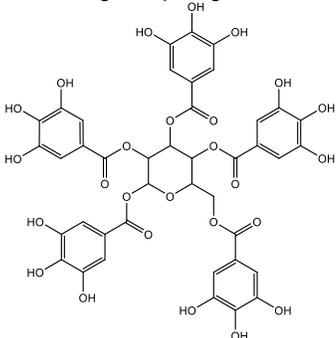
Andrade-Cetto y Cárdenas-Vázquez (2010) demostraron que los extractos de *C. obtusifolia* y *C. peltata*, donde se detectó la presencia de ácido clorogénico, inhibían la gluconeogénesis utilizando pruebas de tolerancia a piruvato (2 g/kg; i.p.) en ratas Wistar hiperglucémicas de dos meses de edad, inducidas con estreptozotocina (STZ) a los 5 días de nacidas (n5-STZ), con un ayuno previo de 18 h; además, ambos extractos inhibieron la actividad de la translocasa T1 del sistema G6Pasa en microsomas hepáticos intactos de rata.

Ambas plantas fueron documentadas en México como hipoglucemiantes por Andrade-Cetto y su grupo de trabajo mediante la realización de entrevistas etnobotánicas. De igual manera, para la presente investigación se seleccionaron dos plantas con estudios

fitoquímicos previos, reportadas con efecto hipoglucemiante por dicho grupo de trabajo, para probar su efecto inhibitorio sobre la gluconeogénesis hepática en ratas hiperglucémicas, específicamente sobre la G6Pasa T1. Las plantas utilizadas fueron *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti (Smilacaceae) y *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae).

Tabla 3

Ejemplos de metabolitos secundarios con efecto hipoglucemiante y su mecanismo de acción

Metabolito secundario	Ejemplo	Mecanismo de acción
Alcaloides	<p>Radicamina A*</p> 	Inhibidor de α -glucosidasas
Flavonoides	<p>Astragalina*</p> 	Inhibidor de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs)
Terpenos	<p>Centelasaponina A*</p> 	Inhibidores de la aldosa reductasa
Fenólicos	<p>Penta-O-galoi-β-D-glucosa*</p> 	

Nota. Adaptada de Bahmani et al. (2014).

*Estructuras obtenidas del National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database.

5.1.1. *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti

Descripción y clasificación taxonómica

Pertenece a la familia Smilacaceae y es conocida comúnmente como “zarzaparrilla blanca”, “alambriillo” o “cocolmeca” (**Tabla 4**). Es una planta guía leñosa que trepa hasta 10 m o más de altura. La porción inferior del tallo está provista con espinas rectas, aplanadas y negruzcas. Posee hojas redondeadas y alargadas, anchas en la base con terminación en punta. Presenta zarcillos con frecuencia saliendo de los nudos de las ramas floríferas. Las flores son verdes, amarillo pálido o verde amarillento; por otro lado, los frutos son bayas de color negro y redondas que miden de 6 a 7 mm (**Figura 10**).

Tabla 4
Información taxonómica de *S. moranensis*

Clasificación		Sinonimias	
Clase	Equisetopsida C. Agardh	<i>Smilax acutifolia</i> Schltld.	<i>Smilax invenusta</i> Kunth
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.	<i>Smilax botteri</i> A.DC.	<i>Smilax jalapensis</i> Schltld.
Superorden	Lilianaes Takht.	<i>Smilax cordifolia</i> var. <i>papantlae</i> A.DC.	<i>Smilax schaffneriana</i> (A.DC.) F.W.Apt
Orden	Liliales Perleb	<i>Smilax densiflora</i> A.DC.	<i>Smilax schiedeana</i> Kunth
Familia	Smilacaceae Vent.	<i>Smilax erythrocarpa</i> Kunth	<i>Smilax sylvatica</i> Kunth
Género	<i>Smilax</i> L.	<i>Smilax glaucocarpos</i> Schltld.	<i>Smilax xalapensis</i> Kunth

Nota. Adaptada de The Plant List (2013) y Tropicos (2016).



Figura 10. Características morfológicas de *S. moranensis*. **A)** Ejemplar de herbario de una rama donde se observan las hojas, los zarcillos y las inflorescencias. Tomada de Tropicos (2016). *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti [Figura]. **B)** Foto de una plántula donde se observan las espinas en el tallo (comunidad de Santos Reyes, Nopala). Tomada de Arias-Chávez (2014). *Estudio crónico del efecto hipoglucemiante de la raíz de Smilax moranensis (Martens & Galeotti) en ratas diabéticas STZ-NA* [Figura].

Distribución

Esta especie, originaria de México, es la más común y más ampliamente distribuida, nativa de las áreas montañosas que van desde el sur de Sonora y Chihuahua hasta Chiapas (**Figura 11**). Habita en climas cálido, semicálido y templado, entre los 600 y 1900 msnm; está asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, y bosques de encino y de pino (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009a; CONABIO, 2015b; Rzedowski & Calderon, 1994).



Figura 11. Distribución de *S. moranensis* en la República Mexicana. Se reporta en la literatura su presencia cerca de las zonas montañosas de los siguientes estados: Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Información obtenida de CONABIO (2015). *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti, 1842 válido.

Antecedentes etnobotánicos

Tradicionalmente, las diferentes especies del género *Smilax* (conocidas comúnmente como “zarzaparrilla”) se han utilizado como depurativo y antirreumático, y las partes más empleadas son el rizoma y las raíces. Durante el siglo XIX, fueron utilizadas en varios países de Europa y en Estados Unidos para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual como la sífilis, y en 1850, especies de este género fueron incluidas dentro de la farmacopea de Estados Unidos debido a este uso. Específicamente, el rizoma de *S. glabra*

Roxb. ha sido empleado para el tratamiento de la diabetes en Vietnam (Gunn, Che, & Farnsworth, 2013).

Las especies más representativas se encuentran en América Central y en Sudamérica, donde son utilizadas para tratar diversos padecimientos como anemia, afecciones digestivas, hinchazón, malaria y dolor de riñones (García-González, Díaz, & Villalobos, 2008).

Se reporta el uso tradicional de la raíz de *S. moranensis* desde el siglo XVI como diurético; además se emplea como expectorante, antiinflamatorio, depurativo, antiespasmódico, antipirético y para bajar de peso. Se prepara la raíz seca en decocción y se utiliza como agua de uso (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009a). También, se ha documentado su uso hipoglucemiante en la comunidad de Santos Reyes Nopala, Oaxaca para el control de la DM mediante entrevistas directas realizadas a personas diabéticas que utilizan plantas medicinales (Andrade-Cetto, 2011a).

Antecedentes fitoquímicos

La fitoquímica del género *Smilax* se caracteriza por presentar saponinas esteroidales en gran abundancia, las cuales exhiben un amplio rango de actividades biológicas que incluyen propiedades citotóxicas, hemolíticas, antiinflamatorias, antifúngicas, antibacteriales y antilepróticas. Entre las especies donde se han aislado estos metabolitos secundarios se encuentran *S. aspera* L., *S. china* L., *S. lebrunii* H. Lév. y *S. ornata* Lem. (Challinor et al., 2012) (**Figura 12B**). También, dentro del género, se ha reportado la presencia de flavononoles como la taxifolina y la aromadendrina; por ejemplo, Sang y colaboradores (2014) reportaron en la especie *S. glabra* la presencia de taxifoliol (**Figura 12A**), entre otros flavonoides y terpenos con potencial efecto protector contra el daño endotelial ocasionado por los AGEs, una complicación asociada a la DM.

Por otro lado, Cirilo (2003) elaboró extractos hexánico, acetónico, metanólico y acuoso para determinar la composición química de la raíz de *S. moranensis* (**Tabla 5**). En la mayoría de los extractos se observó la presencia de esteroides, terpenos, saponinas y flavonoides, por mencionar algunos. El hallazgo de estos compuestos coincide con los reportados en otras especies del mismo género; sin embargo, aún no se han identificado los nombres de los metabolitos presentes en la especie.

De igual manera, Andrade-Cetto (2011) determinó que los principales constituyentes del extracto acuoso y del extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* son flavonoides por medio de cromatografía en capa fina (TLC), y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) demostró la presencia de un compuesto mayoritario acompañado de tres componentes en menor cantidad en el extracto etanol-agua.

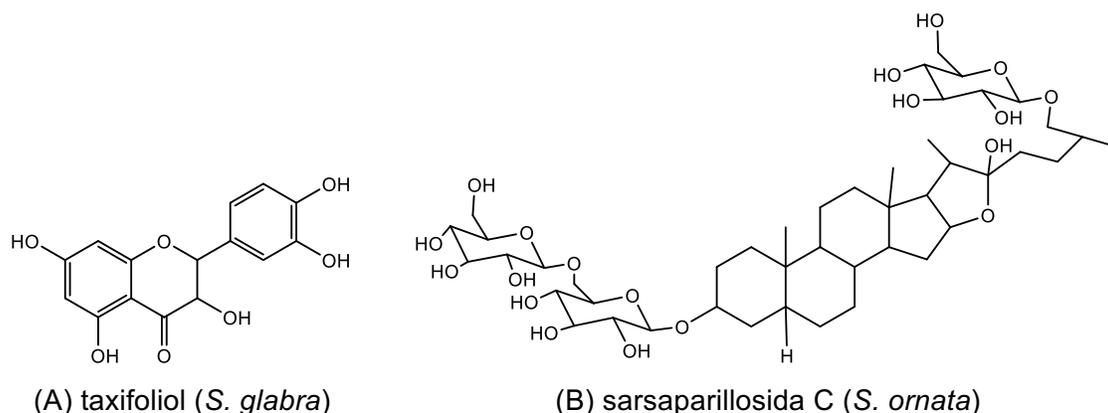


Figura 12. Ejemplos de metabolitos presentes en especies del género *Smilax*. A) Estructura de flavononol (flavonoide) presente en *S. glabra* obtenida de Sang et al. (2014). B) Estructura de saponina esteroideal (terpeno) presente en *S. ornata* obtenida de Challinor et al. (2012).

Tabla 5

*Compuestos químicos presentes en extractos de la raíz de *S. moranensis*.*

Compuestos	Hexánico	Acetónico	Metanólico	Acuoso
Esteroides y terpenos	X	X	X	
Coumarinas	X	X	X	X
Alcaloides	X	X	X	
Azúcares	X	X	X	
Grupos carbonilo	X	X	X	X
Insaturaciones		X	X	X
Oxidrilos fenólicos		X	X	X
Sesquiterpenlactonas		X	X	X
Flavonoides		X	X	
Quinonas		X	X	X
Saponinas		X	X	

Nota. Tomada de Cirilo (2003).

Antecedentes farmacológicos

Se han llevado a cabo estudios farmacológicos para probar la actividad hipoglucemiante de las raíces y el rizoma de diferentes especies de *Smilax*. Fukunaga y colaboradores (1997) demostraron que el extracto metanólico del rizoma de *S. glabra* a una dosis de 100 mg/kg (i.p.) disminuyó la glucosa plasmática en ratones KK-Ay, un modelo hiperglucémico no dependiente de insulina que posee hiperinsulinemia, a las 4 horas de su administración; sin

embargo, no modificó los niveles de glucosa en ratones hiperglucémicos inducidos con STZ con deficiencia de insulina. De acuerdo a estos resultados, los autores concluyeron que el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico del rizoma de *S. glabra* se debe a un aumento en la sensibilidad de insulina.

García-González y colaboradores (2008) determinaron que la administración oral a dosis repetidas (concentración de 160 mg/ml) durante un periodo de 30 días de los extractos hidroalcohólicos de las raíces y rizomas de varias especies de *Smilax* de Centroamérica en ratones de la cepa Hsd/ICR (CD-1) produjeron una tendencia hipoglucemiante, aunque sólo fue significativo durante el periodo residual, es decir, después de una semana de haber suspendido el tratamiento. En el mismo trabajo se evaluó la toxicidad subcrónica de dichos extractos, y se concluyó que a una dosis diaria de 2 g/kg, administrada durante 90 días, ningún extracto resultó mortal y no causó anomalías histológicas.

También se ha evaluado el efecto de *S. moranensis* sobre la disminución de peso corporal en ratas Sprague-Dawley sometiéndolas a tres dosis distintas del té de la raíz de dicha planta durante 21 días. Los resultados mostraron que a una dosis de 32 mg/kg, principalmente en machos, existió una menor ganancia de peso con respecto a las demás dosis y al grupo control (Cirilo, 2003).

En el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM se ha probado el efecto hipoglucemiante agudo y crónico de la raíz de *S. moranensis* en ratas hiperglucémicas inducidas con STZ. En el primer estudio, utilizando el modelo de ratas hiperglucémicas n5-STZ (90 mg/kg, i.p.), se probó que tanto el extracto acuoso como el etanol-agua de la raíz producen un efecto hipoglucémico dosis-dependiente. El extracto etanol-agua a una dosis de 80 mg/kg (dosis tradicional x10) fue el que tuvo un mejor efecto.

En el segundo estudio, se evaluó el efecto crónico del extracto etanol-agua sobre los niveles de glucosa plasmática, el porcentaje de HbA1c, niveles de triglicéridos y colesterol HDL en ratas hiperglucémicas inducidas con STZ y nicotinamida (NA) (65 mg/kg, i.v.; 150 mg/kg, i.p.) durante 42 días de tratamiento, y se concluyó que la administración crónica por vía oral de dicho extracto a una dosis de 80 mg/kg contribuye a la disminución y mantenimiento de la glucemia a partir de los 7 días, y del porcentaje de HbA1c y de los triglicéridos a partir de los 28 días (Arias-Chávez, 2014).

5.1.2. *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob.

Descripción y clasificación taxonómica

Pertenece a la familia Asteraceae y es conocida comúnmente como “Yolochíchitl” “Amargocilla” o “Hierba del ángel” (**Tabla 6**). Es un arbusto que llega a medir hasta 2 m de altura. Las ramas son gruesas y cilíndricas. Presenta hojas simples opuestas, pecioladas de forma ovalo-triangular. Las flores son blancas y dispuestas en un número de 35 a 40 en cabezuelas (**Figura 13**). Sus frutos son aquenios (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009b; Rojo & Rodríguez, 2002)

Tabla 6

Información taxonómica de A. petiolaris

Clasificación		Sinonimias
Clase	Equisetopsida C. Agardh	
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.	
Superorden	Asteranae Takht.	<i>Bustamenta cordata</i> DC.
Orden	Asterales Link	<i>Eupatorium petiolare</i> Moc. & Sessé ex DC.
Familia	Asteraceae Bercht. & J. Presl	
Género	<i>Ageratina</i> Spach	

Nota. Adaptada de The Plant List. (2013) y Tropicos. (2016).

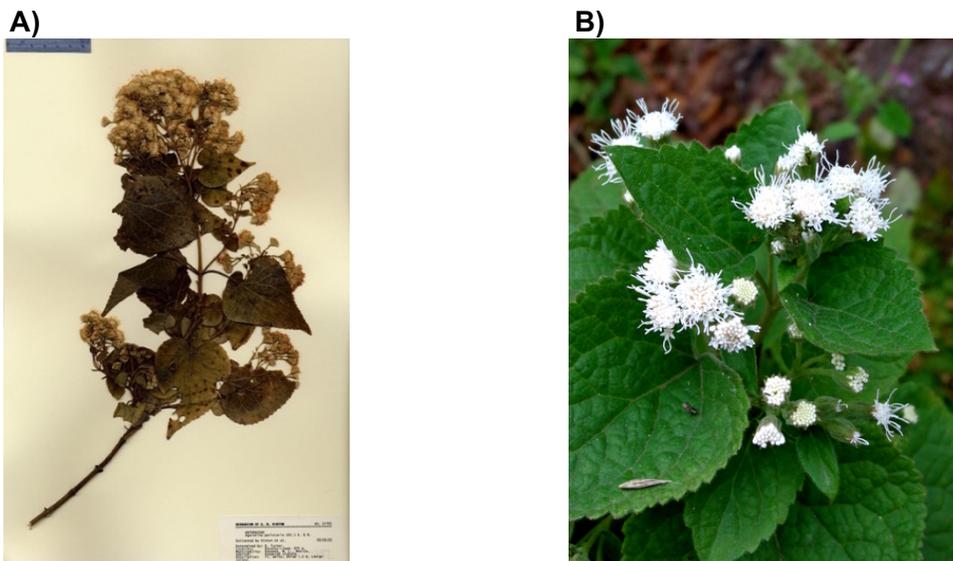


Figura 13. Características morfológicas de *A. petiolaris*. **A)** Ejemplar de herbario de una rama donde se observan las hojas y las inflorescencias. Tomada de Tropicos. (2016). *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob. [Figura]. **B)** Foto de la planta donde se observa la disposición y morfología de las hojas, al igual que las inflorescencias blancas. Tomada de NaturaLista. (2015). Amargocilla (*Ageratina petiolaris*) [Figura].

Distribución

Es una planta endémica de México que se distribuye en climas cálido, semicálido, semiseco y templado en el rango de 900 a 9300 msnm (**Figura 14**). Está asociado a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña y bosques de encino y de pino (CONABIO, 2015a).



Figura 14. Distribución de *A. petiolaris* en la República Mexicana. Se reporta en la literatura su presencia en los estados de Coahuila, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Información obtenida de CONABIO. (2015). *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King H. Rob., 1970 válido.

Antecedentes etnobotánicos

Es una planta de uso medicinal utilizada comúnmente para trastornos digestivos como dolores estomacales, diarrea, gastritis, indigestión, disentería y empacho. Las partes empleadas son las hojas y las ramas (parte aérea), que son preparadas en cocimiento para la administración vía oral de la infusión. También es utilizada para reumatismo, cólicos menstruales, contra los nervios, la tos, la DM y en baños posparto (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009b; Weller, 2010). Adicionalmente, *A. petiolaris* ha sido documentada como planta de uso tradicional con efecto hipoglucemiante en México, formando parte de una lista de 306 especies vegetales empleadas para el mismo fin (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005); además, vendedores de plantas medicinales del

mercado de Sonora mencionaron que venden la planta como tratamiento para DM en entrevistas realizadas en el 2011, y que es traída del pueblo de Tenancingo, estado de México (Bustos-Brito et al., 2016).

Antecedentes fitoquímicos

Dentro del género *Ageratina* se han descrito principalmente terpenos como derivados de timol, lactonas sesquiterpénicas y diterpenoides derivados del *ent*-labdano presentes en las partes aéreas de las especies estudiadas (Castillo et al., 2016; Quijano, Calderón, Gómez, Garduño, & Ríos, 1980; Tamayo-Castillo et al., 1988). Específicamente, en *A. petiolaris* se han aislado compuestos pertenecientes a los grupos antes mencionados en los extractos menos polares, mientras que en extractos acuoso y metanólico se identificaron ocho metabolitos secundarios, de los cuales destacan el ácido clorogénico y el L-quirositol debido a que se les atribuye propiedades hipoglucemiantes (**Figura 15**) (Bustos-Brito et al., 2016).

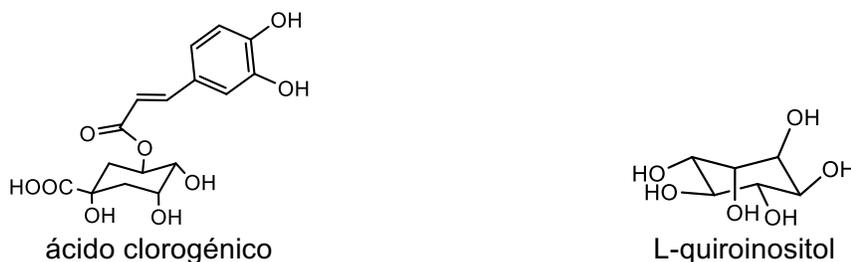


Figura 15. Estructuras del ácido clorogénico y L-quirositol, compuestos aislados en los extractos acuoso y metanólico de *A. petiolaris*.

Tomadas de Bustos-Brito et al., 2016.

Antecedentes farmacológicos

Bustos-Brito y colaboradores (2016) probaron el efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso y metanólico de la parte aérea de *A. petiolaris*, así como el L-quirositol, en ratas hiperglucémicas STZ-NA (65 mg/kg, i.v.; 150 mg/kg, i.p.). Se observó que ambos extractos y el compuesto disminuyeron significativamente la hiperglucemia comparados contra el grupo control hiperglucémico y su propio tiempo cero. Concluyeron que con el extracto acuoso de dicha planta a una dosis de 160 mg/kg se obtuvo un mejor efecto hipoglucemiante desde los 60 minutos. Por otro lado, el compuesto L-quirositol (3.73 mg/kg) tuvo efecto disminuyendo progresivamente, y de manera significativa, los niveles de glucosa plasmática. Adicionalmente, en pruebas de tolerancia a glucosa oral de dos horas realizadas en el mismo trabajo se observó que el extracto acuoso de la planta no suprime el pico de glucosa que se observa a los 30 minutos de la prueba.

METODOLOGÍA

1. Preparación del material biológico

1.1. Obtención de plantas

La raíz molida de *S. moranensis* fue proporcionada por el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Dicha planta fue recolectada en febrero de 2011 en el municipio Santos Reyes Nopala, Oaxaca, identificada por Ramiro Cruz Durán, y un ejemplar fue depositado en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS 15815).

Por otro lado, *A. petiolaris* fue recolectada en el municipio de Tenancingo, estado de México en febrero de 2012, identificada por José Luis Villaseñor, y un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU-1333 471). El material vegetal fue proporcionado por el Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM.

1.2. Elaboración de extractos

Se elaboró el extracto etanol-agua de la raíz molida de *S. moranensis* y el extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris*. Ambos extractos demostraron tener un mejor efecto hipoglucemiante en anteriores pruebas farmacológicas. Las dosis utilizadas en las pruebas de tolerancia a piruvato fueron obtenidas a partir de estos resultados; de esta manera, se empleó la dosis de 80 mg/kg (dosis tradicional x10) para el caso del extracto etanol-agua de *S. moranensis* (Andrade-Cetto, 2011a), y la dosis de 160 mg/kg (dosis tradicional x4) en el caso del extracto acuoso de *A. petiolaris* (Bustos-Brito et al., 2016).

Al finalizar la elaboración de los extractos, se obtuvo el rendimiento y se calculó el *Drug Extraction Ratio* (DER) para cada uno de acuerdo a la siguiente fórmula (Vlietinck, Pieters, & Apers, 2009):

$$DER = \frac{\text{sustancia herbal (g)}}{\text{preparación herbal (g)}} = X:1$$

1.2.1. Extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis*

Se colocó un puño de la raíz molida (alrededor de 20 g) en 250 ml de etanol absoluto y 250 ml de agua destilada en un vaso de precipitados con capacidad de 1 L. Esta mezcla se calentó a 40°C en una parrilla y se mantuvo en agitación durante cuatro horas. Después, la

mezcla se filtró al vacío utilizando papel filtro y tierra de diatomeas en un embudo Büchner conectado a un Kitasato de 500 ml y a una bomba de vacío. El filtrado se pasó a un matraz bola de 500 ml que se acopló a un *Rotavapor BÜCHI®* para retirar el etanol a una presión reducida. El concentrado resultante se pasó a un cristizador y se envolvió en película plástica para ser refrigerado a una temperatura de -40°C por 24 horas en un ultracongelador Revco™. Transcurrido ese tiempo, se liofilizó para eliminar el agua y obtener el extracto seco en una liofilizadora FreeZone^R.

1.2.2. Extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris*

Se pesaron 20 g de la parte aérea molida de la planta y se colocaron en un vaso de precipitados de 1 L con 500 ml de agua destilada en ebullición. La mezcla fue retirada de la parrilla y se mantuvo en agitación durante 15 minutos; posteriormente, se filtró utilizando papel filtro y tierra de diatomeas en un embudo Büchner conectado a un kitasato de 500 ml y a una bomba de vacío. El filtrado se pasó en un cristizador y se envolvió en una película de plástico para refrigerarlo a una temperatura de -40°C por 24 horas en un ultracongelador Revco™. El extracto seco se obtuvo eliminando el agua en la liofilizadora FreeZone^R.

2. Evaluación de la inhibición de la gluconeogénesis *in vivo*

Una de las aproximaciones experimentales empleada para probar el efecto de los extractos de plantas medicinales sobre la gluconeogénesis es la utilización de modelos animales que asemejen las características de la DM2. El modelo hiperglucémico STZ-NA es un modelo animal donde la administración de STZ y NA, a distintas dosis, ha sido propuesta para inducir diabetes experimental en roedores, simulando la hiperglucemia que define a la enfermedad, en este caso, debido a una destrucción parcial de las células β del páncreas (Masiello et al., 1998).

Las alteraciones observadas con este modelo asemejan a aquellas que muestran los pacientes diabéticos, por lo que es ampliamente utilizado para estudiar la patogénesis de la enfermedad y sus complicaciones en animales experimentales. La destrucción parcial ocasionado a las células β simula la deficiencia en la secreción de insulina en DM2 lo que se traduce en un pobre abastecimiento de la hormona a los tejidos blanco, entre ellos el hígado.

2.1. Animales experimentales

Los animales de experimentación fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar de entre 2 y 3 meses de edad con un peso aproximado de 250 g, y se mantuvieron con fotoperiodos de 12h/12h de luz/oscuridad con libre acceso a agua y alimento Rodent Laboratory Chow 5001 de Purina *ad libitum*.

2.2. Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA

La hiperglucemia se indujo a ratas con ayuno previo de 12 horas. Se inyectó NA a una dosis de 150 mg/kg (i.p.), disuelta en 2 ml de solución fisiológica por kg de peso; después de 15 minutos, se administró STZ a una dosis de 65 mg/kg (i.v.), disuelta en 1ml de buffer de acetatos (0.9% de acetato de sodio en 105 mM de ácido acético) por kg de peso. Transcurrida una semana de la inducción, se eligieron aquellos organismos con una glucemia mayor a 300 mg/dl para que, al someterlas a 18 horas de ayuno, presentaran valores de glucosa alrededor de 200 mg/dl.

La solución de STZ se preparó un día antes de la inducción y se refrigeró a una temperatura de 4°C hasta su utilización, mientras que la solución de NA se preparó al momento de usarse y se mantuvo a temperatura ambiente.

2.3. Pruebas de tolerancia a piruvato

El modelo hiperglucémico STZ-NA en roedores presenta una correlación directa entre la hiperglucemia en ayuno y la tasa de producción de glucosa similar a la que se presenta en pacientes con DM2, por lo que representa un modelo idóneo para determinar el efecto de inhibidores potenciales sobre la gluconeogénesis *in vivo*. El diseño experimental sería administrar un sustrato gluconeogénico, como el piruvato, para iniciar la producción de glucosa mediante esa vía en roedores con un ayuno previo, y de esta manera se observaría un aumento del pico hiperglucémico. Esta prueba es conocida como prueba de tolerancia a piruvato, y es una variante de la prueba de tolerancia a la glucosa. Posteriormente, se administraría el extracto a probar para observar el efecto sobre el pico hiperglucémico.

Las curvas de tolerancia a piruvato se realizaron en ratas con un ayuno previo de 18 horas. Primeramente, se midieron los niveles de glucosa plasmática del tiempo cero por duplicado con glucómetros AccutrendPlus® colocando una gota de sangre de la vena caudal en tiras reactivas Accutrend®. Posteriormente, se administró solución fisiológica (control negativo),

metformina (control positivo) o el extracto correspondiente (p.o.) en 1.5 ml de solución fisiológica con una cánula esofágica, y 15 minutos después se inyectó 1.5 ml de solución fisiológica o piruvato de sodio vía intraperitoneal. Las mediciones se realizaron cada 30 minutos, tomando en cuenta el tiempo cero justo después de la inyección intraperitoneal, hasta los 120 minutos.

Las ratas normoglucémicas e hiperglucémicas seleccionadas para las pruebas fueron asignadas a siete grupos experimentales de 11 organismos cada uno con un tratamiento definido (**Tabla 7**).

Tabla 7

Grupos experimentales asignados a las pruebas de tolerancia a piruvato con su respectivo tratamiento y dosis correspondiente

Grupo experimental	Tratamiento	Dosis
Control normoglucémico (N)	Solución fisiológica (p.o.)	-
	Solución fisiológica (i.p.)	-
Control hiperglucémico (H)	Solución fisiológica (p.o.)	-
	Solución fisiológica (i.p.)	-
Control normoglucémico + piruvato (NP)	Solución fisiológica (p.o.)	-
	Piruvato de sodio (i.p.)	2 g/kg
Control hiperglucémico + piruvato (HP)	Solución fisiológica (p.o.)	-
	Piruvato de sodio (i.p.)	2 g/kg
Control hiperglucémico + piruvato + metformina (HPM)	Metformina (p.o.)	500 mg/kg
	Piruvato de sodio (i.p.)	2 g/kg
Grupo hiperglucémico + piruvato + <i>S. moranensis</i> (HPSm)	Extracto etanol-agua (p.o.)	80 mg/kg
	Piruvato de sodio (i.p.)	2 g/kg
Grupo hiperglucémico + piruvato + <i>A. petiolaris</i> (HPAp)	Extracto acuoso (p.o.)	160 mg/kg
	Piruvato de sodio (i.p.)	2 g/kg

3. Determinación de la inhibición directa de G6Pasa *in vitro*

La inhibición de la gluconeogénesis observada *in vivo* puede confirmarse con un análisis *in vitro* que involucra la inhibición de la actividad de la G6Pasa en microsomas intactos de rata, midiendo la concentración de fosforo inorgánico liberado en la reacción de hidrólisis de G6P mediante espectrofotometría. El principio de la prueba radica en la formación de un complejo de fosfomolibdato que es reducido por ácido ascórbico, obteniéndose una coloración azul que es proporcional a la cantidad de fosfato presente en el medio (Ames, 1966; Nordlie & Arion, 1966). Al añadir el inhibidor a distintas concentraciones, de menor a mayor, se obtienen coloraciones azules más tenues, lo que indica poca liberación de fosfato, y por lo tanto, la supresión de la actividad de la fosfatasa.

3.1. Obtención de microsomas

Una rata Wistar macho, previamente sometida a 18 horas de ayuno, fue anestesiada con pentobarbital sódico (10u/100g, i.p.) para ser disectada y poder extraer el hígado. Se fueron cortando fragmentos de ~2 g que fueron pesados en cristalizadores, previamente enfriados; posteriormente, cada fragmento fue colocado en un homogeneizador DOUNCE de 10 ml y se agregaron 8 ml del buffer A (sacarosa 0.25M, EDTA 1mM, HEPES 5mM a pH 7.4) para comenzar a homogeneizar con ocho golpes y obtener una concentración de tejido al 20%. El homogenizado se filtró con una tela de nylon y se colectó en un vaso de precipitados de 50 ml, previamente enfriado. Este procedimiento se repitió al menos tres veces más.

El volumen final de homogenizado al 20% fue dividido en dos tubos de cetrífuga Falcon® de 50 ml que se calibraron y centrifugaron a 1000 g por 10 minutos. El sobrenadante se colectó en varios tubos de policarbonato de 10 ml que fueron calibrados y colocados en un rotor enfriado para ser centrifugados a 12 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante post-mitocondrial obtenido fue colectado en otros tubos de policarbonato que se centrifugaron a 100 000 g durante una hora. Las pastillas obtenidas se lavaron tomando buffer 1 con una pipeta Pasteur y se guardaron a -40°C en un ultracongelador Revco™. Todos los procedimientos fueron realizados a 4°C.

3.2. Curvas de inhibición concentración-respuesta

Para realizar las curvas concentración-respuesta, en primer lugar se realizó un ensayo para seleccionar el volumen indicado de microsomas para obtener una unidad de densidad óptica al medir en el espectrofotómetro (830 nm). Esta medición fue considerada el máximo de actividad de la G6Pasa sin inhibidor.

3.2.1. Ensayo de selección de volumen de microsomas

Se preparó el buffer B (imidazol 40 mM, sacarosa 0.5 M a pH 7.0) y la solución de trabajo para terminar la reacción de la G6Pasa (molibdato de amonio al 0.42%, SDS al 10% y ácido ascórbico al 10%) que fueron colocados en hielo durante todo el procedimiento. Se resuspendió una pastilla de microsomas en 1 ml de buffer 2 utilizando un vortex; se vertió en un tubo de ensayo de 10 ml y se colocó en hielo de igual manera. Posteriormente, se colocaron nueve tubos de ensayo de 10 ml en una gradilla de acuerdo a la **figura 16A**. En cada tubo se puso un volumen total de reacción de 100 µl, donde se añadieron: 50 µl buffer B; agua destilada en distintos volúmenes; 5,10 ó 15 µl de microsomas; y 10 µl de G6P 20

mM (añadido al final para iniciar la reacción, excepto en los tubos blanco que fue agregado después de añadir la solución de trabajo para terminar la reacción).

La gradilla fue colocada en un baño María a temperatura ambiente. La incubación de la actividad catalítica de la enzima comenzó al poner 10 μ l de G6P 20 mM en el primer tubo, posteriormente se añadieron a los siguientes tubos cada 15 segundos. La incubación tuvo una duración de 20 minutos y finalizó al añadir 900 μ l de solución de trabajo al primer tubo (seguido por los demás cada 15 segundos). Se añadió la G6P a los tubos blanco y se realizó una incubación a 45°C por 20 minutos.

Finalmente, se evaluó la actividad de los microsomas midiendo la absorbancia de la coloración azul obtenida por la formación del complejo fosfomolibdato, que es proporcional a la cantidad de fosforo inorgánico presente en el medio. La coloración de los extractos fue tomada en cuenta, por lo que los valores de densidad óptica obtenidos de los blancos se restaron a los valores obtenidos de cada volumen de microsomas para obtener los valores finales que corresponden exclusivamente a la actividad de la enzima.

3.2.2. Ensayo de inhibición de la G6Pasa

Se utilizaron 48 tubos de ensayo de 10 ml que fueron colocados en una gradilla de acuerdo a la **figura 16B**. En cada tubo se puso un volumen total de reacción de 100 μ l, donde se añadieron: 50 μ l de buffer B; agua destilada a distintos volúmenes para completar el volumen de reacción; ácido clorogénico o el extracto a distintas concentraciones (0, 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 12000 μ g/ml); el volumen seleccionado de microsomas; y 10 μ l de G6P 20 mM (añadido al final para iniciar la reacción, excepto en los tubos blanco que fue agregado después de añadir la solución de trabajo para terminar la reacción). Se llevó a cabo el procedimiento descrito previamente en la sección de ensayo de selección de volumen de microsomas para finalizar con la obtención de los valores de densidad óptica.

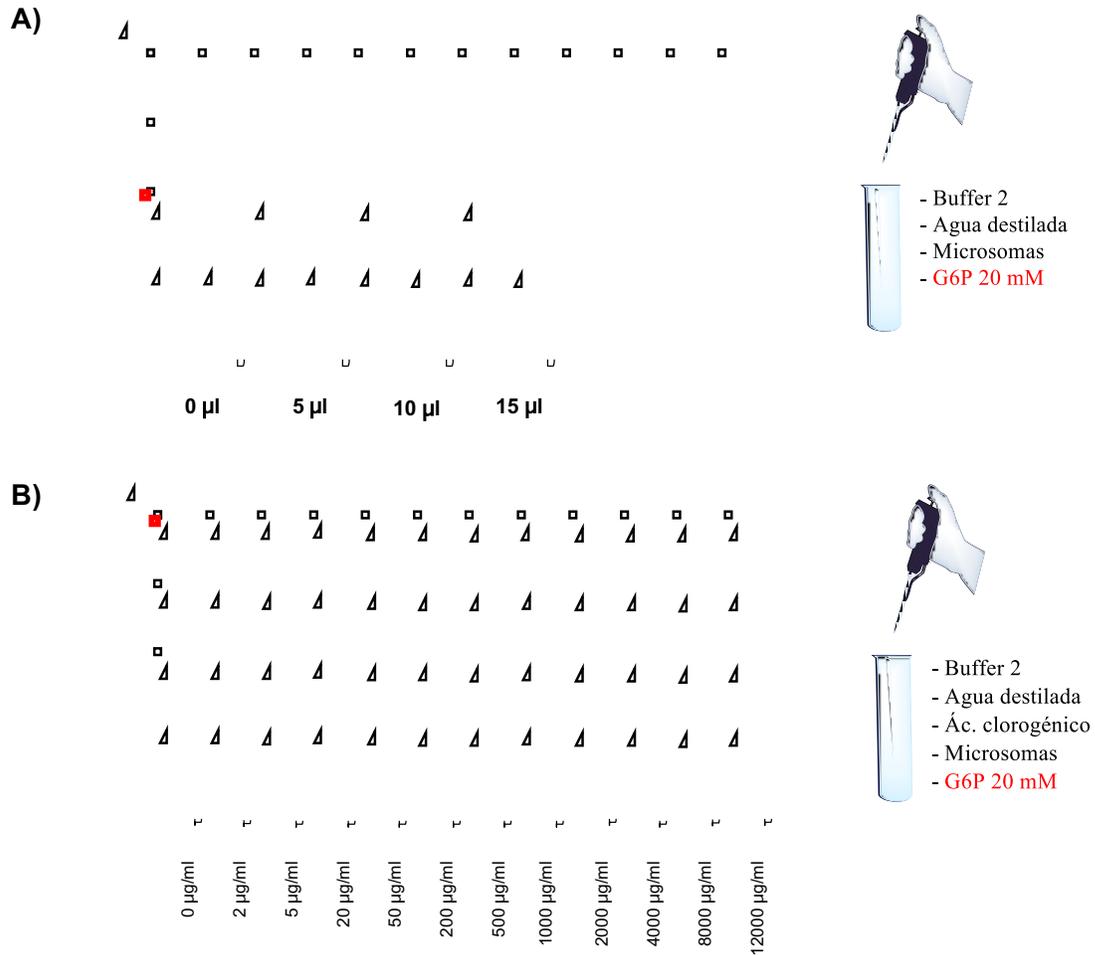


Figura 16. Diseño experimental de los ensayos *in vitro* para la realización de las curvas de inhibición concentración-respuesta. A) Diagrama que indica la disposición de los tubos de ensayo en la gradilla para el ensayo de selección de volumen de microsomas. **B)** Diagrama que indica la disposición de los tubos de ensayo en la gradilla para el ensayo de inhibición de la G6Pasa.

*Los blancos están marcados con rojo. La G6P se agrega al finalizar la reacción.

4. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.00, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com, para llevar a cabo todos los análisis y para la elaboración de las gráficas. Se empleó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Pruebas de tolerancia a piruvato. Se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) de todos los grupos y se compararon mediante pruebas de ANOVA de una vía seguida por pruebas de comparación múltiple de Tukey; adicionalmente se llevaron a cabo dos tipos de comparaciones: 1) intergrupala, valores de glucemia de los grupos por cada tiempo; 2) e intragrupal, valores de glucemia dentro de cada grupo respecto a su tiempo cero.

Curvas de inhibición concentración-respuesta. Para obtener los valores de IC_{50} se realizaron regresiones lineales y no lineales, donde las concentraciones utilizadas se transformaron con la función Log. Las curvas obtenidas de las regresiones no lineales se ajustaron a un modelo logístico de tres o cuatro parámetros.

RESULTADOS

1. Rendimiento de los extractos

Se obtuvieron 3.542 g (preparación herbal) del extracto seco de la raíz de *S. moranensis* a partir de los 20 g iniciales (sustancia herbal), por lo tanto, son necesarias seis partes de la preparación herbal para obtener una parte de sustancia herbal.

$$DER = \frac{\text{sustancia herbal}}{\text{preparación herbal}} = \frac{20 \text{ g}}{3.542 \text{ g}} = 6:1$$

Se obtuvieron 5.738 g (preparación herbal) del extracto seco de la parte aérea de *A. petiolaris* a partir de los 20 g iniciales (sustancia herbal), por lo tanto, son necesarias tres partes de la preparación herbal para obtener una parte de la sustancia herbal.

$$DER = \frac{\text{sustancia herbal}}{\text{preparación herbal}} = \frac{20 \text{ g}}{5.738 \text{ g}} = 3:1$$

2. Reducción del pico hiperglucémico por los extractos en las pruebas de tolerancia a piruvato

El diseño experimental *in vivo* enfocado en la evaluación del efecto de los tratamientos administrados sobre la gluconeogénesis permitió identificar aquellos factores involucrados en la modificación de los valores de glucosa plasmática, los cuales fueron la inducción de hiperglucemia, la inyección de piruvato, y la administración del fármaco y los extractos de las plantas.

Tabla 8

Promedios de glucosa plasmática presentados con EEM de las pruebas de tolerancia a piruvato

Grupo (n=11)	Glucosa plasmática (mg/dl)				
	T0	T30	T60	T90	T120
N	114 ± 3	119 ± 3	111 ± 2	110 ± 3	109 ± 4
NP	111 ± 3 ^b	162 ± 4 ^{b*}	163 ± 7 ^{ab*}	145 ± 6 ^{b*}	133 ± 5 ^{b*}
H	197 ± 9 ^a	210 ± 7 ^{ab}	211 ± 12 ^{ab}	206 ± 13 ^{ab}	210 ± 16 ^{ab}
HP	203 ± 12	351 ± 20 [*]	355 ± 16 [*]	360 ± 13 [*]	354 ± 11 [*]
HPM	192 ± 8	243 ± 25 ^b	205 ± 26 ^b	170 ± 25 ^b	147 ± 23 ^b
HPSm	190 ± 9	307 ± 18 [*]	321 ± 18 [*]	331 ± 18 [*]	329 ± 18 [*]
HPAp	194 ± 6	298 ± 10 ^{b*}	305 ± 8 ^{b*}	315 ± 13 ^{b*}	311 ± 13 [*]

Nota. *a* indica diferencia significativa vs. control normoglucémico (N) ($p < 0.05$). *b* indica diferencia significativa vs. control hiperglucémico más piruvato (HP) ($p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencia significativa contra el T0 en cada grupo ($p < 0.05$). N, control normoglucémico; H, control hiperglucémico; NP, control normoglucémico más piruvato; HP, control hiperglucémico más piruvato; HPM, control hiperglucémico más piruvato tratado con metformina; HPSm, grupo experimental tratado con el extracto de *S. moranensis*; HPAp, grupo experimental tratado con el extracto de *A. petiolaris*.

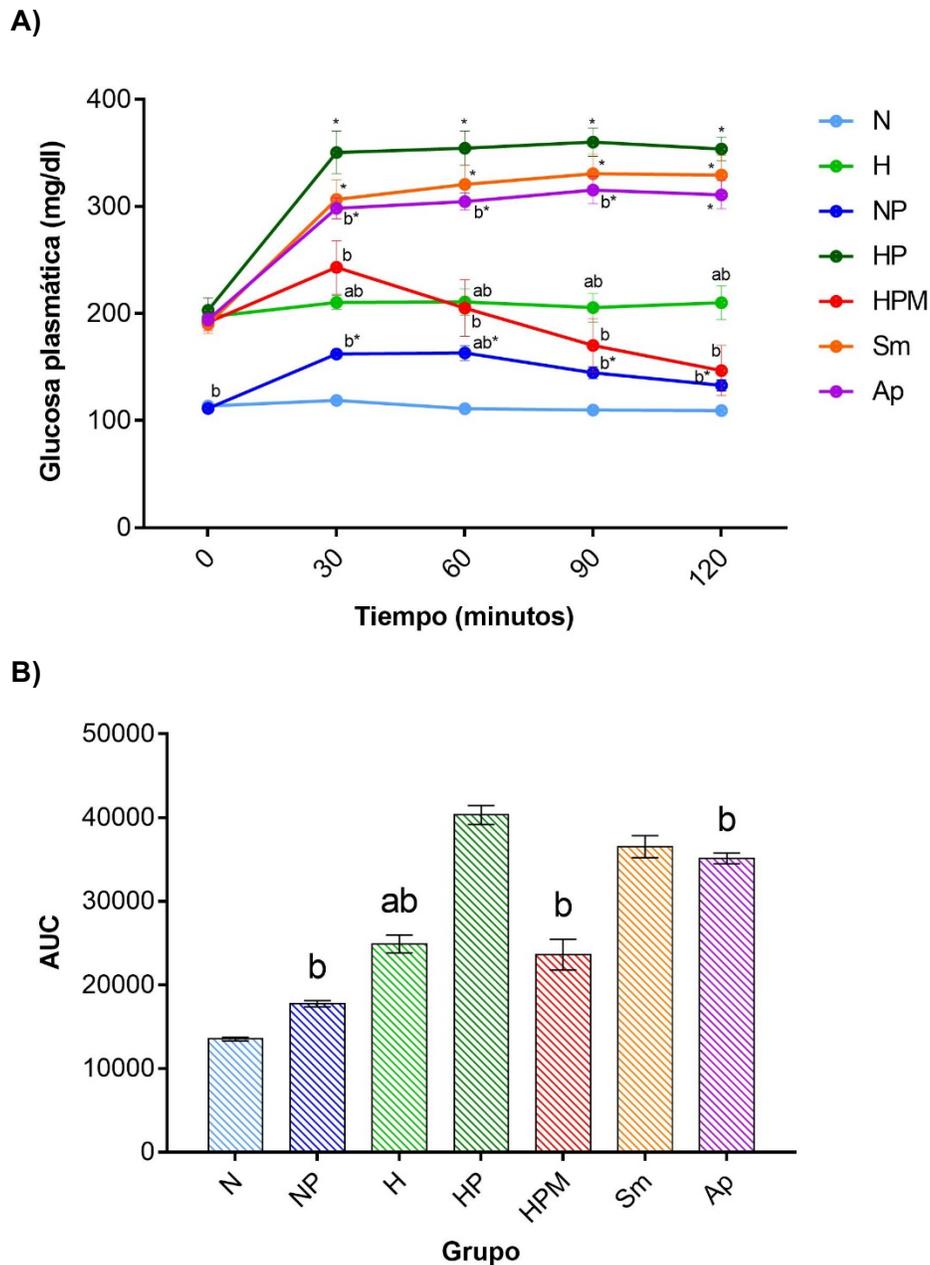


Figura 17. Comportamiento general de los niveles de glucosa plasmática de los grupos en la prueba de tolerancia a piruvato. A) Curso temporal de las medias de glucosa plasmática en cada grupo (mg/dl \pm EEM). **B)** AUC de los niveles de glucosa plasmática de cada grupo \pm EEM.

a indica diferencia significativa vs. control normoglucémico (N) ($p < 0.05$). *b* indica diferencia significativa vs. control hiperglucémico más piruvato (HP) ($p < 0.05$). N, control normoglucémico; H, control hiperglucémico; NP, control normoglucémico más piruvato; HP, control hiperglucémico más piruvato; HPM, control hiperglucémico más piruvato tratado con metformina; HPSm, grupo experimental tratado con el extracto de *S. moranensis*; HPAp, grupo experimental tratado con el extracto de *A. petiolaris*.

El grupo control normoglucémico (N) no presentó cambios a lo largo del experimento, manteniéndose en un margen de 110 unidades de glucosa (**Tabla 8**); sin embargo, la inducción química de hiperglucemia produjo un aumento significativo de casi 100 unidades de glucosa que se mantuvo a lo largo del tiempo, como se observa en el grupo control hiperglucémico (H) (**Figura 17A**). Las dosis empleadas de STZ y NA provocaron una destrucción parcial de las células β , traduciendo a una falta de insulina que promovió la hiperglucemia observada en este grupo.

El segundo factor de modificación observado en la glucemia fue la alteración provocada por la inyección de piruvato, que siendo uno de los sustratos principales de la gluconeogénesis, promovió un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa que se observa tanto en organismos normoglucémicos (NP) como en hiperglucémicos (HP) (**Figura 17A**); no obstante, en comparación con el grupo normoglucémico, el grupo inducido no regresó a los niveles iniciales de glucosa, manteniendo una hiperglucemia promedio de 350 unidades sostenida en el tiempo que permitió la evaluación del efecto del fármaco control metformina y de los extractos (**Tabla 8**).

La administración intraperitoneal de piruvato al grupo control de ratas normoglucémicas (NP) ocasionó un aumento significativo de glucosa de alrededor de 50 unidades a los 30 minutos. Este valor fue disminuyendo en cada tiempo hasta regresar a niveles casi basales, aunque la diferencia significativa se mantuvo (**Tabla 8**). De forma global, el piruvato promovió un aumento de glucosa que no fue significativo si se comparan las áreas bajo la curva (AUC) entre los dos grupos normoglucémicos debido a los múltiples mecanismos de regulación ejercidos por la insulina; a saber, la inhibición de la gluconeogénesis y la captación periférica de glucosa (**Figura 17B**).

Contrariamente, el piruvato administrado al grupo de ratas inducidas con hiperglucemia (HP) elevó un promedio de 150 unidades de glucosa a los 30 minutos, manteniéndose durante las dos horas que duró la prueba (**Tabla 8**). De manera general, el área de este grupo fue dos veces más grande que el área del grupo control hiperglucémico administrado sólo con solución fisiológica (H) (**Figura 17B**).

Debido al ayuno inducido, la diferencia entre el comportamiento de la glucemia de los grupos control normoglucémico e hiperglucémico al administrar piruvato intraperitoneal radicó en el daño ocasionado a las células β , que produjo un pobre abastecimiento de insulina al hígado en el grupo químicamente inducido impidiendo la inhibición de la vía gluconeogénica, y por lo tanto, provocando una elevación significativa de glucosa. Este

aumento simula la continua producción de glucosa vista en pacientes diabéticos mediante la gluconeogénesis, por lo que el siguiente paso fue la evaluación del efecto de la metformina, que se sabe que disminuye los niveles de glucosa inhibiendo la producción hepática por esta vía.

El tratamiento con metformina administrado al grupo hiperglucémico (HPM) afectó los niveles de glucosa desde los primeros 30 minutos disminuyendo significativamente el pico hiperglucémico en un 66% comparado con el grupo hiperglucémico (HP) en ese tiempo (**Figura 18**). Posteriormente, esta disminución continuó en cada tiempo, observándose que los niveles de glucosa comenzaron a parecerse más a los observados en el grupo hiperglucémico (H), e incluso a los de los grupos normoglucémicos (N y NP) a los 120 minutos (**Tabla 8**). La efectividad de este tratamiento se comprueba con la disminución en un 41% del AUC comparado con el grupo control hiperglucémico (HP) (**Figura 17B**).

De acuerdo a estos resultados, la metformina tuvo dos efectos distintos en el comportamiento de la glucemia: la disminución del pico hiperglucémico a los 30 minutos, y un efecto hipoglucemiante sostenido que se observa en los demás tiempos (**Figura 17A**). Por otro lado, la administración de los extractos influyó en la disminución del pico hiperglucémico y en el mantenimiento de los niveles de glucosa, que siempre se encontraron por debajo de los presentados por el grupo hiperglucémico (HP) (**Figura 17A**).

El extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* modificó el pico hiperglucémico observado a los 30 minutos en un 21%, es decir, los niveles de glucosa aumentaron 117 unidades, comparados contra las 148 unidades que se observaron en el grupo hiperglucémico (HP) (**Figura 18**). Esta elevación se mantuvo en todos los tiempos sin presentar diferencia significativa contra el grupo control hiperglucémico (HP); sin embargo, al compararlo contra el grupo tratado con el extracto acuoso de *A. petiolaris*, los niveles de glucosa fueron significativamente distintos a los 30, 60 y 90 minutos del experimento (**Tabla 8**). El AUC de los niveles de glucosa presentado por este grupo disminuyó sólo un 9%, comparado contra su control hiperglucémico (HP) sin ser significativamente diferente (**Figura 17B**).

Por otro lado, el grupo experimental tratado con el extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris* disminuyó significativamente el pico hiperglucémico en un 30%, presentando una elevación de 104 unidades de glucosa a los 30 minutos (**Figura 18**). Esta diferencia significativa se mantuvo durante la siguiente hora (60 y 90 minutos) contra el control

hiperglucémico (HP); sin embargo, a pesar de las 40 unidades de glucosa de diferencia contra el control en ese tiempo, a los 120 minutos fue estadísticamente igual (**Tabla 8**). El AUC de los niveles de glucosa observado en este grupo experimental disminuyó un 13%, comparado contra el área del grupo control. Este porcentaje de disminución fue estadísticamente significativo (**Figura 17B**).

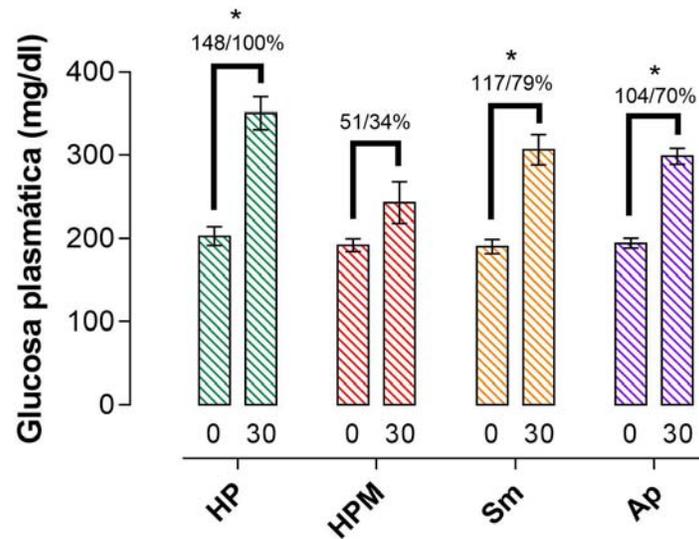


Figura 18. Reducción del pico hiperglucémico observado a los 30 minutos de la prueba de tolerancia a piruvato. Se muestra la comparación de los niveles de glucosa entre el tiempo cero y a los 30 minutos después del respectivo tratamiento con metformina y los extractos (unidades de glucosa/porcentaje). El porcentaje mostrado se tomó de acuerdo a la diferencia entre el tiempo cero y el tiempo 30 de HP. Las barras son representaciones de la media de los niveles de glucosa \pm EEM. La línea punteada indica el nivel inicial de glucosa.

Los asteriscos indican diferencia significativa entre tiempo cero y tiempo 30 de cada grupo (t de student, $p < 0.05$). HP, control hiperglucémico más piruvato; HPM, control hiperglucémico más piruvato tratado con metformina; HPSm, grupo experimental tratado con el extracto de *S. moranensis*; HPAp, grupo experimental tratado con el extracto de *A. petiolaris*.

3. Caracterización de la inhibición de la G6Pasa por los extractos mediante la obtención de las IC₅₀

Para obtener un parámetro para evaluar la inhibición directa de la G6Pasa se calculó la IC₅₀ de cada extracto, que nos indica a qué concentración de la muestra se obtiene la mitad de la actividad de la enzima, y en este caso, este valor es directamente proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico liberado en la reacción.

La curva concentración-respuesta obtenida del ácido clorogénico, que fue utilizado como control debido a que está bien caracterizado como inhibidor de la G6Pasa T1, se ajustó a una regresión lineal con una R² igual a 0.93 y una IC₅₀ de 63 µg/ml (**Figura 19**); inhibió el 100% de la actividad: su valor máximo de absorbancia fue 1.028 ± 0.189 y su mínimo fue -0.026 ± 0.022. En el análisis cualitativo de la prueba se observó un cambio gradual en la coloración azul que fue disminuyendo hasta obtener una coloración amarillenta (**Figura 20**).

Las curvas concentración-respuesta de los extractos de las plantas ajustaron a regresiones no lineales. Generalmente, las regresiones no lineales se definen por modelos logísticos que pueden ser de tres o cuatro parámetros, donde se considera el máximo y el mínimo de la respuesta de inhibición, así como la IC₅₀. El cuarto parámetro es la pendiente de Hill, definida como la pendiente de la parte recta de la curva sigmoidea; si la pendiente es igual a -1, entonces se hablará de un modelo de tres parámetros, mientras que un modelo de cuatro parámetros es aquel donde la pendiente será diferente de -1.

La curva del extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* ajustó a un modelo de tres parámetros con una R² igual a 0.87 y una IC₅₀ de 84 µg/ml (**Figura 19**). El valor máximo que tomó el programa estadístico para realizar la regresión fue 0.792 ± 0.045, mientras que el mínimo fue -0.004 ± 0.036, inhibiendo al 100% la actividad de la enzima. La coloración azul cambió gradualmente hasta obtener una coloración anaranjada-café (**Figura 20**).

Por otro lado, la curva del extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris* ajustó a un modelo de cuatro parámetros, donde la pendiente de Hill fue de -1.924, con una R² igual a 0.95 y una IC₅₀ de 223 µg/ml (**Figura 19**). Este extracto también inhibió el 100% de la actividad de la G6Pasa, con un valor mínimo asignado de 0.03 ± 0.03 y un valor máximo de 1.114 ± 0.033. La coloración final obtenida a 12 000 µg/ml del extracto fue verde (**Figura 20**).

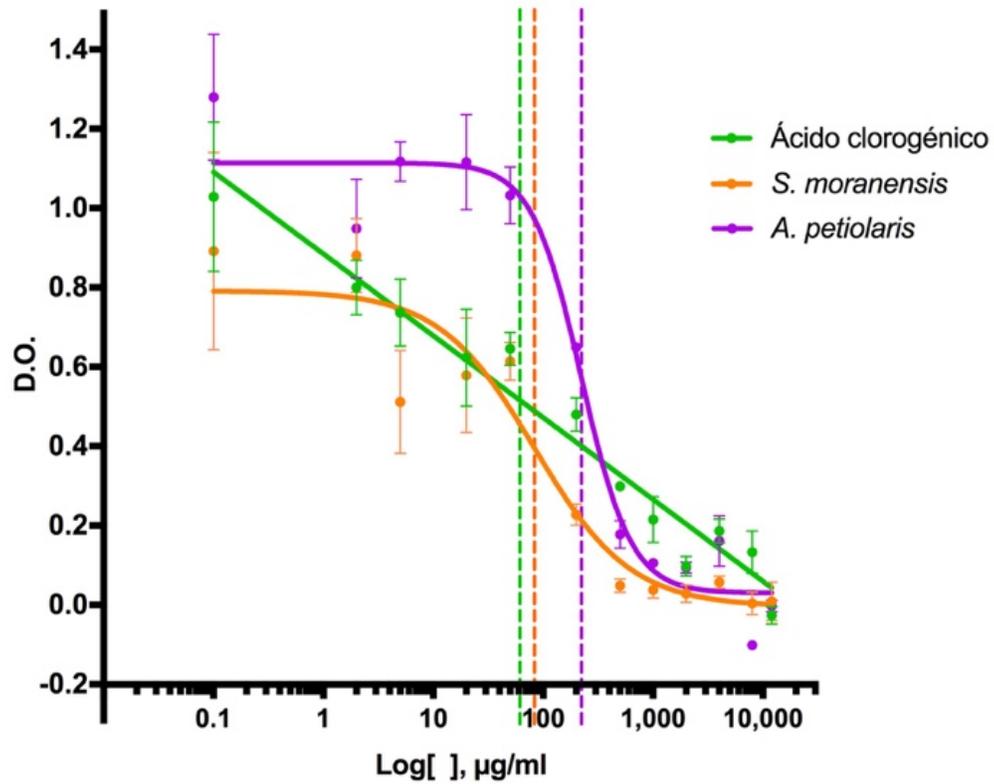


Figura 19. Curvas de inhibición concentración-respuesta de la actividad de la enzima G6Pasa.
A) Regresiones del ácido clorogénico (verde), extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* (naranja) y extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris* (morado) donde se representa la IC₅₀ relativa de cada uno (líneas punteadas). D.O., densidad óptica.

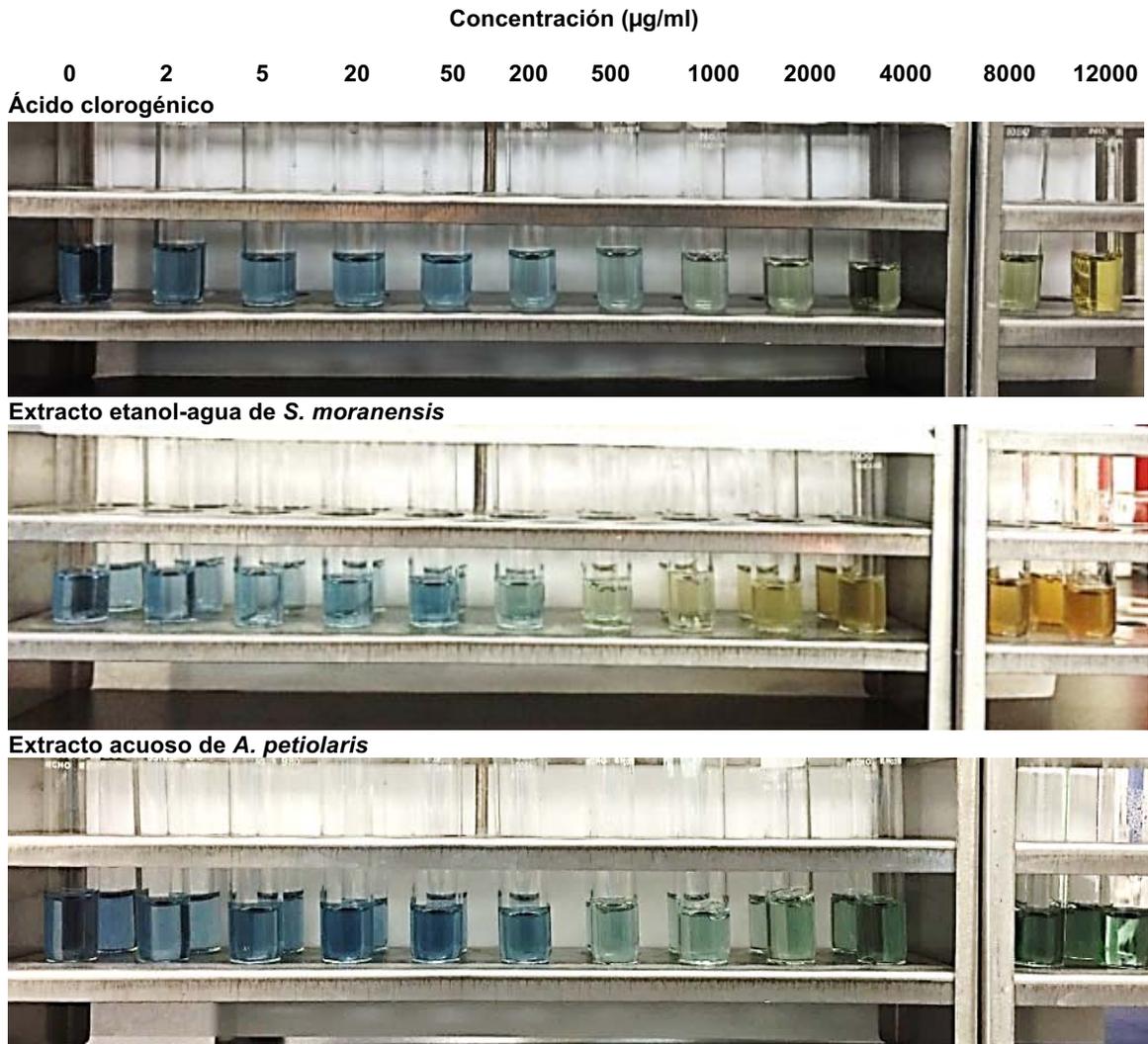


Figura 20. Inhibición colorimétrica de la actividad de la enzima G6Pasa. Coloración que indica la liberación de fosfato en los ensayos *in vitro* del ácido clorogénico y los extractos a las distintas concentraciones medidas por espectrofotometría a 830 nm.

DISCUSIÓN

Como ya se mencionó anteriormente, la inhibición de la producción de glucosa representa un excelente blanco terapéutico para el control de la glucemia en ayuno y en estado postprandial debido a las implicaciones que tiene en la fisiopatología de la DM2. El diseño experimental *in vivo* de este trabajo permitió la evaluación del efecto de los extractos sobre la vía gluconeogénica sometiendo a los organismos a un ayuno prologando de 18 h, por lo que las reservas de glucógeno se agotaron para dar paso a la producción hepática de glucosa *de novo*.

Los organismos utilizados en este proyecto fueron ratas hiperglucémicas con daño parcial en las células β , incapaces de regular adecuadamente alteraciones de los niveles de glucosa en torrente sanguíneo como la obtenida por la entrada de alimento al cuerpo, o bien, la producida a nivel hepático. Así, la glucosa plasmática de ratas en ayuno con una hiperglucemia casual mayor a 300 mg/dl se estableció en valores entre 160 a 230 mg/dl ocasionados por la gluconeogénesis debido a la ausencia de insulina.

Intrínsecamente, el modelo animal de hiperglucemia severa inducida por STZ-NA y la administración de piruvato tuvo una gran variación intragrupal en comparación con el propio modelo STZ-NA y los organismos sanos. Esta característica asociada a la variabilidad biológica de cada organismo se puede extrapolar a la variabilidad observada en una enfermedad, que en este caso es la DM. A pesar de esto, se logró observar que ambos extractos disminuyeron el pico hiperglucémico ocasionado por la administración del piruvato con una tendencia a controlar la glucemia durante las dos horas que duró el experimento (efecto antihiperglucemiante).

De manera general, tomando en cuenta el AUC de los grupos tratados, la metformina disminuyó la gluconeogénesis en un 41%, mientras que la disminución provocada por el extracto etanol-agua de *S. moranensis* fue sólo de un 9%, y el extracto acuoso de *A. petiolaris* suprimió significativamente la producción en un 13%. Este resultado se podría explicar debido a las dosis administradas, al contenido de cada tratamiento y a los posibles mecanismos de acción involucrados.

El grupo hiperglucémico tratado con metformina presentó dos comportamientos distintos en su glucemia al administrar el fármaco: la supresión del pico hiperglucémico observada a los 30 minutos, y la disminución continua de glucosa observada en los siguientes tiempos. El

primer efecto se debió a la inhibición de la gluconeogénesis, debido a que fue la vía que se encontraba activa al momento de administrar el fármaco. Funcionalmente, la metformina puede suprimir la gluconeogénesis por múltiples vías: inhibiendo indirectamente a sus enzimas reguladoras de manera transcripcional (PEPCK y G6Pasa) y alostérica (F1,6Pasa); bloqueando la producción de glucosa a partir del glicerol (inhibiendo a la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) y del lactato (aumentando la concentración de NADH, que es desfavorable para la conversión de lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa) (Madiraju et al., 2014).

El segundo comportamiento de la glucemia observado en el grupo tratado con metformina fue el efecto hipoglucemiante que se pudo deber al aumento en la sensibilidad a la insulina, ya que otras de las funciones de este fármaco son inhibir la lipogénesis en hígado y tejido adiposo, y aumentar la captación periférica de glucosa (Cheng & Fantus, 2005; Soto, Iglesias, Buño, & Bellido, 2008).

La suma del funcionamiento de estos mecanismos, así como la dosis administrada del compuesto aislado, pudieron influir en la drástica disminución de la glucemia de las ratas hiperglucémicas administradas con piruvato. Por otro lado, los extractos son una mezcla de compuestos que pueden encontrarse en distintas cantidades, por lo que las dosis tradicionales pudieron no haber sido suficientes para disminuir en mayor medida la gluconeogénesis. Sin embargo, se presentó una tendencia a mantener la glucemia a lo largo de las pruebas de tolerancia a piruvato que puede ser atribuida al efecto continuo de inhibir la gluconeogénesis hepática.

El mayor efecto de los extractos de ambas plantas observado *in vivo*, administrados a las dosis empleadas, fue a los 30 minutos, sin embargo, el extracto acuoso de *A. petiolaris* fue el que mejor repercusión tuvo en la glucemia al disminuir significativamente los niveles de glucosa en los tiempos 30, 60 y 90. De acuerdo a los antecedentes de *A. petiolaris*, uno de los potenciales mecanismos involucrados en la disminución del pico hiperglucémico es la inhibición directa de la G6Pasa T1 debido a la presencia de ácido clorogénico. Este compuesto fue utilizado como control comparativo para evaluar la inhibición de los extractos de las plantas *in vitro* sobre dicha enzima.

En comparación con el ácido clorogénico, los extractos de las plantas resultaron igualmente eficaces debido a que inhibieron en un 100% la actividad de la G6Pasa; sin embargo, no se puede asegurar a qué componente del complejo enzimático inhibieron: al T1 o a la parte catalítica de la enzima, por lo que se sugiere que en futuros experimentos se mida la integridad de los microsomas obtenidos con la finalidad de observar si los extractos afectan o no la liberación de fosfato.

A pesar de que el extracto acuoso de *A. petiolaris* disminuyó significativamente el pico hiperglucémico, el mecanismo principal por el cual suprime la producción de glucosa podría no estar relacionado a la inhibición directa de la G6Pasa, ya que, a diferencia del extracto etanol-agua de *S. moranensis*, inhibió con menor potencia a dicho complejo enzimático. Se sugiere que en investigaciones futuras se describa el mecanismo de acción del extracto acuoso de *A. petiolaris* por el cual inhibe la gluconeogénesis, que podrían ser la inhibición directa de alguna otra enzima reguladora o la inhibición transcripcional de alguna de ellas. También, podría ser que limite la disponibilidad de los precursores que funcionan como sustratos gluconeogénicos como el lactato, el glicerol o la alanina.

A diferencia de los resultados observados *in vivo*, el extracto etanol-agua de *S. moranensis* resultó ser más potente que el extracto acuoso de *A. petiolaris*, es decir, es necesaria una menor concentración de extracto para alcanzar el 100% de la inhibición. Esta discrepancia en los resultados se puede deber a la farmacocinética del extracto etanol-agua de *S. moranensis*, ya que el contenido del o los compuestos involucrados en la inhibición de la G6Pasa administrados a la dosis de 80 mg/kg pudo no ser suficiente o tener una biodisponibilidad limitada para llegar al sitio de acción.

Se ha determinado por técnicas cromatográficas que los principales componentes del extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* son flavonoides (Andrade-Cetto, 2011a). Estos metabolitos secundarios han demostrado tener una amplia gama de efectos terapéuticos relacionados al control de la DM2, ya que han sido descritos como secretagogos y sensibilizadores de insulina, potenciadores de incretinas, moduladores de la absorción de carbohidratos a nivel intestinal y, además, participan en la regulación del metabolismo y el transporte de carbohidratos (Unnikrishnan, Veerapur, Nayak, Mudgal, & Mathew, 2014).

A pesar de que los flavonoides y sus metabolitos son compuestos altamente bioactivos con múltiples mecanismos de acción, su biodisponibilidad es baja debido a su carácter hidrofílico que disminuye su permeabilidad, por lo tanto presentan una pobre absorción a nivel intestinal (Ziberna, Fornasaro, Čvorović, Tramer, & Passamonti, 2014). Por lo anterior, al administrar oralmente la dosis tradicional del extracto, no se observó una disminución significativa del pico hiperglucémico, a pesar de que en el ensayo *in vitro* demostró tener un efecto inhibitorio potente sobre la G6Pasa.

Con la finalidad de evitar el paso de absorción, se sugiere probar el extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* por otras vías de administración, elaborar curvas dosis-respuesta para establecer una dosis aumentada que permita la visualización de una disminución en el pico hiperglucémico más evidente y, además, dilucidar los metabolitos secundarios involucrados en su efecto hipoglucemiante.

El efecto hipoglucemiante de los extractos de las plantas es la suma de distintos mecanismos de acción debido a la diversidad en el contenido de metabolitos secundarios, y la potencia y eficacia del efecto observado depende de la cantidad de dichos metabolitos presentes en los extractos. Los experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* de este proyecto sugirieron que uno de los mecanismos implicados en el efecto hipoglucemiante de los extractos de *S. moranensis* y *A. petiolaris* es la inhibición de la gluconeogénesis, por lo que la regulación de esta vía está implicada en el control de los niveles de glucosa plasmática de pacientes que consumen tradicionalmente dichas plantas como “agua de uso”.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La Etnofarmacología tiene como principal objetivo describir los efectos terapéuticos de los principios activos aislados de los productos naturales utilizados en la medicina tradicional, por lo que representa un buen enfoque para el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de los usos que la gente pueda darle a las plantas en una comunidad para cierta enfermedad.

En la presente investigación, se evaluó el efecto de los extractos de dos plantas con actividad hipoglucemiante identificadas mediante un enfoque etnofarmacológico para tratar la DM sobre la gluconeogénesis hepática utilizando un modelo animal de hiperglucemia inducida con STZ-NA en ratas Wistar, al que se le administró piruvato intraperitoneal.

Ambos extractos disminuyeron el pico hiperglucémico observado a los 30 minutos de las pruebas de tolerancia a piruvato y presentaron un efecto antihiperglucemiante al mostrar una tendencia a controlar los niveles de glucosa plasmática. El extracto acuoso de *A. petiolaris* presentó diferencia significativa a los 30 minutos, manteniéndose durante la siguiente hora del experimento. En los ensayos *in vitro*, se observó que ambas plantas inhibieron el complejo enzimático de la G6Pasa, una de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis. El extracto etanol-agua de *S. moranensis* resultó ser el más potente, al inhibir el complejo a una menor concentración de extracto.

De acuerdo a estos resultados, ambas plantas deben ser consideradas para estudios posteriores que permitan dilucidar con mayor detalle su repercusión sobre la regulación de la producción hepática de glucosa y/u otros mecanismos de acción, ya que representan una fuente prometedora de principios activos para tratar la DM que va incrementando su incidencia de manera alarmante en el mundo.

Las perspectivas de este proyecto son buscar otros blancos farmacológicos del extracto acuoso de la parte aérea de *A. petiolaris* relacionados a la producción hepática de glucosa que permitan explicar el efecto antihiperglucemiante observado en las pruebas de tolerancia a piruvato; probar el extracto etanol-agua de la raíz de *S. moranensis* por otras vías de administración para evitar el paso de absorción, o bien, considerar un mayor tiempo entre la administración del extracto y la inyección de piruvato para permitir una mejor absorción.

LITERATURA CITADA

- Alarcon-Aguilar, F. ., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. ., & Flores-Saenz, J. . (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 101–110. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00020-8](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00020-8)
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37 Suppl 1(Supplement_1), S81-90.
- American Diabetes Association. (2016). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 39(Supplement 1), S13–S22. <http://doi.org/10.2337/dc16-S005>
- Ames, B. N. (1966). Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. En E. Neufeld, V. Ginsburg, N. Kaplan, & N. Colowick (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 8, pp. 115–118). New York: Elsevier Inc.
- Andrade-Cetto, A. (2011a). Hypoglycemic effect of *Smilax moranensis* root on N5-STZ diabetic rats. *PharmacologyOnline*, 1, 111–115.
- Andrade-Cetto, A. (2011b). Inhibition of gluconeogenesis by *Malmea depressa* root. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 930–933. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.028>
- Andrade-Cetto, A. (2012). Effects of medicinal plant extracts on gluconeogenesis. *Botanics: Targets and Therapy*, 2, 1–6.
- Andrade-Cetto, A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 93–7.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 99(3), 325–48.
- Arias-Chávez, D. J. (2014). *Estudio crónico del efecto hipoglucemiante de la raíz de Smilax moranensis (Martens & Galeotti) en ratas diabéticas STZ-NA*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arion, J., Canfield, W., Ramos, F., Schindler, P., Burger, H.-J., Hemmerle, H., ... Herling, A. (1997). Chlorogenic Acid and Hydroxynitrobenzaldehyde: New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 315–322.
- Arion, W. J. (1989). Measurement of intactness of rat liver endoplasmic reticulum. En S. Fleischer, B. Fleischer, J. Abelson, & M. Simon (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 174, pp. 58–67). Elsevier Inc.
- Arion, W. J., Ballas, L. M., Lange, A. J., & Wallin, B. K. (1976). Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with D-mannose 6-phosphate and D-mannose. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 4891–4897.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183–190. <http://doi.org/10.2337/diaspect.17.3.183>
- Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., & Mohammadi, T. (2014). Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pac J Trop Dis*, 4(2), 687–692. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60708-8](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60708-8)

- Bano, G. (2013). Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 27(5), 715–26. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.02.007>
- Barthel, A., & Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285(4), E685-92. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00253.2003>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009a). Alambrillo. Recuperado 1 de marzo de 2016, a partir de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7192>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009b). Hierba del ángel o yolochíchitl. Recuperado 4 de marzo de 2016, a partir de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Eupatorium petiolare&id=7680>
- Bustos-Brito, C., Andrade-Cetto, A., Giraldo-Aguirre, J. D., Moreno-Vargas, A. D., & Quijano, L. (2016). Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *Journal of Ethnopharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.048>
- Castillo, Q. A., Triana, J., Eiroa, J. L., Calcul, L., Rivera, E., Wojtas, L., ... Germosén, E. A. (2016). Ent-Labdane Diterpenoids from the Aerial Parts of *Eupatorium obtusissimum*. *Journal of Natural Products*, 79(4), 907–913. <http://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00954>
- Cersosimo, E., Triplitt, C., Mandarino, L. J., & DeFronzo, R. A. (2015). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. En L. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. Hershman, ... M. Weickert (Eds.), *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>
- Challinor, V. L., Parsons, P. G., Chap, S., White, E. F., Blanchfield, J. T., Lehmann, R. P., & De Voss, J. J. (2012). Steroidal saponins from the roots of *Smilax* sp.: Structure and bioactivity. *Steroids*, 77(5), 504–511. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.01.009>
- Charkoudian, L. K., Farrell, B. P., & Khosla, C. (2012). Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase. *MedChemComm*, 3, 926. <http://doi.org/10.1039/c2md20008b>
- Cheng, A. Y. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 172(2), 213–26. <http://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>
- Cirilo, B. G. (2003). *Determinación bioquímica, reductora ponderal y supresora de apetito de Smilax moranensis Martens & Galeotti y Centaurium quitense (Kunth) B.L.: Robinson*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado a partir de <http://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/16102>
- CONABIO. (2015a). *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King H. Rob., 1970 válido. Recuperado 4 de marzo de 2016, a partir de <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6047586>
- CONABIO. (2015b). *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti, 1842 válido. Recuperado 1 de marzo de 2016, a partir de <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6025000>

- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–22. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Ensanut. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M. A., Saavedra-Molina, A., & Salgado-Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45–52.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
- Fukunaga, T., Miura, T., Furuta, K., & Kato, A. (1997). Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Smilax glabra* in normal and diabetic mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 20(1), 44–6. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013805>
- García-González, M., Díaz, C., & Villalobos, R. (2008). Estudio toxicológico y farmacológico de los extractos hidroalcohólicos de algunas especies de *Smilax* de Centroamérica. *Revista de Fitoterapia*, 8(1), 49–57.
- Guan, H.-P., & Chen, G. (2014). Factors affecting insulin-regulated hepatic gene expression. *Progress in molecular biology and translational science*, 121, 165–215. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800101-1.00006-5>
- Gunn, J., Che, C. T., & Farnsworth, N. (2013). *Diabetes and Natural Products. Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00042-1>
- Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). Gluconeogenesis. En *Metabolism Vitamins and Hormones* (pp. 381–386). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00040-2>
- Hardie, D. G. (2013). Metformin-acting through cyclic AMP as well as AMP? *Cell metabolism*, 17(3), 313–4. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.011>
- Heinrich, M., & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(4), 425–32. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11341358>
- Hemmerle, H., Burger, H. J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P. W., ... Herling, A. W. (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal of medicinal chemistry*, 40(2), 137–45. <http://doi.org/10.1021/jm9607360>
- Holmes, H. N., Robinson, J., & Tscheschlog, B. (Eds.). (2007). *Diabetes mellitus. A Guide to Patient Care* (1ª ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- International Diabetes Federation. (2015). *Diabetes Atlas* (7ª ed.). International Diabetes Federation.
- Isea, J., Vilorio, J. L., Ponte, C. I., & Gómez, J. R. (2012). Complicaciones macrovasculares de la diabetes mellitus: cardíacas, vasculocerebrales y enfermedad arterial periférica. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 10, 96–110.

- Jarald, E., Joshi, S. B., & Jain, D. C. (2008). Diabetes and herbal medicines. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 7(1), 97–106.
- Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), 33–45. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.001>
- Lim, C. T., Kola, B., & Korbonits, M. (2010). AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of molecular endocrinology*, 44(2), 87–97. <http://doi.org/10.1677/JME-09-0063>
- Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D. T., Albright, R. A., ... Shulman, G. I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510(7506), 542–6. <http://doi.org/10.1038/nature13270>
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-buys, D., ... Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes*, 47(February 1998), 224–229.
- McClenaghan, N. H., & Flatt, P. R. (2015). Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon. En A. W. Norman & H. L. Henry (Eds.), *Hormones* (3^a ed., pp. 109–139). China: Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-091906-5.00006-9>
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. <http://doi.org/10.1155/2013/801457>
- Mlinar, B., Marc, J., Janez, A., & Pfeifer, M. (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 375(1–2), 20–35. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.005>
- Nordlie, R. C., & Arion, W. J. (1966). Glucose-6-phosphate. En W. Wood, N. Kaplan, & N. Colowick (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 9, pp. 619–625). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)09125-0](http://doi.org/10.1016/0076-6879(66)09125-0)
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition*, 379–406. <http://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.379>
- Nuttall, F., Ngo, A., & Gannon, M. (2008). Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 24, 438–458. <http://doi.org/10.1002/dmrr>
- Olivares, J., & Arellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Prabhakar, P., & Doble, M. (2008). A Target Based Therapeutic Approach Towards Diabetes Mellitus Using Medicinal Plants. *Current Diabetes Reviews*, 4(4), 291–308. <http://doi.org/10.2174/157339908786241124>
- Quijano, L., Calderón, J. S., Gómez, F., Garduño, J. T., & Ríos, T. C. (1980). Deltoidin A and B, two new germacrolides from *Eupatorium deltoideum*. *Phytochemistry*, 19(9), 1975–1977. [http://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)83016-0](http://doi.org/10.1016/0031-9422(80)83016-0)
- Rojó, A., & Rodríguez, J. (2002). *La flora del Pedregal de San Ángel* (1^a ed.). México: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).

- Rzedowski, J., & Calderon, G. (1994). Smilacaceae. En J. Rzedowski & G. Calderon (Eds.), *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* (pp. 1–23). Pátzcuaro: Instituto de Ecología, A.C. Recuperado a partir de [http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora 26.pdf](http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2026.pdf)
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*, 799–806.
- Sang, H. Q., Gu, J. F., Yuan, J. R., Zhang, M. H., Jia, X. Bin, & Feng, L. (2014). The protective effect of smilax glabra extract on advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction in HUVECs via RAGE-ERK1/2-NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, *155*(1), 785–795. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.028>
- Sharabi, K., Tavares, C. D. J., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects of Medicine*, *46*, 21–33. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
- Soto, a., Iglesias, M. J., Buño, M., & Bellido, D. (2008). Metformina. *Endocrinología y Nutrición*, *55*(Supl 2), 39–52. [http://doi.org/10.1016/S1575-0922\(08\)76262-4](http://doi.org/10.1016/S1575-0922(08)76262-4)
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, *365*, 1333–46. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)
- Surya, S., Salam, A. D., Tomy, D. V., Carla, B., Kumar, R. A., & Sunil, C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants—a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(5), 337–347. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60585-5](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60585-5)
- Tamayo-Castillo, G., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Rojas, A., Castro, V., & King, R. M. M. (1988). Germacranolides and other constituents from *Ageratina* species. *Phytochemistry*, *27*(9), 2893–2897. [http://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80683-6](http://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80683-6)
- The Plant List. (2013a). *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M.King & H.Rob. Recuperado 4 de marzo de 2016, a partir de <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-94043>
- The Plant List. (2013b). *Smilax moranensis* M.Martens & Galeotti. Recuperado 1 de marzo de 2016, a partir de <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-289346>
- Triplitt, C. L. (2012). Examining the mechanisms of glucose regulation. *The American Journal of Managed Care*, *18*(1 Suppl), S4-10. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559855>
- Tropicos. (2016a). *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob. Recuperado 10 de marzo de 2016, a partir de <http://www.tropicos.org/Name/2712305>
- Tropicos. (2016b). *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti. Recuperado 3 de marzo de 2016, a partir de <http://www.tropicos.org/Name/18400926>
- Unnikrishnan, M. K., Veerapur, V., Nayak, Y., Mudgal, P. P., & Mathew, G. (2014). Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids. En *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 143–161). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00013-X>
- van Poelje, P. D., Dang, Q., & Erion, M. D. (2007). Fructose-1,6-bisphosphatase as a therapeutic target for type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, *4*(2), 103–109. <http://doi.org/10.1016/j.ddstr.2007.10.003>

- van Schaftingen, E., & Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *The Biochemical journal*, 362(Pt 3), 513–32. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Viollet, B., & Foretz, M. (2013). Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Annales d'Endocrinologie*, 74(2), 123–129. <http://doi.org/10.1016/j.ando.2013.03.006>
- Viollet, B., Lantier, L., Devin-leclerc, J., Hébrard, S., Mounier, R., Foretz, M., & Andreelli, F. (2009). Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*, 14(1), 3380–3400.
- Vlietinck, A., Pieters, L., & Apers, S. (2009). Legal Requirements for the Quality of Herbal Substances and Herbal Preparations for the Manufacturing of Herbal Medicinal Products in the European Union. *Planta Medica*, 75(7), 683–688. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1185307>
- Weller, S. A. (2010). *Plantas de la Reserva de la Biósfera Tehuacán – Cuicatlán Vol. I: Especies de Puebla* (Vol. I). México: Peace Corps.
- Winter, W. E., & Signorino, M. R. (2002). *Diabetes mellitus: pathophysiology, etiologies, complications, management, and laboratory evaluation: special topics in diagnostic testing*. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry, Inc.
- Wu, C., Okar, D. A., Kang, J., & Lange, A. J. (2005). Reduction of Hepatic Glucose Production as a Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes. *Current Drug Targets -Immune Endocrine & Metabolic Disorders*, 5, 51–59.
- Zhao, F.-Q., & Keating, A. F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current genomics*, 8(2), 113–28. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ziberna, L., Fornasaro, S., Čvorović, J., Tramer, F., & Passamonti, S. (2014). Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. En *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 489–511). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00037-2>