



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

**EFFECTO DE TRES PLANTAS MEDICINALES SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA
INSULINA Y LA ACTIVIDAD DE DOS ENZIMAS REGULADORAS DE LA
GLUCONEOGÉNESIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GERARDO MATA TORRES VALLE

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

COMITÉ TUTOR: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO, 2023.



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.



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

**EFFECTO DE TRES PLANTAS MEDICINALES SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA
INSULINA Y LA ACTIVIDAD DE DOS ENZIMAS REGULADORAS DE LA
GLUCONEOGÉNESIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GERARDO MATA TORRES VALLE

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

COMITÉ TUTOR: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO, 2023.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/196/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **7 de noviembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **MATA TORRES VALLE GERARDO** con número de cuenta **306221547** con la tesis titulada: **"Efecto de tres plantas medicinales sobre la sensibilidad a la insulina y la actividad de dos enzimas reguladoras de la gluconeogénesis"**, realizada bajo la dirección del **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**
Vocal: **DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO**
Vocal: **DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ**
Vocal: **DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR**
Secretario: **DR. RÉNE DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de abril de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme a través de sus actividades.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) por su apoyo para la realización de todo el trabajo que culminó en esta tesis (proyecto no. IN213222).

A mi tutor, el Dr. Adolfo Andrade Cetto, por asesorarme a lo largo de todo este trabajo, ayudarme a comprender conceptos importantes para alguien que aspira a ser un investigador y mejorar mi visión del trabajo experimental en el laboratorio.

A la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor y al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, que conformaron mi comité tutor, los cuales me asesoraron a lo largo de estos años de mi doctorado, sus comentarios enriquecieron demasiado la investigación realizada.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA Y GLUCONEOGÉNESIS	7
<i>Gluconeogénesis</i>	9
<i>Fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa)</i>	11
<i>Glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa)</i>	11
DIABETES MELLITUS TIPO 2	12
<i>Epidemiología</i>	13
<i>Diagnóstico</i>	13
FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2	15
DESBALANCE EN LA PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA POR RESISTENCIA A LA INSULINA	17
LA METFORMINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO	19
MODELOS ANIMALES DE DIABETES MELLITUS	22
<i>Modelo estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA)</i>	22
PLANTAS MEDICINALES ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2	24
<i>Ageratina petiolaris</i>	25
<i>Cecropia obtusifolia</i>	27
<i>Equisetum myriochaetum</i>	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
OBJETIVOS.....	35
HIPÓTESIS.....	36
METODOLOGÍA.....	37
OBTENCIÓN DE PLANTAS Y ELABORACIÓN DE EXTRACTOS.....	37
ANIMALES EXPERIMENTALES	37
INDUCCIÓN DE HIPERGLUCEMIA (MODELO ESTREPTOZOTOCINA-NICOTINAMIDA (STZ-NA))	37
PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO.....	38
AISLAMIENTO DE MICROSOMAS HEPÁTICOS Y FRACCIÓN CITOSÓLICA PARA ENSAYOS ENZIMÁTICOS <i>IN VITRO</i>	40
ENSAYO ENZIMÁTICO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA (G-6-PASA)	40
ENSAYO ENZIMÁTICO DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (F-1,6-BISPASA)	41
EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA	41
DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES SOBRE SENSIBILIDAD A LA INSULINA	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
RESULTADOS	45
PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO.....	45

ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE G-6-PASA	47
ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE F-1,6-BISPASA	47
ÉVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA	49
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO PARA OBTENCIÓN DE GRADO	75

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA-carboxilasa
Akt	Proteína cinasa B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CRTC2	Coactivador transcripcional regulado por CREB 2
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
F-1,6-BisPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
F-1,6-BisP	Fructosa-1,6-bisfosfato
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
GLUT2	Glucotransportador isoforma 2
GLUT4	Glucotransportador isoforma 4
HOMA-IR	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IL-6	Interleucina 6
IRS	Sustratos del receptor de insulina
NA	Nicotinamida
NAD ⁺	Nicotina adenina dinucleótido (forma oxidada)
OCT1	Transportador de cationes orgánicos 1
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
PARP-1	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa 1
PC	Piruvato carboxilasa
PKC	Proteína cinasa C
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PHG	Producción hepática de glucosa
PI2P	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PI3P	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
QUICKI	Índice cuantitativo de verificación de sensibilidad a la insulina
RI	Resistencia a la insulina
STZ	Estreptozotocina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE DIABETES MELLITUS.	14
TABLA 2. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO.	39
TABLA 3. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS CORRESPONDIENTES DEL EXPERIMENTO CRÓNICO PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES EFECTOS DE LA INSULINA EN HÍGADO, MÚSCULO ESQUELÉTICO Y TEJIDO ADIPOSO. CREACIÓN PROPIA EN “MIND THE GRAPH”.	8
FIGURA 2. ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES REACCIONES DE LA GLUCONEOGÉNESIS.	10
FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL FÁRMACO METFORMINA EN HÍGADO.	21
FIGURA 4. CLASIFICACIÓN TAXÓNOMICA Y EJEMPLAR DE <i>A. PETIOLARIS</i>	25
FIGURA 5. COMPUESTOS AISLADOS DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>A. PETIOLARIS</i>	26
FIGURA 6. CLASIFICACIÓN TAXÓNOMICA Y FOTOGRAFÍA DE <i>C. OBTUSIFOLIA</i>	27
FIGURA 7. COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE <i>C. OBTUSIFOLIA</i>	28
FIGURA 8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y EJEMPLAR DE <i>E. MYRIOCHAETUM</i>	30
FIGURA 9. ESTRUCTURA DE KAMFEROL-3-O-SOFORÓSIDO, AISLADO DEL EXTRACTO DE <i>E. MYRIOCHAETUM</i>	31
FIGURA 10. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LAS PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO.	39
FIGURA 11. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE MICROSOMAS HEPÁTICOS Y SOBRENADANTE POST-MITOCONDRIAL.	40
FIGURA 12. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO CRÓNICO.	43
FIGURA 13. COMPORTAMIENTO DE GLUCOSA PLASMÁTICA EN LAS PRUEBAS DE TOLERANCIA A PIRUVATO.	45
FIGURA 14. PORCENTAJE DE AUMENTO T0 VS T30 EN PRUEBA DE TOLERANCIA A PIRUVATO.	46
FIGURA 15. CURVAS DE INHIBICIÓN CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE G-6-PASA CON ÁCIDO CLOROGÉNICO Y EXTRACTO DE <i>E. MYRIOCHAETUM</i>	47
FIGURA 16. CURVAS DE INHIBICIÓN CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE F-1,6-BIS-PASA CON AMP, EXTRACTO DE <i>A. PETIOLARIS</i> , EXTRACTO DE <i>C. OBTUSIFOLIA</i> Y EXTRACTO DE <i>E. MYRIOCHAETUM</i>	48
FIGURA 17. COMPORTAMIENTO DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA A LO LARGO DE LOS 42 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN.	49
FIGURA 18. NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS A LO LARGO DE LOS 42 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN.	50
FIGURA 19. COMPORTAMIENTO DE LA GLUCOSA PLASMÁTICA EN LAS PTGO AL FINALIZAR LOS TRATAMIENTOS.	51
FIGURA 20. VALORES DE INSULINA, GLUCOSA, HOMA-IR Y QUICKI.	52

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) a causa de una falla en la utilización de la glucosa (resistencia a la insulina). Particularmente en América, México es uno de los países con un mayor número de personas que viven con esta enfermedad. El tratamiento farmacológico cuenta con una amplia gama de medicamentos que abordan una característica puntual de la enfermedad; sin embargo, ningún fármaco ofrece un control 100% efectivo. Por otro lado, en comunidades rurales de países en vías de desarrollo, como México, el acceso a los medicamentos es limitado.

Las plantas son ampliamente utilizadas en México para el tratamiento de diversas enfermedades, como la diabetes mellitus tipo 2. El conocimiento de cómo se utilizan las plantas medicinales se va transmitiendo entre las generaciones, de modo que se tiene un uso tradicional de las mismas. En el caso específico del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, las personas toman infusiones de la planta a lo largo del día, es decir, las beben como “agua de uso”. Desde el punto de vista etnofarmacológico, esta forma de consumo nos podría indicar el proceso fisiológico sobre el que actúan para disminuir la hiperglucemia. Dado que una elevada producción hepática de glucosa, producto de la resistencia a la insulina, se encuentra promoviendo niveles altos de este monosacárido en sangre a lo largo del día en una persona con diabetes, las infusiones consumidas como “agua de uso” podrían ejercer su efecto terapéutico inhibiendo esta vía.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los extractos acuosos de tres plantas medicinales mexicanas con efecto hipoglucemiante agudo previamente reportado, *Ageratina petiolaris*, *Cecropia obtusifolia* y *Equisetum myriochaetum*, sobre la producción hepática de glucosa, específicamente la gluconeogénesis hepática, así como su efecto sobre la resistencia a la insulina.

En primer lugar, se evaluó el efecto del extracto acuoso de *E. myriochaetum* sobre la gluconeogénesis, dado que esta planta no tenía antecedentes sobre este mecanismo de acción. Para abordar este primer objetivo, se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato en ratas hiperglucémicas STZ-NA, así como ensayos de inhibición concentración-respuesta sobre la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa, una de las enzimas reguladoras de la producción hepática de glucosa. Los resultados indicaron que *E. myriochaetum* presentó un efecto antihiperglucemiante significativo en las pruebas *in vivo* y una $IC_{50} = 335 \mu\text{g/ml}$ *in vitro*. En segundo lugar, se analizó el efecto de las tres plantas sobre la actividad de otra enzima gluconeogénica, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, obteniéndose valores de IC_{50} de $41 \mu\text{g/ml}$ (*A. petiolaris*), $238 \mu\text{g/ml}$ (*C. obtusifolia*) y $64 \mu\text{g/ml}$ (*E. myriochaetum*).

Por último, se evaluó el efecto de las tres plantas sobre la sensibilidad a la insulina. Tras la administración crónica de los extractos de *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum* a ratas hiperglucémicas STZ-NA durante 42 días, se observó un efecto hipoglucemiante significativo que se mantuvo hasta los 28 días por parte de los tres extractos, al compararlos contra el grupo hiperglucémico. Por otro lado, al finalizar el periodo experimental, las tres plantas tendieron a mejorar la tolerancia a la glucosa y a disminuir tanto la concentración plasmática de insulina y el índice HOMA-IR, al compararlo contra el grupo control. Sin embargo, *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* mostraron un mejor efecto al alcanzar la significancia estadística en el índice HOMA-IR. Adicionalmente, las tres plantas evitaron el aumento en los niveles de triglicéridos desde los 21 días de su administración en las ratas hiperglucémicas.

En conclusión, las tres plantas mostraron un efecto inhibitorio sobre la producción hepática de glucosa al inhibir a las enzimas glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa. Sin embargo, sólo *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* disminuyeron significativamente la resistencia a la insulina. Por lo tanto, es necesario que, en futuros trabajos, se investigue el mecanismo específico por el cual estas plantas mejoran la función de la insulina a largo plazo.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a disease with a high prevalence worldwide characterized by high glucose levels in the blood (hyperglycemia) due to a failure in the utilization of glucose (insulin resistance). Particularly in America, Mexico is one of the countries with the largest number of people living with this disease. Pharmacological treatment includes a large arsenal of medications that address a specific characteristic of the disease; however, no drug offers 100% effective control. On the other hand, in rural communities of developing countries, such as Mexico, access to medicines is limited.

The plants are widely used in Mexico for the treatment of various diseases, such as type 2 diabetes mellitus. The knowledge of how medicinal plants are used is transmitted between generations, namely they are traditionally used. In the specific case of the treatment of type 2 diabetes mellitus, people take infusions of the plant throughout the day, that is, they drink them as "agua de uso". From the ethnopharmacological point of view, this form of consumption could indicate the physiological process on which they act to reduce hyperglycemia. Because of high rates of hepatic glucose production, product of insulin resistance, are releasing elevated levels of this monosaccharide in the blood throughout the day in a person with diabetes, the infusions consumed as "agua de uso" could exert their therapeutic effect by inhibiting this pathway.

Considering the above, the objective of the present work was to evaluate the effect of the aqueous extracts of three Mexican hypoglycemic plants, *Ageratina petiolaris*, *Cecropia obtusifolia* and *Equisetum myriochaetum*, on hepatic glucose production, specifically hepatic gluconeogenesis, as well as insulin resistance.

First, the effect of the aqueous extract of *E. myriochaetum* on gluconeogenesis was evaluated since this plant has no previous reports related to this mechanism of action. To assess this objective, pyruvate tolerance tests were carried out in STZ-NA hyperglycemic rats, as well as concentration-response enzyme inhibition assays

on the activity of glucose-6-phosphatase, one of the main enzymes that regulate hepatic glucose production. The results indicated that *E. myriochaetum* exhibited a significant antihyperglycemic effect in *in vivo* tests and an $IC_{50} = 335 \mu\text{g/ml}$ *in vitro*. Second, the effect of the of the three plant extracts on the enzymatic activity fructose-1,6-bisphosphatase, another gluconeogenic enzyme, was also evaluated, obtaining the following IC_{50} values: *A. petiolaris* = $41 \mu\text{g/ml}$, *C. obtusifolia* = $238 \mu\text{g/ml}$ and *E. myriochaetum* = $64 \mu\text{g/ml}$.

Finally, the effect of the three plants on insulin sensitivity was assessed. After chronic administration of the extracts to STZ-NA hyperglycemic rats for 42 days, a significant hypoglycemic effect was observed. This effect was maintained up to 28 days by the three extracts when comparing fasting plasma glucose levels of the experimental groups versus the hyperglycemic group. On the other hand, at the end of the experimental period, the three plants tended to improve glucose tolerance and decrease both plasma insulin concentration and the HOMA-IR index when compared to the control group. However, *A. petiolaris* and *C. obtusifolia* showed a better effect, reaching statistical significance in the HOMA-IR index. Additionally, the three plants prevented the increase in triglyceride levels from 21 days after administration in hyperglycemic rats.

In conclusion, the three plants showed an inhibitory effect on hepatic glucose production by inhibiting the enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase, which are step-limiting enzymes of the gluconeogenic pathway. Nevertheless, only *A. petiolaris* and *C. obtusifolia* significantly decreased insulin resistance. It is suggested that future works should focus on the specific mechanism by which these plants improve long-term insulin function.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por presentar altos niveles de glucosa plasmática (hiperglucemia), como consecuencia de una mala secreción y/o acción de la insulina (Giovannini et al., 2016). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está caracterizada por una desregulación en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, resultado de una inadecuada secreción de insulina, así como resistencia a la acción de esta hormona en sus tejidos blancos. La importancia de la DM2 radica en que este tipo engloba el 90% de todos los casos de DM a nivel mundial (DeFronzo et al., 2015).

En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, al menos el 10% de la población mexicana que vivía con DM2 en 2017 se encontraba bajo tratamiento con al menos un hipoglucemiante oral (metformina o glibenclamida) con el propósito de regular sus niveles de glucosa plasmática. Además de los hipoglucemiantes orales, las personas con diabetes suelen utilizar plantas medicinales como terapia principal o en conjunto con los medicamentos recomendados por su médico (Ovalle-Magallanes et al., 2019).

Los productos naturales son candidatos promisorios para el descubrimiento de nuevos fármacos, y el enfoque etnofarmacológico es una gran herramienta para dicho proceso. La etnofarmacología es un campo interdisciplinario que investiga el efecto farmacológico y toxicológico de las preparaciones usadas por los humanos de manera tradicional en las prácticas médicas (Heinrich & Jäger, 2015).

Como se mencionó previamente, el uso de las plantas medicinales en México es una práctica común, y se estima que hay al menos 800 plantas que son utilizadas para el tratamiento de la DM (Escandón-Rivera et al., 2020). Dada la riqueza de plantas medicinales mexicanas usadas para esta enfermedad, es importante describir los mecanismos de acción que participan en su posible efecto terapéutico. De manera concreta, este trabajo se enfoca en el efecto de los extractos acuosos de *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M.King & H.Rob., *Cecropia*

obtusifolia Bertol. y *Equisetum myriochaetum* Schlttdl. & Cham. sobre la gluconeogénesis, uno de los principales mecanismos que se encuentran alterados en un paciente con DM2, debido a la resistencia a la insulina, y que contribuye en mayor medida a la generación de hiperglucemia.

ANTECEDENTES

Homeostasis de la glucosa y gluconeogénesis

La glucosa es un nutrimento esencial para los organismos y sus funciones van más allá de ser una fuente de energía, ya que, además, es precursora de metabolitos intermedios en diversas rutas biosintéticas. Por lo tanto, la homeostasis de dicho carbohidrato es muy importante en los organismos vivos (Nirmalan & Nirmalan, 2017).

La homeostasis de la glucosa es el mantenimiento de los niveles de este monosacárido evitando variaciones importantes a lo largo del día. En este sentido, la insulina es la principal hormona reguladora que participa, junto al glucagón, en la homeostasis de la glucosa (Ferrannini, 2012)

Bajo condiciones de ayuno, es decir, de 10 a 12 horas posteriores a una ingesta de alimento, los niveles de glucosa permanecen constantes gracias a un balance entre la producción de glucosa endógena mediada por el hígado y por el riñón, y la captación y utilización del carbohidrato (Hamilton & Klett, 2021).

Después de una ingesta de alimento, la secreción de insulina es estimulada, y como consecuencia se observa una hiperinsulinemia que trae como consecuencia diversos efectos metabólicos, los cuales, en personas sanas, generan que los niveles de glucosa plasmática regresen a niveles basales en menos de dos horas. Entre los efectos metabólicos de la insulina se encuentran la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo, así como un aumento en la captación de la glucosa por dicho tejido. En el músculo esquelético, favorece la entrada de glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno. Por último, en el hígado, la insulina suprime la producción hepática de glucosa (PHG) y favorece la síntesis de glucógeno (Figura 1) (Norton et al., 2022).

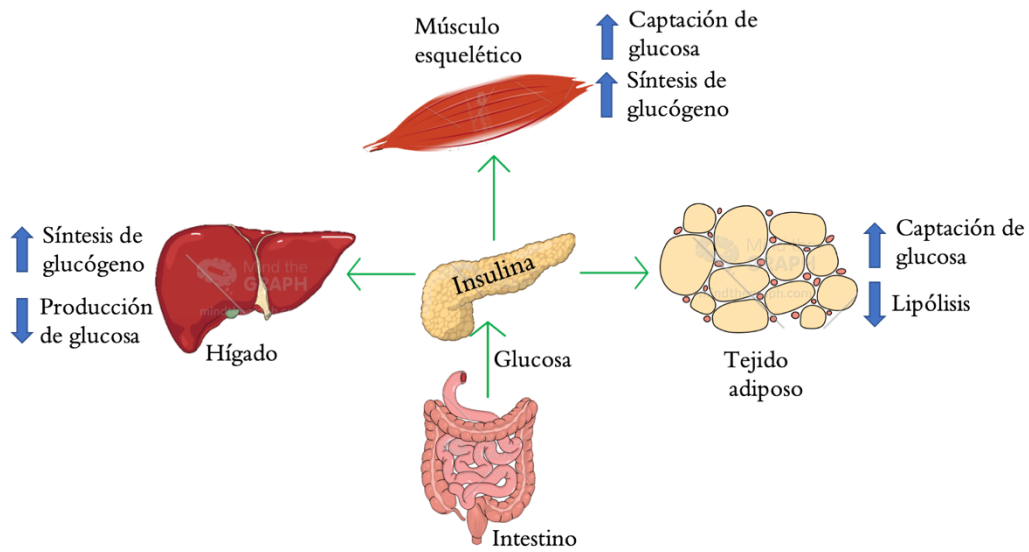


Figura 1. Esquema de los principales efectos de la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Creación propia en “mind the Graph”.

Particularmente en tejido adiposo, la insulina aumenta la captación de glucosa debido a que promueve un incremento en la translocación del glucotransportador tipo 4 (GLUT4) a la membrana celular de los adipocitos (Santoro et al., 2021). La glucosa que ingresa al adipocito, tras la acción de la insulina a través de la translocación del GLUT4, genera que la síntesis de triglicéridos aumente, debido a la obtención de glicerol fosfato (obtenido de la glucólisis) y a la producción de acil-CoA, el cual funciona como sustrato para la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, la insulina se encarga de suprimir la lipólisis en este tipo celular (Santoro et al., 2021).

En el músculo esquelético, la insulina permite la captación de glucosa mediante la translocación del GLUT4. Posteriormente, comienza la oxidación del carbohidrato, trayendo como consecuencia un aumento en la concentración de glucosa-6-fosfato (G6P), la cual es un activador alostérico de la enzima glucógeno sintasa y, por lo tanto, se promueve la síntesis de glucógeno (SyLOW et al., 2021).

Por último, el hígado es el principal órgano que produce glucosa durante el estado de ayuno a través de la ruptura del glucógeno almacenado (glucogenólisis) y por la síntesis de glucosa *de novo* (gluconeogénesis), de modo que la PHG se compone de estas dos vías metabólicas (Guerra & Gastaldelli, 2020). El efecto de la insulina en el hígado es disminuir la PHG, principalmente inhibiendo la vía gluconeogénica, debido a que dicha hormona es un regulador negativo de diversas enzimas que participan en la gluconeogénesis (Norton et al., 2022).

Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es definida como la vía metabólica que sintetiza glucosa *de novo*, es decir, a partir de sustratos que no sean carbohidratos (Wang et al., 2017). Algunas características importantes de esta vía metabólica son el hecho de que es opuesta a la vía de glucólisis y que, en conjunto, ambas son necesarias para la producción de moléculas intermediarias que son utilizadas para la biosíntesis de otras moléculas. La vía gluconeogénica es realizada por órganos como el hígado y el riñón (Leithner, 2021); sin embargo, el hígado es el órgano que presenta un mayor aporte de glucosa para el mantenimiento de este carbohidrato en niveles óptimos para el organismo (Sharabi et al., 2015).

Entre los principales sustratos de la gluconeogénesis se encuentran el lactato, glicerol, propionato, 18 de los 20 aminoácidos y piruvato. A lo largo de toda la vía metabólica hay un total de 14 enzimas desde la conversión de lactato a glucosa (Figura 2); sin embargo, sólo tres son catalogadas como gluconeogénicas y paso-limitantes: fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa); y una como enzima paso-limitante anaplerótica: piruvato carboxilasa (PC). El resto de las enzimas son compartidas con la vía glucolítica (Hanson & Owen, 2013). Dado que la G-6-Pasa es una enzima clave en la gluconeogénesis y la glucogenólisis y que la F-1,6-BisPasa es la enzima que limita la entrada de todos los sustratos gluconeogénicos a la vía, ambas pueden considerarse como buenos blancos farmacológicos para inhibir la PHG. Debido a esto, a continuación, se abordarán sus características principales.

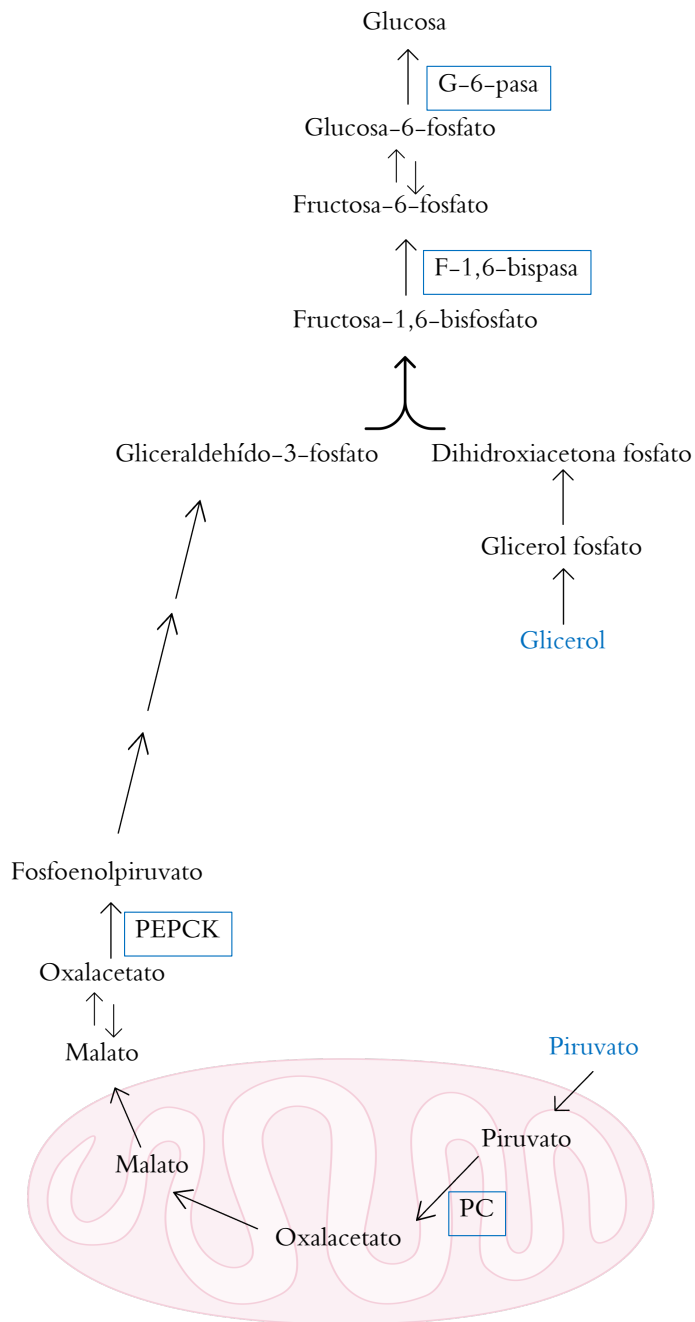


Figura 2. Esquema de las principales reacciones de la gluconeogénesis.

En color azul se destacan algunos sustratos de la vía (glicerol y piruvato), además de las enzimas paso-limitantes de la vía metabólica (en recuadros): piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa). Elaboración propia a partir de la información del texto.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa)

Previamente se mencionó que la F-1,6-BisPasa (EC 3.1.3.11) es una enzima exclusiva y reguladora de la vía gluconeogénica. Se encarga de catalizar la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato, liberando fosfato inorgánico (Gizak et al., 2019). De manera natural, la regulación negativa de esta enzima ocurre de dos maneras: 1) la fructosa-2,6-bisfosfato se une al sitio activo de la enzima, evitando que su sustrato natural ocupe este espacio y 2) la adenosina monofosfato (AMP) se une al sitio alostérico de la enzima impidiendo la actividad de la misma. Esta última representa un importante inhibidor de la actividad catalítica de la F-1,6-BisPasa (van Poelje et al., 2007).

Glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa)

La enzima G-6-Pasa (EC 3.1.3.9) es una enzima vital para la PHG, ya que forma parte de dos vías importantes en el metabolismo de carbohidratos: la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Ambas vías metabólicas son responsables de la producción y liberación de glucosa al torrente sanguíneo, y esta enzima realiza el último paso de ambas, catalizando la reacción de convertir a la G-6-P a glucosa liberando fosfato inorgánico al medio (Naz et al., 2020). Cabe destacar que esta enzima puede ser considerada como un sistema, ya que la fracción catalítica de dicha enzima se localiza en el lumen del retículo endoplásmico, mientras que existen otros tres elementos de este sistema enzimático que son proteínas transportadoras: una encargada de permitir la entrada y salida de G-6-P y otras dos que permiten la salida de glucosa y del fosfato inorgánico, respectivamente (Csala et al., 2007). Estos transportadores son muy importantes para el desarrollo de fármacos, ya que son blancos farmacológicos para la inhibición de este sistema como, por ejemplo, el ácido clorogénico, el cual es un inhibidor de la proteína que transloca la G-6-P y, con ello, se evita la catálisis dentro del retículo endoplásmico (van Schaftingen & Gerin, 2002).

Diabetes mellitus tipo 2

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) define a la diabetes mellitus (DM) como un conjunto de desórdenes metabólicos que se caracterizan por hiperglucemia, resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de glucosa, proteínas y de lípidos (Sgrò et al., 2021).

Debido a la etiología de la enfermedad, la DM puede ser clasificada de la siguiente manera (American Diabetes Association, 2021):

- a) Diabetes mellitus tipo 1, causada por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas lo que conlleva a un déficit absoluto de insulina.
- b) Diabetes mellitus tipo 2, que presenta una inadecuada secreción de insulina por la célula β del páncreas acompañada de una resistencia periférica a dicha hormona.
- c) Tipos específicos de DM, los cuales son generados, como su nombre lo indica, por afecciones específicas, como enfermedades del páncreas exócrino, síndrome de diabetes monogénica, ocasionada por fármacos, entre otros.
- d) Diabetes gestacional, la cual es diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo.

Cabe mencionar que esta enfermedad puede ser asintomática la mayor parte del tiempo; sin embargo, cuando los niveles de glucosa no se encuentran bien controlados, pueden presentarse algunos síntomas como la sed excesiva o polidipsia, aumento en la micción o poliuria, pérdida de peso, y aumento en consumo de alimentos o polifagia. Los síntomas anteriormente mencionados suelen presentarse en mayor instancia en las personas con diabetes mellitus tipo 1, aunque también suelen ser síntomas presentes en DM2 (Jia et al., 2022).

Epidemiología

La DM es una de las enfermedades que presentan uno de los crecimientos más rápidos a nivel global. En el año 2019, se estimaban un total de 463 millones de personas con DM a nivel mundial, y se proyectó que este número llegará a 578 millones en el 2030 y a 700 millones para el año 2045 (Williams, 2019). Posteriormente, en el año 2021, se reportaron 537 millones de personas con diabetes, mientras que para el año 2030 se proyectaron 643 millones y, para el año 2045, se estimó que la cifra alcance los 783 millones de personas a nivel mundial. Con la información estadística mencionada anteriormente, es importante destacar que el crecimiento de esta enfermedad ha ido incrementando más rápido de lo esperado, ya que las proyecciones para los años 2030 y 2045 tuvieron que ser recalculadas dos años más tarde de la primera estimación (International Diabetes Federation, 2021).

En el caso de México, la prevalencia de DM en 2018 fue de 10.3%, lo cual muestra un incremento en este parámetro respecto a lo observado en 2012, cuando la prevalencia se encontraba en 9.2% (Shamah et al., 2020). Para el año 2019, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) estimó un incremento de los adultos del país que presentaban dicha patología al 13% (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019). Por otro lado, en 2020 fallecieron 151,019 personas a causa de esta enfermedad, las cuales equivalieron al 14% de las defunciones ocurridas en ese año en el país (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021).

Diagnóstico

Para determinar si una persona padece DM se requieren realizar análisis de laboratorio para determinar los niveles de glucosa que se encuentran en el plasma. Las pruebas que la Asociación Americana de Diabetes recomienda son:

- a) glucosa plasmática al azar en presencia de síntomas clásicos
- b) medición de glucosa plasmática en ayuno

- c) prueba de tolerancia a la glucosa oral, considerando el valor de glucosa plasmática a las dos horas tras la administración de una carga de 75 g de glucosa
- d) porcentaje de hemoglobina glicada (Hba1c)

Aunque las pruebas anteriormente mencionadas son utilizadas en el diagnóstico de DM, también permiten observar si el paciente se encuentra en un estado de intolerancia a la glucosa o presenta una alteración de la glucosa plasmática en ayuno, es decir, si presenta un estado prediabético (Tabla 1) (American Diabetes Association, 2021).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus.

	Prediabetes	Diabetes
Glucosa en ayuno	100 – 125 mg/dl	≥126 mg/dl
Glucosa plasmática 2h tras carga de glucosa	140-199 mg/dl	≥200 mg/dl
Glucosa al azar*	No aplica	≥200 mg/dl
Hemoglobina glicada (Hba1c)	5.7 – 6.4%	≥6.5%

* En presencia de síntomas clásicos de DM (polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso)
 Información obtenida de (American Diabetes Association, 2021).

Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), conocida anteriormente como diabetes de inicio en el adulto o diabetes no insulino-dependiente, está caracterizada por la presencia de resistencia a la insulina (RI), además de una deficiencia en la secreción de esta hormona (Kottaisamy et al., 2021). Epidemiológicamente, la DM2 es el tipo de diabetes más importante debido a que engloba a aproximadamente el 90% de los casos totales de DM (Guerra & Gastaldelli, 2020). Entre sus factores de riesgo se encuentran tanto intrínsecos (genéticos) como ambientales, entre los que se encuentran la baja actividad física y el sedentarismo que conllevan al sobrepeso y/u obesidad (Jia et al., 2022; Sgrò et al., 2021).

Como se mencionó previamente, la RI es la principal característica que define a la DM2. La RI es una anomalía metabólica compleja y una preocupación común en la prediabetes y DM2. Se caracteriza por una respuesta subóptima a las concentraciones normales de insulina en distintos tejidos. Los principales órganos involucrados son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, debido a que son los principales sitios de sensibilidad a la insulina (Hari Kumar, 2020; Sah et al., 2016).

Se ha reportado que uno de los principales mecanismos implicados en la etiología de la resistencia a la insulina es causado por una disfunción en la vía de señalización de dicha hormona. La principal vía de transducción de las señales metabólicas de la insulina es la vía PI3K/Akt, con la proteína cinasa B o Akt como molécula principal (Krako Jakovljevic et al., 2021).

La señalización de la insulina en un estado sano comienza con la unión de la hormona a su receptor localizado en las células blanco, lo que genera una autofosforilación en residuos de tirosinas, permitiendo que los sustratos de receptor de insulina (IRS) sean reclutados y fosforilados también en residuos de tirosina. Las fosforilaciones ocurridas en los IRS permiten la unión de la proteína p85, la cual es la subunidad reguladora de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Tras la

activación de PI3K, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) se convierte en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). El aumento de concentración de PIP₃ activa a la proteína PDK1, la cual a su vez fosforila y activa a Akt. Por último, la activación de Akt promueve que lleve a cabo funciones específicas según el tejido en el cual se haya activado. En el caso del tejido adiposo, favorece la captación de glucosa y el almacenamiento de triglicéridos, además de inhibir la lipólisis; en músculo esquelético permite la entrada de glucosa a la célula a través de GLUT4 y su almacenamiento como glucógeno; y, por último, en el hígado inhibe la producción de glucosa (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008; White & Kahn, 2021).

La obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo importantes para el desarrollo de RI, debido a que la obesidad genera un estado de inflamación crónica de bajo grado. Uno de los cambios principales que presenta una persona con sobrepeso u obesidad se encuentra el aumento en el tamaño de los adipocitos, lo cual desencadena la muerte de los mismos, debido a un inadecuado suplemento de oxígeno. Además, los adipocitos que aumentaron su tamaño (adipocitos hipertróficos) liberan ácidos grasos libres, especies reactivas de oxígeno y citocinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Ahmed et al., 2021). Se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias causan RI tras activar serina cinasas que fosforilan los IRS en residuos de serina, lo cual regula negativamente la señalización de la insulina. Otro mecanismo de RI relacionado a la obesidad es el aumento de metabolitos como el diacilglicerol, el cual activa a la proteína cinasa C (PKC), fosforilando a los IRS en residuos de serina y treonina (Sah et al., 2016).

En un ambiente de RI, las células β pancreáticas incrementan la secreción de insulina, presentando una tasa de metabolismo elevada que genera un ambiente de estrés que conlleva a un daño mitocondrial, lo cual, complementado con un estado inflamatorio, causa el desgaste de dichas células (Hari Kumar, 2020).

Desbalance en la producción hepática de glucosa por resistencia a la insulina

El hígado es uno de los sitios más importantes afectados por la RI, la cual está caracterizada por un fallo en la función de la insulina para inhibir la gluconeogénesis, desencadenando hiperglucemia severa. Los procesos involucrados en la RI son tejido-específicos y se ha reportado que el hígado presenta RI antes que el músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta alta en grasa (Patel & Goyal, 2019). En sujetos sin diabetes ni obesidad con un ayuno de 8 h, la contribución de la gluconeogénesis a la PHG es alrededor del 50%, mientras que, en pacientes con DM2 o RI, la contribución de la gluconeogénesis a la PHG se incrementa hasta en un 70% (Guerra & Gastaldelli, 2020).

En pacientes con DM2 o RI, se ha reportado que la producción endógena de glucosa se encuentra elevada en comparación con las personas sin DM ni RI, debido al incremento en los sustratos gluconeogénicos (piruvato, lactato, aminoácidos y glicerol) y a la actividad de las enzimas presentes en la vía metabólica. Por otro lado, la RI también incrementa la tasa de gluconeogénesis, ya que aumenta la expresión de enzimas de la vía, como PEPCK y G-6-Pasa, siendo esta última una enzima clave debido a que también participa en el último paso de la vía glucogenolítica (Guerra & Gastaldelli, 2020; Zhang et al., 2019)

Dado que la PHG se encuentra incrementada en el paciente diabético, contribuye a la generación de la hiperglucemia en ayuno, por lo que los altos niveles de glucosa presentes en estas personas se deben principalmente a un control deficiente de la vía gluconeogénica por la insulina (Choi et al., 2016).

Con el objetivo de cuantificar o medir la RI para estudiar aspectos fisiopatológicos de la enfermedad, así como para evaluar nuevos tratamientos, se han desarrollado diversas técnicas y modelos matemáticos. El estándar de oro para evaluar la RI es la pinza hiperinsulinémica euglicémica; sin embargo, esta técnica es invasiva además de tener un costo elevado. Como alternativas se han desarrollado modelos

matemáticos que permiten la evaluación de la RI y que han mostrado una correlación positiva con el estándar de oro: el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y el índice cuantitativo de verificación de sensibilidad a insulina (QUICKI). Ambos modelos utilizan valores plasmáticos de insulina y glucosa en ayuno para ser calculados (Katz et al., 2000; Wang & Fang, 2022). Un aspecto a destacar de estos índices, es que la información que proporcionan es sobre lo que ocurre en el estado de ayuno, lo cual refleja principalmente el efecto de la insulina sobre la PHG y no brinda información sobre la captación y utilización periférica de la glucosa (Patarrão et al., 2014).

Para el tratamiento de la DM2, la disminución de la RI hepática y la inhibición de la vía gluconeogénica, específicamente la inhibición de las enzimas paso-limitantes de esta vía, son importantes blancos terapéuticos (Govindarajan et al., 2021).

La metformina como agente terapéutico

La estrategia para el tratamiento de la DM2 está basada en los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, es decir, se recurre a intervenciones terapéuticas que coadyuvan al tratamiento de las anormalidades que contribuyen a la generación de hiperglucemia. Las metas principales del tratamiento son mantener un control adecuado de los niveles de glucosa plasmática, evitar las complicaciones agudas, y retrasar las complicaciones crónicas, con la intención de mejorar la calidad de vida del paciente (Gökçay Canpolat & Şahin, 2021).

La dieta balanceada, el mantener un peso dentro de los límites normales y una actividad física regular son los principales puntos para el manejo no farmacológico de la DM (Espino, 2010). En cuanto al tratamiento farmacológico, los medicamentos que se emplean tienen como blancos terapéuticos factores específicos que forman parte de la fisiopatología de la DM, entre los que se encuentran promover la secreción de insulina, como las sulfonilureas y los análogos del péptido similar al glucagón-1; incrementar la función de la insulina (sensibilizadores a la insulina), como las tiazolidinedionas; disminuir la reabsorción de glucosa, como los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 1; e inhibir la PHG, específicamente la gluconeogénesis, como las biguanidas (ElSayed et al., 2023; Gökçay Canpolat & Şahin, 2021)

En este sentido, la metformina, una biaguanida, es el fármaco de primera línea que se utiliza para el control de la DM2, la cual funciona como un sensibilizador a la insulina, aumentando la disposición de glucosa en el músculo esquelético, y disminuyendo la gluconeogénesis hepática (Tan et al., 2016).

El fármaco metformina es una dimetil biguanida de origen sintético conformada por la unión de dos guanidinas. El desarrollo de la metformina como un fármaco para la DM2 está ligado a la medicina popular europea del siglo XVII cuando los extractos de la planta *Galega officinalis* L. fueron utilizados para tratar “la orina dulce”. El principal compuesto activo de *G. officinalis* es el alcaloide galegina; sin embargo,

dicho compuesto es tóxico, por lo que, en el siglo XIX, este hecho promovió la síntesis de las biguanidas (Triggle et al., 2022).

El efecto principal de la metformina es el de inhibir la gluconeogénesis hepática. Para lograr este objetivo, entra al hepatocito por el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1). Una vez que ingresa, la metformina inhibe el complejo 1 de la cadena de transporte de electrones, lo que evita la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) y, por lo tanto, se incrementa la relación AMP/ATP en el citoplasma celular, desencadenando la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). Una vez activada, AMPK fosforila a la enzima acetil-CoA-carboxilasa (ACC), tanto a la isoforma 1 como a la 2, por lo que la síntesis de ácidos grasos disminuye. Otra enzima fosforilada por AMPK es la fosfodiesterasa de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), lo cual, a nivel celular, se traduce en una disminución de la señalización del glucagón en el hepatocito. Por último, AMPK fosforila al coactivador transcripcional regulado por CREB 2 (CRTC2) que, al estar fosforilado, no puede llevar a cabo su función, es decir, la de promover la transcripción de las enzimas gluconeogénicas G-6-Pasa y PEPCK. Finalmente, otro efecto del incremento en la relación AMP/ATP es la inhibición directa de la enzima F-1,6-BisPasa (Figura 3) (Rena et al., 2017).

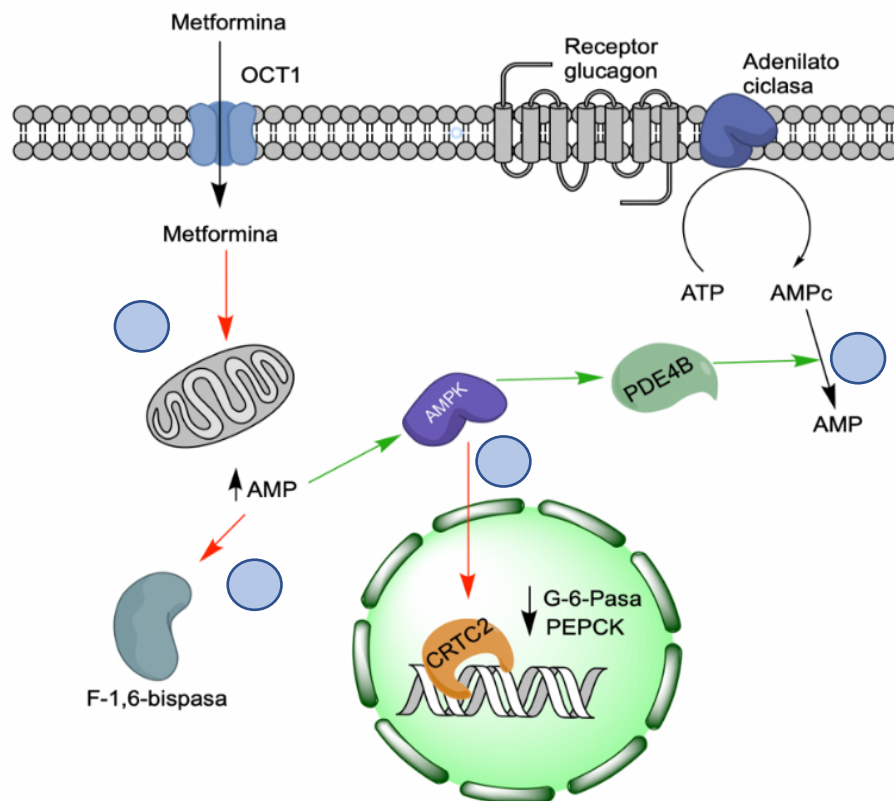


Figura 3. Mecanismo de acción del fármaco metformina en hígado.

Las flechas rojas indican inhibición, mientras que las flechas verdes indican activación. OCT1 Transportador de cationes orgánicos 1; AMP adenosina monofosfato; AMPc adenosina monofosfato cíclico; AMPK proteína cinasa activada por AMP; PDE4B fosfodiesterasa 4B; ATP adenosina trifosfato; CRTC2 coactivador transcripcional regulado por CREB 2; PEPCK fosfoenolpiruvato carboxicinasa; G-6-Pasa glucosa-6-fosfatasa. Imagen elaborada con base en la información del texto.

Modelos animales de diabetes mellitus

La DM es, en general, investigada en modelos animales, los cuales juegan un papel importante para lograr comprender la fisiopatología de la enfermedad. Aunque en la actualidad existen modelos tanto *in vitro* como *in silico* para el estudio de DM, los modelos animales siguen siendo efectivos, debido a que permiten observar la complejidad de la etiología y las interacciones multisistémicas que presenta esta enfermedad (Kottaisamy et al., 2021).

Los roedores son los animales que se utilizan mayormente debido a su tamaño pequeño, sus cortos intervalos generacionales y a su fácil acceso y mantenimiento. Los modelos animales para DM2 pueden obtenerse a través de modificaciones genéticas, cirugías, por dieta y por inducción química (Engel et al., 2019). Los agentes químicos que son capaces de inducir DM se caracterizan por afectar directamente a las células β pancreáticas, inhibir temporalmente la producción y/o secreción de insulina y reducir la eficacia metabólica de la insulina en sus tejidos blanco. Un ejemplo de agente químico capaz de dañar directamente a las células β pancreáticas es la estreptozotocina (STZ) (Rodrigues, 2016).

Modelo estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA)

El modelo de estreptozotocina-nicotinamida (STZ-NA) fue creado por Masiello y colaboradores (1998) y, como su nombre lo indica, se induce con la administración de dos compuestos: la STZ, un agente con acción citotóxica y la nicotinamida (NA), una molécula que protege a las células β pancreáticas (Szkudelski, 2012).

La STZ es un antibiótico nitrosureo (Rodrigues, 2016). En su estructura tiene una mitad de glucosa que le permite ingresar a la célula β pancreática a través del GLUT2. Una vez dentro de la célula, la STZ causa alquilación en el DNA, causando fragmentación del material genético. Como resultado de este daño, se activa la enzima poli-(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) con la finalidad de reparar el DNA. Esta enzima cataliza la síntesis de poli-ADP-ribosa a partir de NAD^+ , conllevando a

la disminución de NAD^+ y a la subsecuente reducción de los niveles de ATP, provocando la muerte celular (Szkudelski, 2012). La sensibilidad a la STZ se puede ver afectada por algunos factores como la edad de los organismo, ya que, entre más jóvenes son los animales utilizados, el efecto citotóxico de este fármaco se verá disminuido (Gheibi et al., 2017).

Por otro lado, la NA es la forma amida de la vitamina B3, y el efecto protector que ejerce sobre la célula β pancreática se debe a dos mecanismos. El primero es que inhibe la actividad de la enzima PARP-1, evitando la disminución de los niveles de NAD^+ , mientras que el segundo mecanismo es funcionar como un precursor de NAD^+ . La administración conjunta de NA con STZ permite el desarrollo de la característica más importante de este modelo, es decir, una hiperglucemia moderada, debido a que no se da una destrucción total de las células β pancreáticas (Szkudelski, 2012). A pesar de la existencia de varios fármacos para inducir diabetes, la STZ es el agente químico más utilizado para mimetizar dicha enfermedad, permitiendo la generación de modelos de hiperglucemia inducida que pueden ser explotados para el análisis hipoglucemiante de diversos fármacos y nuevas moléculas (Goyal et al., 2016).

Plantas medicinales útiles en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas patologías en países en vías de desarrollo es algo común. Por ejemplo, las personas con DM2 de localidades rurales utilizan plantas para el control de la hiperglucemia en conjunto con los medicamentos (Cruz & Andrade-Cetto, 2015; World Health Organization, 2019).

La etnofarmacología es el estudio de los productos naturales que tienen una actividad biológica, con base en el conocimiento tradicional, es decir, es necesario consultar a los pobladores de las regiones para identificar plantas, hongos o animales que puedan ayudar en el tratamiento de las patologías actuales (Andrade-Cetto & Heinrich, 2011).

Algunos compuestos aislados de medicinas naturales han sido reportados como reguladores de la homeostasis de la glucosa al disminuir la hiperglucemia generada por las alteraciones fisiopatológicas de la DM2. Por ejemplo, se ha reportado que la berberina, un alcaloide con efecto hipoglucemiante demostrado, mejora la resistencia a la insulina e inhibe a la gluconeogénesis hepática (Li et al., 2018).

Continuando con el trabajo de estudiar los mecanismos de acción de plantas hipoglucemiantes utilizadas en la medicina tradicional mexicana (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005), se seleccionaron tres plantas con estudios previos para evaluar su posible efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima reguladora F-1,6-BisPasa (disminuyendo la gluconeogénesis hepática) y su posible efecto terapéutico sobre la resistencia a la insulina, dos de los mecanismos que generan hiperglucemia en la DM2.

Las plantas mexicanas que se abordarán en este trabajo son *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R. M. King & H. Rob, *Cecropia obtusifolia* Bertol. y *Equisetum myriochaetum* Schldl. & Cham. A continuación, se describirán los antecedentes de cada una.

Ageratina petiolaris

La especie *A. petiolaris*, también conocida como “hierba del ángel” y “yolochichitl”, es un arbusto hermafrodita perenne que llega a medir hasta 1.5 m de altura. Sus hojas son opuestas, pecioladas y de forma ovado-triangular con un borde dentado (Figura 4). Sus flores son blancas y sus frutos son aquenios (Rojo et al., 2002).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ageratina* O. Hoffm.

Especie: *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R. M. King & H. Rob



Figura 4. Clasificación taxonómica y ejemplar de *A. petiolaris*.

Información e imagen obtenidas de Tropicos (2022a).

A. petiolaris es una especie endémica de México, distribuyéndose en los estados de Veracruz, Tlaxcala, Tamaulipas, San Luis Potosí, Puebla, Oaxaca, Nuevo León, Michoacán, Estado de México, Hidalgo, Guanajuato, Aguascalientes Durango Chiapas y Coahuila (Bustos-Brito, 2016).

Anteriormente, se reportó el uso tradicional de *A. petiolaris* para el tratamiento de la DM2 en México (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005). Entre los principales metabolitos presentes en el extracto acuoso (parecido a la preparación tradicional consumida por los pacientes con DM2) de *A. petiolaris* se encuentran el ácido clorogénico y el L-qui-ro-inositol (Figura 5). En el aspecto farmacológico relacionado a diabetes, el extracto acuoso de *A. petiolaris* fue probado en ratas hiperglucémicas STZ-NA en dos experimentos diferentes. En el primero, se evaluó el efecto agudo del extracto a lo largo de tres horas sobre los niveles de glucosa plasmática. Los resultados de

ese estudio arrojaron que el extracto presentó un efecto hipoglucemiante a partir de las dos horas, el cual se mantiene hasta las tres horas. En el segundo ensayo, se evaluó el efecto del extracto durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral, en el cual se observó que, tras la administración del extracto y una carga de glucosa, la glucosa plasmática de las ratas disminuyó respecto al control negativo a las dos horas (Bustos-Brito et al., 2016).

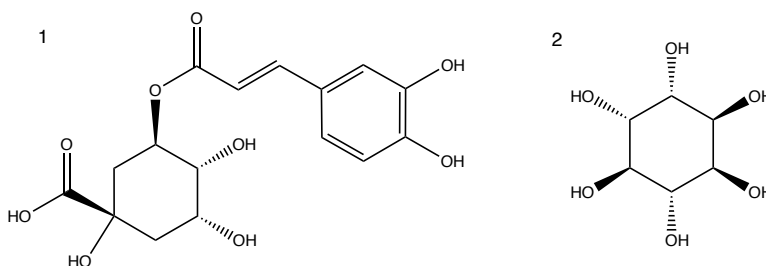


Figura 5. Compuestos aislados del extracto acuoso de *A. petiolaris*.

1) Ácido clorogénico. 2) L-quiuro-inositol.

Por otra parte, el efecto crónico del extracto acuoso de *A. petiolaris* fue evaluado en ratas Wistar hiperglucémicas STZ-NA. En este ensayo, el extracto logró disminuir los niveles de glucosa plasmática de los organismos a lo largo de los 42 días que duró el experimento. Adicionalmente, los niveles de HbA1c también se vieron disminuidos respecto al grupo control negativo (Sánchez-Villaseñor, 2019).

Posteriormente, el efecto del extracto de *A. petiolaris* y del compuesto L-quiuro-inositol sobre la secreción de insulina fue evaluado en ratas hiperglucémicas STZ-NA. Los resultados indicaron que el extracto de *A. petiolaris* no aumentó los niveles de insulina plasmática, mientras que el compuesto L-quiuro-inositol sí incrementó los niveles de dicha hormona, mostrando un comportamiento similar a la glibenclamida (Moreno-Vargas, 2019).

Finalmente, el extracto acuoso de *A. petiolaris* también fue evaluado para determinar su efecto sobre la PHG *in vivo* e *in vitro*. En el estudio *in vivo*, se realizaron pruebas de tolerancia a pruvato a ratas Wistar hiperglucémicas STZ-NA y, como resultado, se observó una disminución en la producción de glucosa a lo

largo de 90 minutos. Por otra parte, en el ensayo *in vitro*, se evaluó el efecto inhibitorio del extracto sobre la enzima G-6-Pasa, obteniéndose que el extracto acuoso fue capaz de inhibir dicha enzima con una IC₅₀ de 223 µg/ml (Mata-Torres et al., 2020).

Cecropia obtusifolia

C. obtusifolia es conocida de manera común con distintos nombres a lo largo del territorio mexicano, entre los que destacan: “guarumbo”, “chancarro”, “guarina”, “homiguillo”, “kooché”, “trompeta” y “trompetilla”. Esta especie es un árbol perennifolio con una altura de 20 a 35 m, con un diámetro de hasta 50 cm a la altura del pecho. Sus hojas son de color verde oscuro y brillantes en el haz, mientras que, en el envés, se observa una coloración grisácea con una nervación rojiza y prominente; estas hojas son lanceoladas durante las primeras etapas, aunque con el paso del tiempo se comienzan a lobular. Las flores se encuentran en espigas, son axilares y presentan una coloración amarillenta (Figura 6) (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2022).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Urticaceae

Género: *Cecropia* Loefl.

Especie: *Cecropia obtusifolia* Bertol.



Figura 6. Clasificación taxonómica y fotografía de *C. obtusifolia*. Información e imagen obtenidas de Tropicos (2022b).

Las infusiones de *C. obtusifolia* son utilizadas de manera tradicional para el tratamiento de la DM2 en los estados de Hidalgo y Oaxaca. En cuanto al contenido

fitoquímico, se ha reportado que del extracto acuoso de *C. obtusifolia* se han identificado los compuestos ácido clorogénico y la isoorientina (Figura 7) (Andrade-Cetto & Wiedenfeld, 2001).

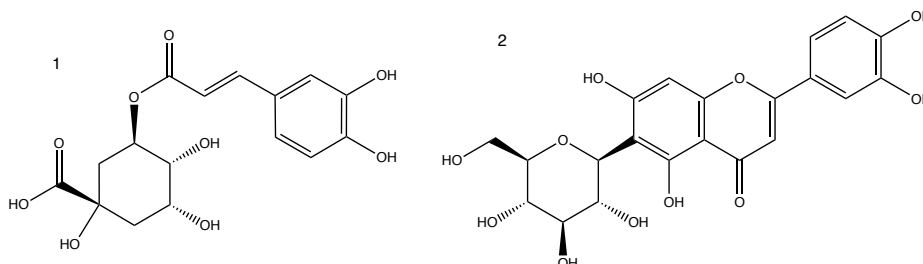


Figura 7. Compuestos presentes en el extracto de *C. obtusifolia*.

1) Ácido clorogénico. 2) Isoorientina.

En un estudio farmacológico, se probó el efecto hipoglucemiante agudo tanto del extracto acuoso y butanólico como de los compuestos ácido clorogénico e isoorientina en ratas wistar hiperglucémicas STZ (Andrade-Cetto & Wiedenfeld, 2001).

En otro estudio, *C. obtusifolia* fue administrada a pacientes diabéticos de diagnóstico reciente, los cuales, al momento del estudio, no estaban bajo tratamiento farmacológico. *C. obtusifolia* fue administrada a lo largo de 32 semanas para, posteriormente, ser suspendida por otras 34 semanas, en las cuales, los pacientes controlaron sus niveles de glucosa plasmática con dieta y ejercicio. Los resultados mostraron una disminución de los niveles de glucosa plasmática en los pacientes tras la administración de *C. obtusifolia* y, al suspender su uso, se observó que los niveles de glucosa plasmática aumentaron nuevamente en los pacientes (Revilla et al., 2007).

Otro antecedente farmacológico importante de *C. obtusifolia* es su efecto sobre la inhibición de la PHG, el cual fue estudiado en ratas Wistar hiperglucémicas n5-STZ. Tras realizar pruebas de tolerancia a piruvato, se observó una disminución en el pico hiperglucémico en los grupos experimentales después de la administración del extracto de *C. obtusifolia* y del ácido clorogénico; además, en un ensayo *in vitro*

realizado en el mismo trabajo, *C. obtusifolia* inhibió la actividad de la enzima G-6-Pasa con una IC₅₀ de 224 µg/ml (Andrade-Cetto & Cárdenas-Vázquez, 2010).

Por último, el extracto de *C. obtusifolia* no aumentó los niveles de insulina plasmática en un estudio agudo realizado en ratas Wistar STZ-NA, ni tampoco mostró una inhibición significativa en las enzimas α -glucosidasas, las cuales se encargan de la degradación de oligosacáridos en el intestino delgado, permitiendo así la absorción de los monosacáridos (Andrade-Cetto et al., 2015; Samario, 2013).

Equisetum myriochaetum

Los miembros pertenecientes al género *Equisetum* son plantas vasculares que comprenden aproximadamente 15 especies, con una distribución a nivel mundial que se dio de forma temprana (Elgorriaga et al., 2018). Los organismos de este género son conocidos de manera coloquial como “cola de caballo”. Su tamaño va desde los 12.9 cm de alto y un diámetro de 0.5 – 1.0 cm, hasta más de ocho metros de altura y diámetros de 4 cm. Morfológicamente hablando, todas las especies pertenecientes al género *Equisetum* son herbáceas perennes, y consisten en un tallo vertical aéreo que se desprende de un sistema de rizoma que se localiza por debajo de la tierra. Las pequeñas hojas micrófilas se encuentran dispuestas en verticilo, y las hojas de cada verticilo se fusionan para formar una vaina cilíndrica alrededor de cada nudo. Algunas, pero no todas las especies de *Equisetum*, tienen ramificaciones laterales en cada nudo (Figura 8) (Husby, 2013).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Polypodiosida

Orden: Equisetales

Familia: Equisetaceae

Género: *Equisetum*

Especie: *Equisetum myriochaetum* Schltdl. & Cham.



Figura 8. Clasificación taxonómica y ejemplar de *E. myriochaetum*.

Información e imagen obtenidas de Tropicos (2022c).

Las especies *E. hyemale* y *E. myriochaetum* habitan ambientes acuáticos o en pantanos y, en México, se encuentran ampliamente distribuidos. A ambas especies se le han asociado propiedades medicinales. Entre los principales efectos medicinales se encuentran como antioxidantes, antimicrobianos, diuréticos y antiproliferativos (Olazarán-Santibañez et al., 2021).

Hablando específicamente de la especie *E. myriochaetum*, en México esta planta es utilizada para el tratamiento de afecciones renales. En el estado de Guerrero, se ha reportado su uso tradicional para el tratamiento de DM2, en donde, los médicos tradicionales, utilizan la parte aérea seca de la planta para ser hervida y administrada a los pacientes a lo largo del día como “agua de uso” (Andrade Cetto et al., 2000).

El extracto acuoso de *E. myriochaetum* mostró un efecto hipoglucemiante agudo en ratas Wistar hiperglucémicas inducidas con el modelo STZ. Los principales componentes químicos reportados en el extracto utilizado fueron: kamferol-3-O-soforósido, kamferol-3,7-di-O- β -glucósido, kamferol-3-O-soforósido-4'-O- β -glucósido y cafeoil-metilato-4- β -glucopiranosido (Figura 9) (Andrade Cetto et al., 2000; Wiedenfeld et al., 2000).

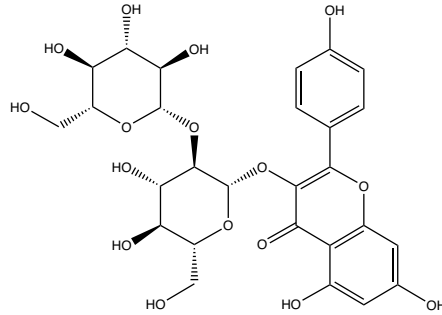


Figura 9. Estructura de kamferol-3-O-soforósido, aislado del extracto de *E. myriochaetum*.

Posteriormente, una infusión de *E. myriochaetum* fue administrada a pacientes con DM2 recién diagnosticada, con la finalidad de evaluar su efecto hipoglucemiante y secretor de insulina plasmática. Los resultados de este ensayo confirmaron su efecto hipoglucemiante, ya que los niveles de glucosa plasmática de los pacientes disminuyeron respecto a los niveles de glucosa previos a la administración de *E. myriochaetum* y a los de los pacientes que no recibieron dicho extracto. Por último, al medir los niveles de insulina plasmática de los pacientes, se observó que *E. myriochaetum* no aumenta los niveles de esta hormona (Revilla et al., 2002).

En otro estudio farmacológico, se evaluó el efecto crónico del extracto acuoso de *E. myriochaetum* en ratas hiperglucémicas STZ, en donde se observó una disminución de los niveles de glucosa plasmática, triglicéridos y colesterol a lo largo de 33 días de administración (Revilla-Monsalve et al., 2020).

Por último, el extracto acuoso de *E. myriochaetum* fue evaluado como posible inhibidor de las enzimas α -glucosidasas. Como resultado, se observó que *E. myriochaetum* no inhibió la actividad de estas enzimas *in vitro* e incluso, en pruebas de tolerancia a maltosa realizadas a ratas hiperglucémicas STZ, no fue capaz de disminuir la hiperglucemia posprandial producto de la administración de maltosa. Dados estos resultados, el efecto hipoglucemiante de esta planta está dado por un mecanismo diferente al de la inhibición de estas enzimas intestinales (Andrade-Cetto et al., 2008).

Tomando en cuenta los estudios farmacológicos relacionados a diabetes de *E. myriochaetum*, los mecanismos de acción por los cuales disminuye los niveles de glucosa plasmática permanecen sin ser claros, por lo que es importante evaluar su efecto sobre otros procesos, como, por ejemplo, sobre la producción endógena de glucosa, mecanismo que no ha sido evaluado en esta especie.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM2 es una patología caracterizada por hiperglucemia, siendo el hígado uno de los órganos que más contribuye al aumento de los niveles de glucosa sanguínea, tanto por la ruptura de glucógeno como por la producción de glucosa *de novo*. Debido a esto, la regulación de este mecanismo es de gran importancia para el mejor manejo de la enfermedad, la cual presenta una alta prevalencia en México y es capaz de producir una gran cantidad de complicaciones que disminuyen la calidad de vida o desencadenan el fallecimiento de los pacientes. Los tratamientos deben estar enfocados en retrasar la aparición de estas complicaciones y, con ello, mejorar la calidad de vida y retrasar la muerte de las personas.

Además de la medicina alópata, en México, los pacientes utilizan una gran diversidad de plantas que forman parte de su medicina tradicional para el tratamiento de DM2, por lo que la comprensión de sus mecanismos de acción es de suma importancia para el futuro desarrollo de posibles fitomedicamentos para tratar la enfermedad. Tal es el caso de las plantas *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum*, las cuales han sido reportadas por su uso tradicional para tratar la DM2 en diferentes estados de México. Dado que sus antecedentes farmacológicos indican que presentan un efecto hipoglucemiante, es importante comprender el mecanismo por el cual están ejerciendo dicho efecto.

En este sentido, el mecanismo de acción por el cual *E. myriochaetum* produce su efecto hipoglucemiante sigue sin ser esclarecido y, considerando la forma tradicional en la cual es ingerido, es decir, como “agua de uso”, es importante evaluar un mecanismo que genere hiperglucemia y que se encuentre constantemente activo en la persona con diabetes, como la PHG; además, sus estudios previos indican que no es secretagogo de insulina ni inhibidor de enzimas α -glucosidasas, por lo que es importante evaluar su efecto sobre la PHG.

Al tratarse de extractos y no de compuestos puros, es probable que las tres plantas presenten efectos sinérgicos, por lo que, además de su efecto sobre la PHG, es importante evaluar su repercusión sobre la resistencia a la insulina. En este caso, *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* ya cuentan con antecedentes farmacológicos que prueban su inhibición sobre la PHG, por lo que el primer objetivo del presente proyecto es determinar el efecto de *E. myriochaetum* sobre este mecanismo de acción para, posteriormente, estudiar el impacto de las tres especies sobre la F-1,6-BisPasa, una enzima reguladora de la gluconeogénesis considerada como buen blanco terapéutico, y sobre la resistencia a la insulina. La conjunción de los efectos sobre estos mecanismos por parte de las plantas conllevaría a un mejor control glucémico de los pacientes a largo plazo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Describir el efecto de los extractos de *A. petiolaris*, *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* sobre la producción hepática de glucosa, específicamente la gluconeogénesis, y la homeostasis a la glucosa sistémica.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *E. myriochaetum* sobre la producción hepática de glucosa *in vivo*, mediante pruebas de tolerancia a piruvato en ratas hiperglucémicas STZ-NA.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *E. myriochaetum in vitro*, en un ensayo enzimático de inhibición concentración-respuesta de la G-6-Pasa.
- Probar el efecto de los extractos acuosos de *A. petiolaris*, *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* sobre la actividad de la enzima F-1,6-BisPasa en ensayos enzimáticos de inhibición concentración-respuesta.
- Evaluar el efecto crónico de los extractos acuosos de *A. petiolaris*, *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* sobre la homeostasis a la glucosa sistémica en ratas hiperglucémicas STZ-NA mediante:
 - Medición de glucosa en ayuno de forma semanal
 - Pruebas de tolerancia a la glucosa oral
 - Obtención de índice HOMA-IR y QUICKI

HIPÓTESIS

- El extracto acuoso de *E. myriochaetum* disminuye la producción hepática de glucosa en las pruebas de tolerancia a piruvato
- El extracto acuoso de *E. myriochaetum in vitro* inhibe la actividad de la enzima G-6-Pasa.
- Los extractos acuosos de *A. petiolaris*, *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* inhiben la actividad de la enzima F-1,6-BisPasa.
- Los extractos acuosos de *A. petiolaris*, *E. myriochaetum* y *C. obtusifolia* disminuirán los valores de glucosa plasmática en ayuno, así como mejorarán la tolerancia a la glucosa oral, además de aumentar el valor del índice QUICKI y disminuyen el valor obtenido en el índice HOMA-IR.

METODOLOGÍA

Obtención de plantas y elaboración de extractos

C. obtusifolia y *E. myriochaetum* fueron proporcionadas por el informante de la comunidad de Tamala, Hidalgo, Salomón Villegas, en julio de 2017. *A. petiolaris* fue proporcionada por el laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM por la Dra. Celia Bustos. Se utilizaron las hojas de *C. obtusifolia* y las partes aéreas de *E. myriochaetum* y *A. petiolaris* para la elaboración de los extractos acuosos, los cuales se realizaron colocando 20 g de la planta en agua en ebullición, manteniéndose en agitación por 15 min. Posteriormente, cada extracto fue filtrado al vacío con tierra de diatomeas, y ultracongelado para la posterior liofilización en una liofilizadora LABCONCO FreeZone 2.5. Las dosis utilizadas para los estudios *in vivo* fueron obtenidas de estudios previos (Andrade-Cetto & Cárdenas-Vázquez, 2010; Bao et al., 2018; Bustos-Brito et al., 2016).

Animales experimentales

Se utilizaron un total de 72 ratas macho de la cepa Wistar de un peso aproximado de 250 g, las cuales fueron obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), manteniéndose en condiciones estándar de bioterio con fotoperiodos de 12 h/12 h luz/obscuridad, 50% de humedad y 25°C, agua y alimento Nutricubo de Purina® *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados a los organismos fueron aprobados por la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica (CEARC) de la Facultad de Ciencias, UNAM (Folio T_2019_09_003).

Inducción de hiperglucemia (modelo estreptozotocina-nicotinamida (STZ-NA))

La hiperglucemia se indujo siguiendo el protocolo establecido por Masiello y colaboradores (1998), modificando las dosis utilizadas de STZ y NA. Las ratas fueron sometidas a un ayuno de 12 h previo a la inducción de la hiperglucemia.

Posteriormente, la NA, a dosis de 150 mg/kg, fue administrada vía intraperitoneal 15 min previos a la administración de STZ vía intravenosa a dosis de 65 mg/kg.

Pruebas de tolerancia a piruvato

Con la finalidad de determinar el efecto del extracto acuoso de *E. myriochaetum* sobre la PHG, se realizaron pruebas de tolerancia a piruvato. Para llevarlas a cabo, los animales fueron sometidos a ayuno de 18 h para, posteriormente, medir la glucosa plasmática en su tiempo inicial (T0) por duplicado con glucometros Accu-Chek® Active. Inmediatamente después de la medición, se administró vía oral el primer tratamiento correspondiente para cada grupo, es decir, solución fisiológica, ácido clorogénico (usado como control positivo) o el extracto acuoso de *E. myriochaetum* (Tabla 2) y, transcurridos 15 min, se administró vía intraperitoneal piruvato de sodio a una dosis de 2 g/kg. A partir de esta administración se midió la glucosa plasmática en los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos (Figura 10) (Andrade-Cetto & Cárdenas Vázquez, 2010).

Para calcular el número de organismos por grupo se utilizaron los resultados de un estudio previo realizado con el extracto de *A. petiolaris*, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Tamaño de muestra} = \frac{2SD^2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

Donde:

SD = desviación estándar de estudio previo

$Z_{\alpha/2}$ = 1.96 (error tipo 1 de 5%)

Z_{β} = 0.842 (80% de poder)

d (tamaño del efecto) = diferencia entre medias de estudio previo

Se utilizaron las medias y desviaciones estándar de las áreas bajo la curva calculadas de las pruebas de tolerancia a piruvato realizadas a ratas hiperglucémicas a las cuales se les administró vía oral solución fisiológica (control

negativo) o el extracto acuoso de *A. petiolaris* 15 min antes de la inyección intraperitoneal de piruvato:

$$n = \frac{2(4\ 850)^2(1.96 + 0.842)^2}{(41\ 739.38 - 33\ 800.63)^2} = \frac{2(23\ 519\ 773)(7.85)}{(63\ 023\ 752)} = 5.9 = 6$$

Tabla 2. Grupos experimentales y tratamientos de las pruebas de tolerancia a piruvato.

Grupo (n=6)	Tratamiento	
	1ra. Administración (p.o)	2da. Administración (i.p.)
Normoglucémico (N)	Solución fisiológica	Solución fisiológica
Normoglucémico + Piruvato (NP)	Solución fisiológica	Piruvato (2 g/kg)
Hiperglucémico (H)	Solución fisiológica	Solución fisiológica
Hiperglucémico + Piruvato (HP)	Solución fisiológica	Piruvato (2 g/kg)
Hiperglucémico + Piruvato + Ácido clorogénico (HPAC)	Ácido clorogénico (10 mg/kg)	Piruvato (2 g/kg)
Hiperglucémico + Equisetum myriochaetum (HPEm)	Exto. acuoso de <i>E. myriochaetum</i> (330 mg/kg)	Piruvato (2 g/kg)

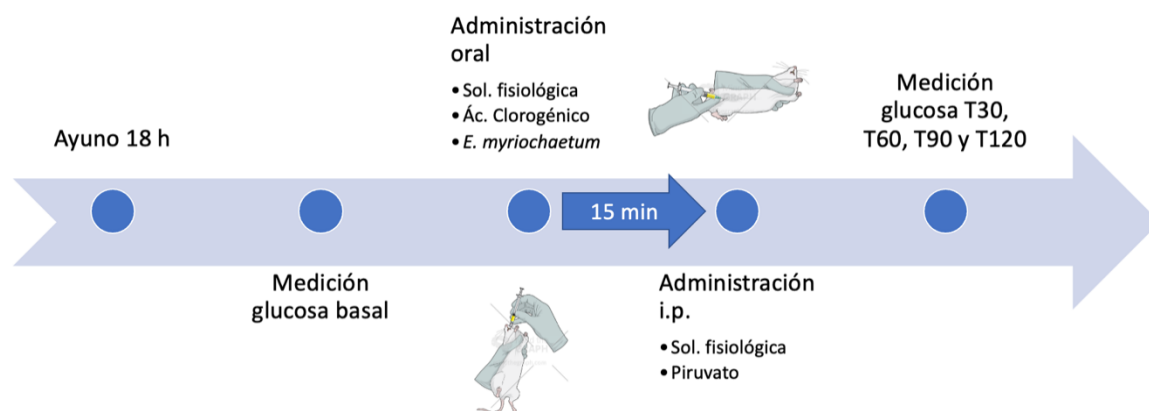


Figura 10. Diagrama del diseño experimental para las pruebas de tolerancia a piruvato.

Se especifican los tiempos de medición de glucosa plasmática, así como los tiempos de administración de los tratamientos. Total, de grupos 6, con una n=6 ratas por grupo.

Aislamiento de microsomas hepáticos y fracción citosólica para ensayos enzimáticos *in vitro*

Se utilizaron cuatro ratas Wistar macho las cuales fueron sometidas a un ayuno de 18 h. Una vez transcurrido ese ayuno, fueron anestesiadas con isoflurano al 5% para obtener el hígado (Unit for Laboratory Animal Medicine, 2022). El órgano fue cortado en fragmentos de aproximadamente 2 g, y fue homogeneizado con un homogeneizador Dounce a 8 golpes en un buffer de sacarosa 250 mM, HEPES 1 mM y EDTA 5 mM (pH 7.4) al 80%.

Después, el homogeneizado se filtró con un fragmento de tela nylon y se sometió a centrifugación diferencial a 4°C. La primera centrifugación se realizó a 1,000 rpm durante 10 min; posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 11,500 rpm por 10 min y, por último, a 31,900 rpm por 60 min. El pellet obtenido (microsomas hepáticos) y el sobrenadante post-mitocondrial (fracción citosólica) fueron conservados a -40 °C en un ultracongelador REVCO (Figura 11).

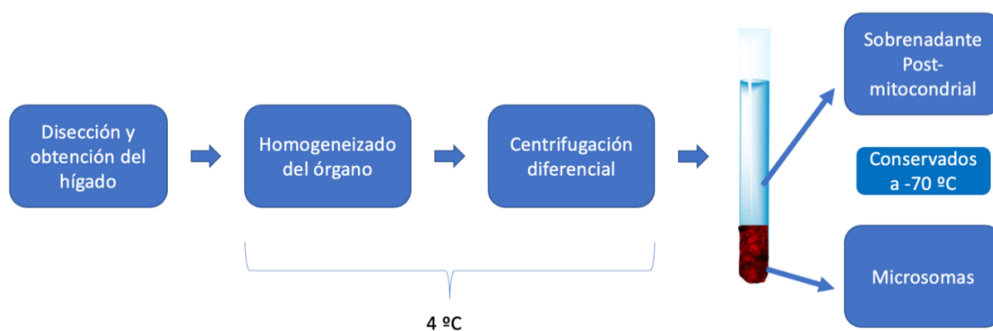


Figura 11. Proceso de extracción de microsomas hepáticos y sobrenadante post-mitocondrial.

Ensayo enzimático de la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa)

Para evaluar el efecto del extracto acuoso de *E. myriochaetum* sobre la actividad enzimática de la G-6-Pasa, se colocaron en un tubo de vidrio: buffer de sacarosa 250 mM e imidazol 20 mM a pH 7 (50 µl), microsomas previamente disueltos en buffer (5, 10 o 15 µl), agua destilada, ácido clorogénico (control positivo) o extracto a distintas concentraciones (0, 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 µg/ml) y, por último, Glucosa-6-fosfato (G-6-P) 20 mM (10 µl). La reacción se dejó llevar a cabo por 20 min a 20°C. Una vez transcurrido ese tiempo, la reacción se

detuvo con 0.9 mL de solución de trabajo para fosfatos (Pi) (0.42% molibdato de amonio, 10% de SDS y 10% de ácido ascórbico) y se incubó a 45°C por 20 min. Finalizado el tiempo de incubación, se midió la densidad óptica a 830 nm. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizó un blanco, al cual se le adicionó la G-6-P después de la primera incubación.

Ensayo enzimático de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa)

Para determinar el efecto de los extractos acuosos de las tres plantas sobre la actividad de la enzima F-1,6-BisPasa, se colocó buffer de EDTA 5 μ M, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7.2 enriquecido con 0.1 mM de F-1,6-BisP (900 μ l), AMP (control positivo) o extracto a diferentes concentraciones (0, 0.2, 0.5, 2, 5, 20, 50, 2000 μ g/ml) y, posteriormente, la reacción se inició colocando sobrenadante post-mitocondrial incubándose a 20°C por 15 min. Transcurrido el tiempo, se paró la reacción enzimática colocando un colorante preparado con verde malaquita y adicionado con molibdato de amonio. Finalmente, se dejó incubar por otros 15 min a una temperatura de 20°C para, después, medir la densidad óptica a 630 nm. El ensayo se realizó por triplicado con un blanco.

Evaluación de los extractos sobre la sensibilidad a la insulina

Para abordar el objetivo referente al efecto de las tres plantas sobre la sensibilidad a la insulina, se administraron los extractos acuosos vía oral diariamente a ratas hiperglucémicas STZ-NA para, finalmente, observar la modificación de parámetros metabólicos relacionados con esta condición fisiopatológica. Las dosis de las plantas que se utilizaron en este experimento fueron aquellas que mostraron un mejor efecto hipoglucemiante en estudios previos (Tabla 3). Los tratamientos fueron administrados por medio de una cánula gastroesofágica a los animales en la mañana y en tarde a lo largo de 42 días con sus tratamientos correspondientes (Tabla 3). Se midieron los valores de glucosa plasmática con glucómetros Accu-Chek® active en los tiempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, mientras que la cuantificación de triglicéridos se realizó en los tiempos 0, 21 y 42 días utilizando el glucómetro Accutrend® Plus (Figura 12). Por último, se extrajeron 100 μ l de sangre

en los días 0 y 42 que fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 minutos, recuperándose aproximadamente 50 µl de suero, el cual se ultracongeló a -40 C para la posterior cuantificación de insulina. El peso de los animales fue registrado de forma semanal. Todas las mediciones fueron realizadas con 12 h de ayuno previo. Para calcular el número de organismos por grupo se utilizaron los resultados de un estudio previo realizado con el extracto de *E. myriochaetum*, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Tamaño de muestra} = \frac{2SD^2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

Donde:

SD = desviación estándar de estudio previo

$Z_{\alpha/2}$ = 1.96 (error tipo 1 de 5%)

Z_{β} = 0.842 (80% de poder)

d (tamaño del efecto) = diferencia entre medias de estudio previo

Se utilizaron las medias y desviaciones estándar de las áreas bajo la curva calculadas de un estudio crónico piloto realizado a ratas hiperglucémicas a las cuales se les administró vía oral solución fisiológica (control negativo) o el extracto acuoso de *E. myriochaetum*.

$$n = \frac{2(1091.6195)^2(1.96 + 0.842)^2}{(7647.75 - 5780.5)^2} = \frac{2(1191633.13)(7.85)}{(1867.25)} = 5.4 = 6$$

Tabla 3. Grupos experimentales y tratamientos correspondientes del experimento crónico para evaluar la sensibilidad a la insulina.

Grupo (n=6)	Tratamiento	Dosis
Normoglucémico (N)	Solución fisiológica	No aplica
Hiperglucémico (H)		
Hiperglucémico + Metformina (HM)	Metformina	500 mg/kg ¹
Hiperglucémico + <i>C. obtusifolia</i> (HCo)	Exto acuoso <i>C. obtusifolia</i>	90 mg/kg ²
Hiperglucémico + <i>E. myriochaetum</i> (HEm)	Exto. acuoso <i>E. myriochaetum</i>	330 mg/kg ³
Hiperglucémico + <i>A. petiolaris</i> (HAp)	Exto. acuoso <i>A. petiolaris</i>	160 mg/kg ⁴

1 Siqueira et al. (2016); **2** Andrade-Cetto & Wiedenfeld (2001); **3** Andrade Cetto et al. (2000); **4** Bustos-Brito et al. (2016)

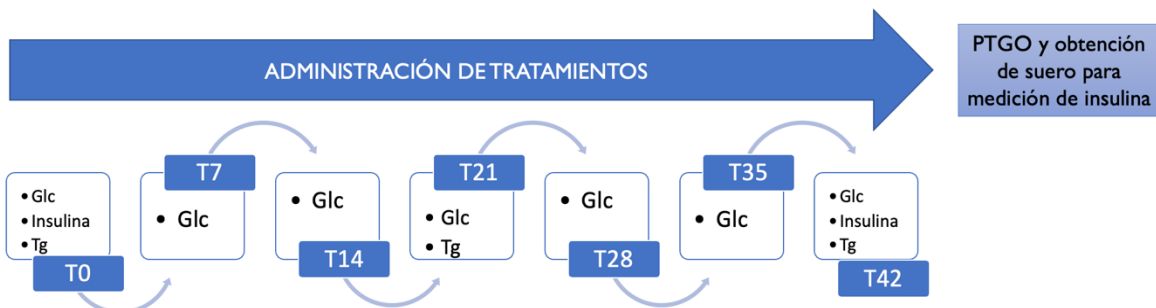


Figura 12. Diseño experimental del estudio crónico.

Se especifican los días de medición para cada parámetro. Glc, glucosa plasmática; Tg, triglicéridos; PTGO: prueba de tolerancia a la glucosa oral.

Al transcurrir los 42 días, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa oral (PTGO), para las cuales se midieron los niveles de glucosa plasmática en el tiempo inicial (T0). Posterior a esto, se administraron 2 g/kg de glucosa anhidra vía oral y se midió la glucosa plasmática a los 30, 60 90 y 120 minutos tras la administración del monosacárido.

Determinación de los índices sobre sensibilidad a la insulina

Se cuantificó la insulina en ayuno de los organismos al inicio (T0) y al término del tratamiento (T42) por medio de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) con un kit comercial (Rat/Mouse Insulin ELISA kit EZRMI-13K EMD Millipore®/Merck), con la finalidad de calcular los índices HOMA-IR y QUICKI empleando las siguientes fórmulas (Patarrão et al., 2014):

$$HOMA - IR = \frac{\text{Insulina plasmática en ayuno} \left(\frac{mU}{L} \right) \times \text{Glucosa plasmática en ayuno} \left(\frac{mmol}{L} \right)}{22.5}$$

$$QUICKI = \frac{I}{\log \text{Insulina plasmática en ayuno} \left(\frac{mU}{L} \right) \times \log \text{Glucosa plasmática en ayuno} \left(\frac{mg}{dL} \right)}$$

Análisis estadístico

Para analizar los resultados de las pruebas de tolerancia a piruvato, se realizaron ANOVAs de una vía seguidas de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, con una significancia de $p < 0.05$. También se calcularon las áreas bajo la curva (AUC), a las cuales también se les realizó ANOVA de una vía seguidas de pruebas de Tukey con $p < 0.05$. De igual manera, los resultados obtenidos del estudio crónico, es decir, los valores de glucosa y triglicéridos, así como las PTGO, se analizaron con ANOVA de una vía, y Tukey como *post hoc* con una significancia de $p < 0.05$. Las AUC fueron calculadas con el programa GraphPad Prism 8.

El cálculo de la concentración de insulina se realizó utilizando una regresión no lineal de 5 parámetros (sugerida por el fabricante) para la posterior interpolación de las absorbancias obtenidas.

Los ensayos de concentración-inhibición respuesta fueron analizados por medio de regresiones no lineales, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de IC_{50} . Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

Pruebas de tolerancia a piruvato

La administración de piruvato de sodio de forma aguda a los animales, tanto normoglucémicos como hiperglucémicos, generó un incremento en los niveles de glucosa plasmática, lo cual muestra que, tras 18 h de ayuno, la vía gluconeogénica se activa en la prueba de tolerancia a piruvato (Figura 13a). Por otro lado, se observó un efecto antihiperglucemiante del ácido clorogénico a lo largo de 120 min y del extracto de *E. myriochaetum* por 90 min al compararlos contra el grupo HP, ya que ambos disminuyeron de manera significativa el aumento de la glucosa plasmática tras la administración de piruvato.

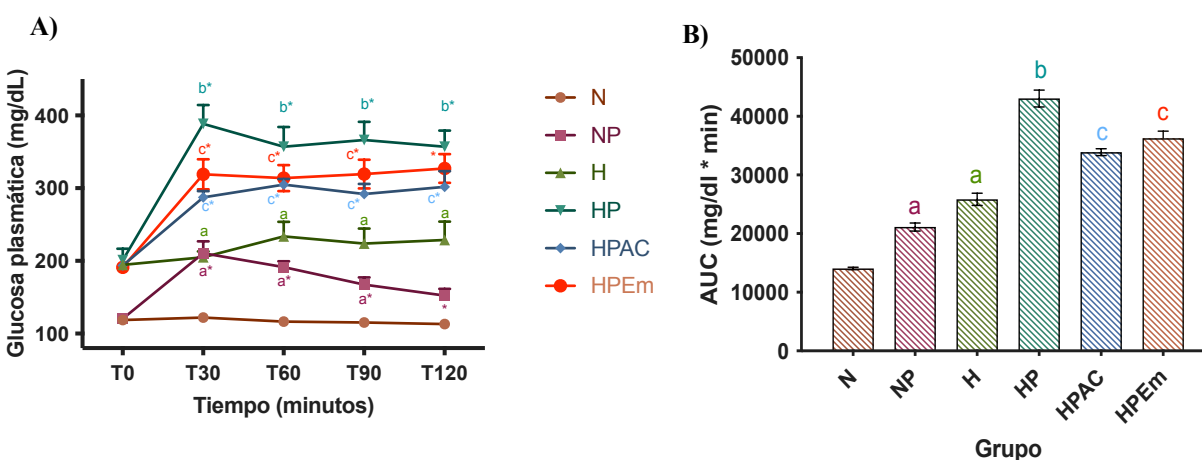


Figura 13. Comportamiento de glucosa plasmática en las pruebas de tolerancia a piruvato.

Panel a) Curvas de glucosa plasmática (medias \pm SEM). ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). ^a indica diferencia significativa vs N en ese tiempo; ^b indica diferencia significativa vs H en ese tiempo; ^c indica diferencia significativa vs HP en ese tiempo; * indica diferencia significativa de ese tiempo vs su T0. **Panel b)** AUC de glucosa plasmática (medias \pm SEM). ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). ^a indica diferencia significativa vs N; ^b indica diferencia significativa vs H; ^c indica diferencia significativa vs HP. Normoglucémico (N), Normoglucémico + piruvato (NP), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + piruvato (HP), Hiperglucémico + piruvato + ác. clorogénico (HPAC), Hiperglucémico + Piruvato + *E. myriochaetum* (HPEm).

Se hizo un análisis de AUC con la finalidad de mostrar los niveles de glucosa plasmática que circularon a lo largo de la prueba, lo cual nos indica, de una forma

más integral, la producción de este carbohidrato que pudo ser inhibida con los tratamientos administrados. Lo primero que se observó fue el incremento significativo del AUC en los grupos normoglucémico e hiperglucémico que fueron administrados con piruvato en comparación con sus respectivos controles sin piruvato (Figura 13b). En el caso de los tratamientos farmacológicos, se observó que, tanto el control positivo (ácido clorogénico) como el extracto de *E. myriochaetum*, redujeron el AUC significativamente respecto a la de HP, lo cual confirma que el tratamiento con el extracto es eficaz para la reducción de la PHG por la vía gluconeogénica.

Realizando un análisis sobre aumento de glucosa plasmática en los primeros 30 min de la prueba, se observó que ambos tratamientos, tanto el ácido clorogénico como el extracto de *E. myriochaetum*, aumentaron los niveles de glucosa plasmática en un 48 y 67% respectivamente contra su tiempo inicial, mientras que el grupo hiperglucémico con piruvato incrementó sus niveles de glucosa en un 94% (Figura 14). Este resultado muestra que el extracto de *E. myriochaetum* y el ácido clorogénico presentan un periodo de latencia bajo, es decir, el tiempo que requieren para ejercer su efecto es corto, ya que la inhibición de la vía metabólica se observa desde la primera medición, es decir, en el T30.

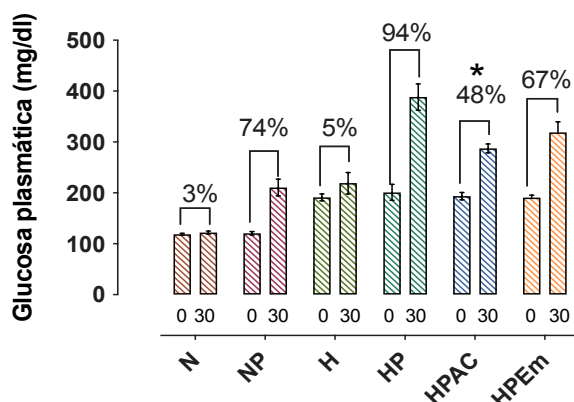


Figura 14. Porcentaje de aumento T0 vs T30 en prueba de tolerancia a piruvato.

Medias \pm SEM. Prueba de t de student ($p < 0.05$) * indica diferencia significativa vs HP. Normoglucémico (N), Normoglucémico + piruvato (NP), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + piruvato (HP), Hiperglucémico + piruvato + ácido clorogénico (HPAC), Hiperglucémico + Piruvato + *E. myriochaetum* (HPEm).

Ensayos enzimáticos de G-6-Pasa

En el ensayo de inhibición concentración-respuesta de la enzima G-6-P con el control positivo ácido clorogénico, se observó que dicho compuesto es capaz de inhibir completamente la actividad de la enzima, además de que se obtiene una IC_{50} de 335 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15). De este modo, se puede inferir que el efecto antihiper glucemiante del ácido clorogénico en la prueba de tolerancia a piruvato está relacionado a esta inhibición.

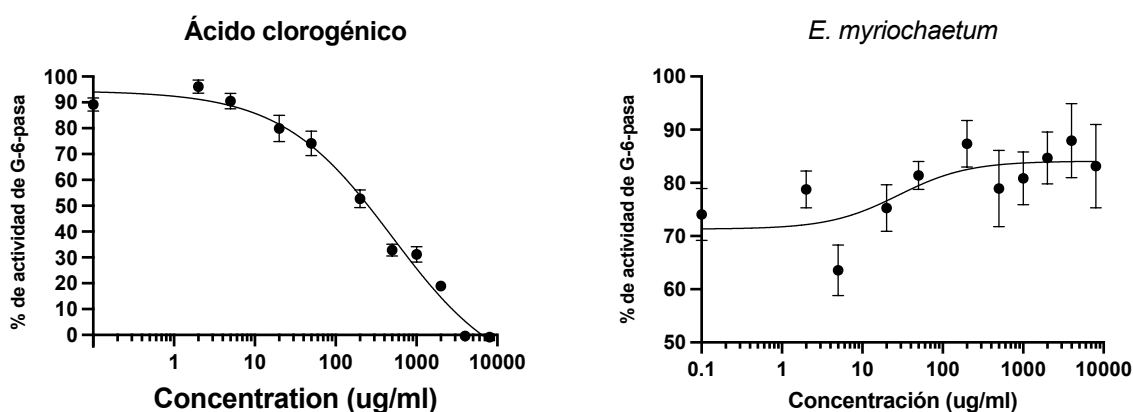


Figura 15. Curvas de inhibición concentración-respuesta de G-6-Pasa con ácido clorogénico y extracto de *E. myriochaetum*.

Cada punto representa tres ensayos por triplicado.

Como se muestra en la Figura 15, el extracto de *E. myriochaetum* no fue capaz de inhibir la actividad de la G-6-Pasa, de modo que el efecto observado en la prueba de tolerancia a piruvato podría deberse a otro mecanismo independiente a la inhibición de esta enzima.

Ensayos enzimáticos de F-1,6-BisPasa

En el ensayo de inhibición concentración-respuesta del control positivo AMP, la actividad enzimática de F-1,6-BisPasa se redujo en un 95% con una IC_{50} de 32 $\mu\text{g/ml}$. Para el caso de los extractos de las plantas *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum*, se obtuvo que la primero disminuyó la actividad enzimática en aproximadamente un 70% con una IC_{50} de 41 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el extracto de *C.*

obtusifolia mostró una IC_{50} de 238 $\mu\text{g/ml}$ y un porcentaje de inhibición del 70%; por último, el extracto de *E. myriochaetum* exhibió un mayor efecto ya que inhibió la enzima en un 90% con una IC_{50} de 64 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 16).

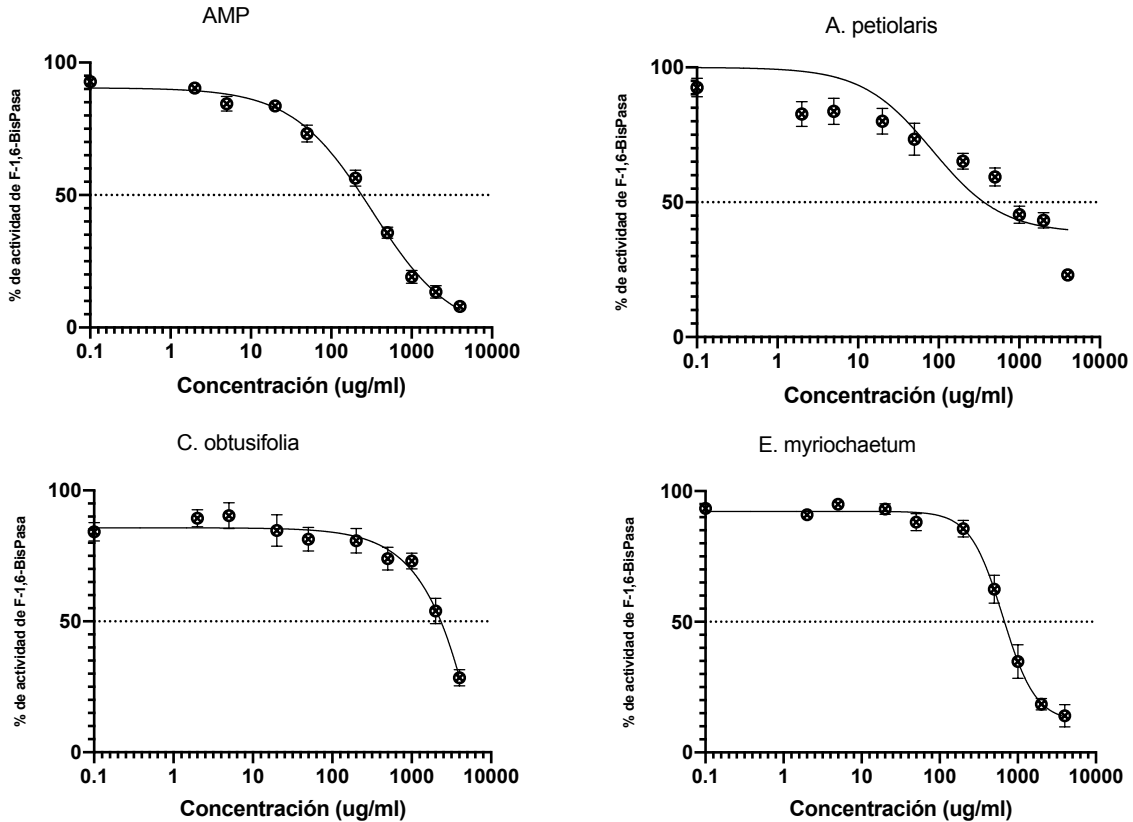


Figura 16. Curvas de inhibición concentración-respuesta de F-1,6-BisPasa con AMP, extracto de *A. petiolaris*, extracto de *C. obtusifolia* y extracto de *E. myriochaetum*.

Cada punto representa tres ensayos por triplicado.

Como se observó en estudios previos, *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* demostraron inhibir la PHG en la prueba de tolerancia a piruvato y, además, disminuyeron la actividad de la enzima G-6-Pasa (Andrade-Cetto & Cárdenas Vázquez, 2010; Espinoza-Hernández, 2017), por lo que, al reportarse la inhibición de la F-1,6-BisPasa en este trabajo, se podría concluir que ambas plantas ejercen un efecto sinérgico para inhibir la vía de producción de glucosa al disminuir la actividad de dos enzimas paso limitantes de la gluconeogénesis. Para el caso de *E. myriochaetum*, el efecto antihiper glucemiante observado en la prueba de tolerancia a piruvato puede deberse al efecto inhibitorio únicamente sobre esta enzima, ya que no inhibió la actividad de G-6-Pasa.

Evaluación de los extractos sobre la sensibilidad a la insulina

A lo largo de 42 días se observó que las ratas hiperglucémicas mantuvieron niveles estables de glucosa plasmática alrededor de los 200 mg/dl, mientras que el control normoglucémico se mantuvo alrededor de los 100 mg/dl. El efecto hipoglucemiante del control positivo (metformina) se observó desde el día siete y se mantuvo hasta el día 35 de la administración del tratamiento, ya que, para el día 42, se observó un aumento en los niveles de glucosa plasmática de estos organismos.

Al analizar el comportamiento de los extractos de *A. petiolaris* y *E. myriochaetum*, se distinguió el efecto hipoglucemiante generado por los extractos desde el día siete de administración y, al igual que en el caso de metformina, este efecto se mantuvo hasta el día 35, sin embargo, en el caso de *C. obtusifolia*, el efecto hipoglucemiante significativo se observó a lo largo de los 42 días del experimento (Figura 17).

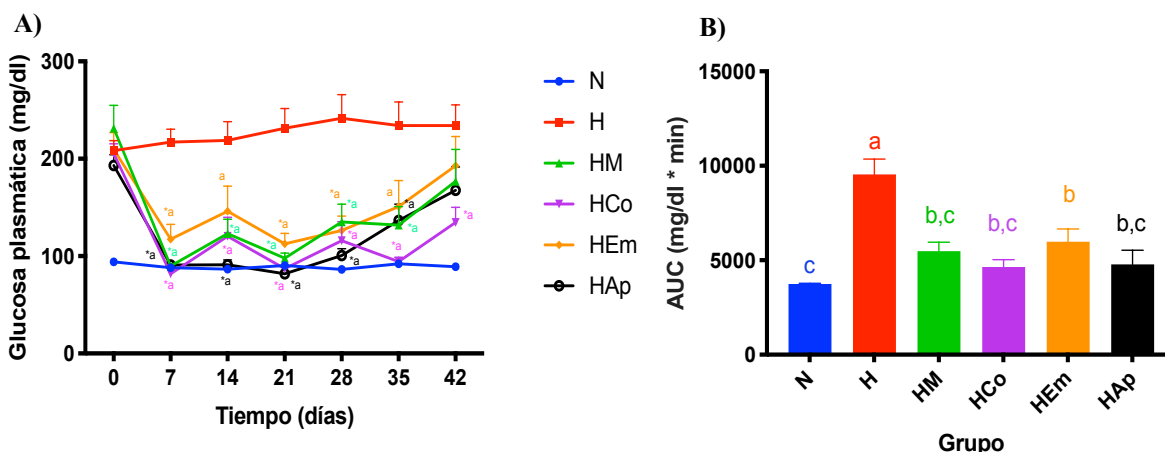


Figura 17. Comportamiento de la glucosa plasmática a lo largo de los 42 días de experimentación. **Panel a)** Curvas de glucosa plasmática (medias ± SEM). ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). ^a indica diferencia significativa vs. H en ese tiempo; * indica diferencia significativa de ese tiempo vs. su T0. **Panel b)** AUC de glucosa plasmática (medias ± SEM). ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($a > b > c$; $p < 0.05$). Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + metformina (HM), Hiperglucémico + *C. obtusifolia* (HCo), Hiperglucémico + *E. myriochaetum* (HEm), Hiperglucémico + *A. petiolaris* (HAp).

Al analizar el AUC de cada uno de los grupos, se observó que todos los tratamientos (metformina, *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum*) disminuyeron los niveles de glucosa a lo largo de los 42 días, de modo que, aunque algunos tratamientos perdieron la significancia estadística en el tiempo final, el análisis global muestra que todos los tratamientos tuvieron un efecto hipoglucemiante (Figura 17b).

En el caso de los triglicéridos (Figura 18), se observó que el grupo hiperglucémico mostró un aumento significativo en los niveles de este parámetro desde los 21 días, elevándose aún más en el día 42, sin embargo, tras la administración de los tratamientos (metformina, *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum*), los triglicéridos no incrementaron, manteniéndose similares a los organismos normoglucémicos, de modo que, además del efecto hipoglucemiante, los extractos ejercieron un efecto antihiperlipidémico.

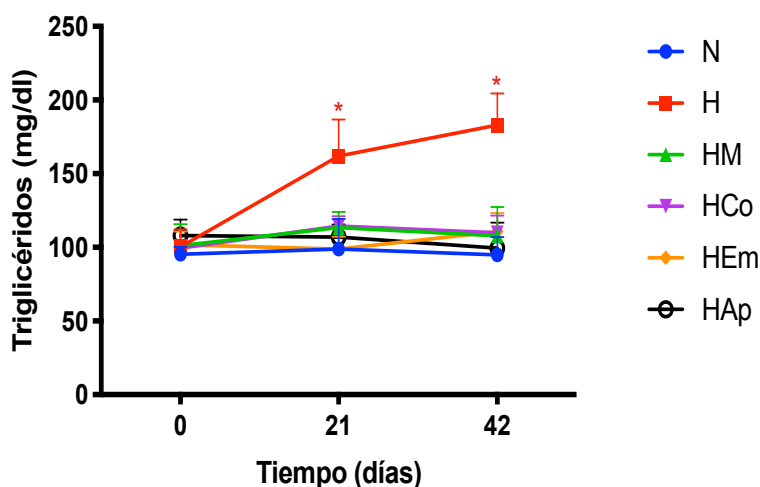


Figura 18. Niveles de triglicéridos a lo largo de los 42 días de experimentación.

Medias \pm SEM. ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

* indica diferencia significativa vs T0. Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + metformina (HM), Hiperglucémico + *C. obtusifolia* (HCo), Hiperglucémico + *E. myriochaetum* (HEm), Hiperglucémico + *A. petiolaris* (HAp).

Al finalizar los 42 días de tratamiento, se realizaron PTGO a cada organismo, en las cuales, se observó que el extracto que mejoró más la tolerancia a la glucosa oral fue el de *C. obtusifolia*, ya que disminuyó más los niveles de glucosa en los tiempos

90 y 120, igualando el efecto observado con el fármaco control (metformina). El extracto de *A. petiolaris* disminuyó los niveles de glucosa respecto al grupo hiperglucémico sólo en el tiempo final. En el caso de *E. myriochaetum*, aunque se mostró una tendencia a reducir los niveles de glucosa, no hubo diferencia significativa respecto al grupo hiperglucémico en ningún tiempo (Figura 19a).

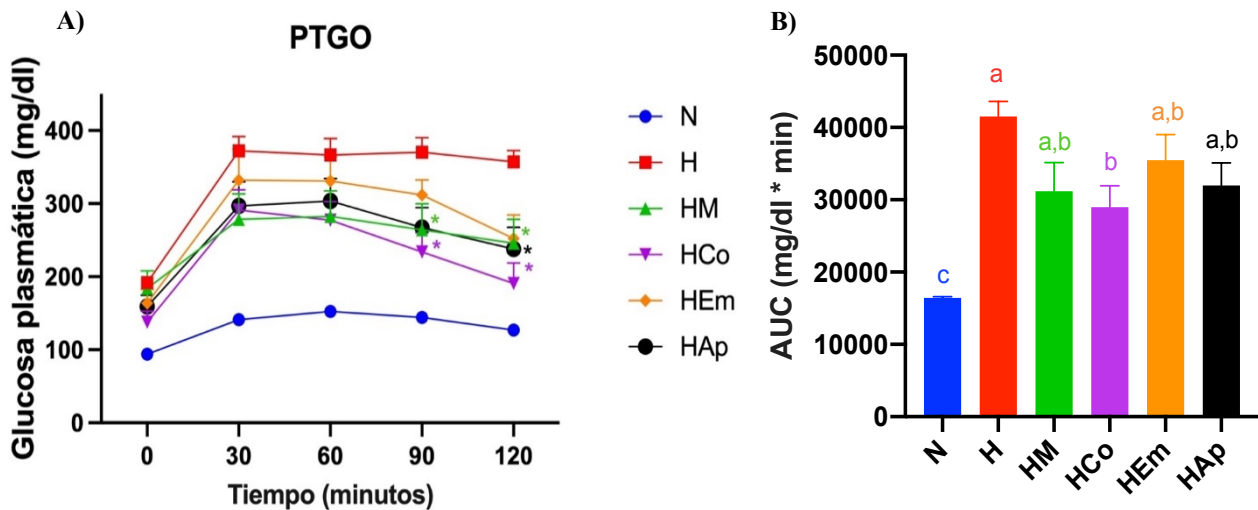


Figura 19. Comportamiento de la glucosa plasmática en las PTGO al finalizar los tratamientos.

Panel a) Curvas de glucosa plasmática (medias \pm SEM). ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). * indica diferencia significativa vs. H. **Panel b)** AUC de PTGO (medias \pm SEM). ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($a > b > c$; $p < 0.05$). Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + metformina (HM), Hiperglucémico + *C. obtusifolia* (HCo), Hiperglucémico + *E. myriochaetum* (HEm), Hiperglucémico + *A. petiolaris* (HAp).

El análisis de AUC de las PTGO confirmó que el extracto con mejor efecto en la tolerancia a la glucosa fue el de *C. obtusifolia*, ya que fue el único que mostró diferencia significativa respecto al grupo hiperglucémico. Sin embargo, los extractos de *A. petiolaris* y *E. myriochaetum* mostraron una tendencia a disminuir los niveles de glucosa plasmática respecto al grupo control negativo y, además, no fueron diferentes estadísticamente con el grupo de *C. obtusifolia*, lo cual podría sugerir que sí tienden a mejorar la tolerancia a la glucosa (Figura 19b).

Por último, se analizaron los niveles de insulina y glucosa en ayuno antes y después de los tratamientos, así como los índices HOMA-IR y QUICKI (Figura 20). Respecto a la insulina, se observó que el tratamiento con los extractos disminuyó los niveles de este parámetro en comparación con en su tiempo inicial (Figura 20A). Al observar sus niveles de glucosa plasmática, estos organismos mantuvieron niveles similares al tiempo inicial, pero con menos insulina circulando en el T42 e, incluso, en el caso de la metformina y el extracto de *C. obtusifolia*, la glucosa disminuyó respecto al valor inicial, lo cual podría indicar una mayor sensibilidad a dicha hormona (Figura 20B).

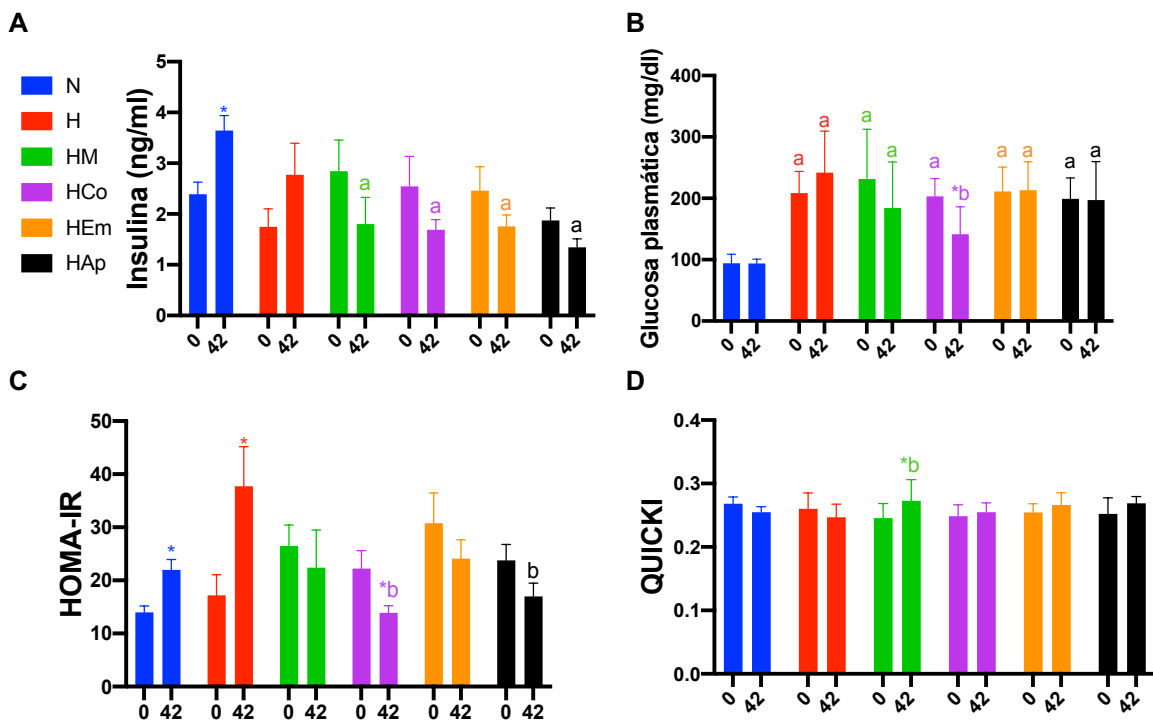


Figura 20. Valores de insulina, glucosa, HOMA-IR y QUICKI.

Media \pm SEM. **Panel A)** muestra los valores de insulina plasmática en ayuno. **Panel B)** Valores de glucosa plasmática en ayuno. **Panel C)** valores del HOMA-IR. **Panel D)** Valores del índice QUICKI. ANOVA de una vía seguida de pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). * indica diferencias significativas vs T0, ^a diferencias significativas vs N, ^b diferencias significativas vs H. Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + metformina (HM), Hiperglucémico + *C. obtusifolia* (HCo), Hiperglucémico + *E. myriochaetum* (HEm), Hiperglucémico + *A. petiolaris* (HAp).

El índice HOMA-IR, calculado con base en los niveles de insulina y de glucosa plasmática, mostró que los extractos de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* disminuyeron significativamente dicho índice respecto al grupo hiperglucémico en el tiempo 42, lo cual apoya la hipótesis de que la administración de dichos extractos favoreció una adecuada función de la insulina (Figura 20C). Por último, el índice QUICKI no se vio modificado significativamente por los extractos, sin embargo, la administración de metformina aumentó de manera significativa dicho parámetro, lo cual nos indica un aumento en la sensibilidad a la insulina tras el tratamiento con el fármaco (Figura 20D).

DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales es muy importante debido a que son un recurso vital para el tratamiento local de enfermedades en comunidades alrededor del mundo. Se estima que el 85% de la población mundial depende de las plantas como fuente primaria de tratamiento.. La confianza que tiene la población en la efectividad de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, aunado a la alta prevalencia de DM2 en México y a una baja estabilidad económica, convierte a éstas en un recurso importante para el tratamiento de DM2 en nuestro país (Andrade-Cetto et al., 2017). Por lo anteriormente mencionado, el análisis del efecto hipoglucemiante y de la dilucidación del mecanismo por el cual *A. petiolaris*, *C. obtusifolia* y *E. myriochaetum* disminuyen los niveles de glucosa plasmática en las personas con DM2 es de suma importancia.

La producción de glucosa por parte del hígado es uno de los factores principales que contribuyen a la hiperglucemia en ayuno presente en el paciente diabético, siendo la vía gluconeogénica la principal, ya que se ha descrito que la glucogenólisis no se encuentra alterada en el paciente diabético. Los valores de glucosa plasmática en ayuno son muy importantes, ya que la hiperglucemia en ayuno (>110 mg/dl) está asociada a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Fonseca, 2003).

La gluconeogénesis es la vía por la cual se sintetiza glucosa *de novo*, es decir, se obtiene a partir de sustratos que no son hexosas, siendo el piruvato, glicerol y algunos aminoácidos los principales sustratos de ésta. Cabe destacar que esta vía metabólica tiene cuatro pasos regulatorios, los cuales son llevados a cabo por las enzimas PC, PEPCK, F-1,6-BisPasa y G-6-Pasa. Los sustratos mencionados anteriormente no entran a la vía metabólica en el mismo paso; por un lado, los aminoácidos y el piruvato entran desde el inicio de la vía metabólica, es decir, son transformados por las cuatro enzimas paso limitantes mencionadas; sin embargo, el glicerol evita las reacciones regulatorias realizadas por PC y PEPCK, alimentando

a la vía gluconeogénica a partir de la enzima F1,6-BisPasa, por lo que se podría decir que esta enzima es la que regula la entrada de cualquier sustrato gluconeogénico (Barthel & Schmoll, 2003; Hanson & Owen, 2013).

El extracto de *E. myriochaetum* fue capaz de inhibir la gluconeogénesis en la prueba de tolerancia a piruvato, al igual que los extractos de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia*. Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales ejercen dicha inhibición son distintos, ya que *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* inhiben a dos enzimas reguladoras de la vía (G-6-Pasa y la F-1,6-BisPasa), mientras que *E. myriochaetum* sólo inhibe a la enzima F-1,6-BisPasa. Cabe destacar que la inhibición de esta enzima es muy importante para la regulación de la vía gluconeogénica y tiene una mayor relevancia terapéutica debido a que, al bloquear esta enzima, se frena por completo el flujo gluconeogénico debido a que involucra la entrada de todos los sustratos que alimentan la vía (Kaur et al., 2017a).

Se ha reportado que inhibir otras enzimas de la vía gluconeogénica puede generar efectos adversos que no son observados al disminuir la actividad de F-1,6-BisPasa. Por ejemplo, inhibir la isoforma mitocondrial de PEPCK se ha asociado a la alteración del balance redox en la mitocondria y a un incremento en los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lo cual disminuye la tasa de β -oxidación, generando esteatosis hepática. Por otro lado, inhibir a la isoforma citosólica de PEPCK se ha relacionado a la incidencia de cáncer de colon. Para el caso de la inhibición de enzima G-6-Pasa, se han encontrado efectos adversos extrahepáticos, como disfunciones en monocitos y neutrófilos, además de generar hipoglucemia y esteatosis hepática (Kaur et al., 2017a).

La investigación sobre el diseño de nuevas moléculas capaces de inhibir a la F-1,6-BisPasa ha tomado una mayor relevancia debido a que personas con una deficiencia hereditaria de F-1,6-BisPasa presentan un desarrollo y vida normal (Heng et al., 2010), es decir, la disminución en la actividad de esta enzima no ha reportado efectos adversos observables.

En este sentido, se han documentado al menos tres clases principales de inhibidores de la enzima F-1,6-BisPasa: 1) los que interactúan con el sitio de unión del sustrato (inhibidor competitivo), 2) los que actúan en la zona central de la enzima (acompetitivos) y 3) los que se unen al sitio de unión del AMP (no competitivos), siendo los acompetitivos y los no competitivos los más relevantes. Entre los inhibidores acompetitivos encontramos a los derivados de anilinoquinazolininas, pseudo-tetrapéptidos y los derivados de quinolina, mientras que, para el caso de los no competitivos, son descritos una mayor cantidad de compuestos: los derivados de purinas, de benzimidazol, de tiazol, de oxaxazol, de benzoxazol, entre otros (Kaur et al., 2017b).

El estudio de estos inhibidores ha llegado hasta las fases clínicas, entre los que podemos encontrar a los compuestos CS-917, MB07803 y MB07729, los cuales han avanzado a la fase 2 de investigación (Kaur et al., 2017b; Proença et al., 2020; Sharma et al., 2021). Por otra parte, entre los productos naturales que han sido evaluados como inhibidores de la enzima F-1,6-BisPasa se encuentran la galangina, hesperidina, geraniol, baicaleina, scutellareina, herbacetina y el kaempferol (Proença et al., 2020). Previamente se describió que el extracto de *E. myriochaetum* contiene kaempferol en su composición fitoquímica, y como resultados de este trabajo se reportó que este extracto inhibió la actividad de la enzima F-1,6-BisPasa. Al contrastar este resultado obtenido con el trabajo realizado por Proença y colaboradores (2020), los autores mencionan que el kaempferol sólo inhibió la actividad de la enzima F-1,6-BisPasa en un 20%, de modo que el efecto observado en este trabajo se pudo deber a una sinergia entre el kaempferol con algún otro compuesto presente en el extracto de *E. myriochaetum*.

La RI es una condición que está asociada a un mayor riesgo de padecer tanto enfermedades cardiovasculares, como DM2. Clínicamente, la RI también es conocida como el síndrome X, síndrome de RI o síndrome metabólico. Para medir la RI se cuenta con diversas aproximaciones, siendo la pinza hiperinsulinémica

euglicémica el estándar de oro, sin embargo, debido a lo invasivo de dicha prueba se han desarrollado otros medios para la evaluación de la RI, como el HOMA-IR, HOMA2, QUICKI, el índice de triglicéridos/glucosa y el índice Matsuda. De los índices mencionados, el índice HOMA-IR es uno de los más utilizados y se encuentra fuertemente correlacionado con la pinza hiperinsulinémica euglicémica (Tahapary et al., 2022).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una disminución de los niveles de glucosa en ayuno tras el tratamiento crónico de los extractos de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* a lo largo de los 42 días, mientras que *E. myriochaetum* reduce la glucemia a lo largo de 35 días. Sin embargo, el análisis de AUC muestra que el efecto hipoglucemiante ejercido por los tres extractos es significativo al compararlo con el grupo hiperglucémico. Como se mencionó previamente, el incremento en los niveles de glucosa en ayuno se debe principalmente a la producción de glucosa por parte del hígado a causa de la RI, de modo que una reducción en los niveles de glucosa en ayuno puede significar una mejora en la sensibilidad a la insulina hepática. Los principales componentes químicos de *A. petiolaris* (L-quirositol y ácido clorogénico) (Bustos-Brito et al., 2016), de *C. obtusifolia* (ácido clorogénico e isoorientina) (Andrade-Cetto & Cárdenas Vázquez, 2010) y de *E. myriochaetum* (kaempferol) (Wiedenfeld et al., 2000) podrían estar involucrados en el mejoramiento de la función de la insulina observado en el presente trabajo.

El ácido clorogénico, un tipo de ácido hidroxicinámico, ha demostrado tener un efecto inhibitorio directo sobre la G-6-Pasa, es decir, disminuye la producción de glucosa. Además, se ha observado que el ácido clorogénico aumenta la fosforilación de AMPK. Al fosforilarse, AMPK disminuye la glucosa plasmática en ayuno al inhibir la PHG debido a la reducción en la expresión de la enzima G-6-Pasa. Por otra parte, se ha reportado que AMPK mejora la tolerancia a la glucosa debido a que favorece la traslocación del glucotrasportador dependiente de insulina GLUT4 en el músculo esquelético y, adicionalmente, la activación de esta cinasa favorece la disminución

de triglicéridos (Naveed et al., 2018; Ong et al., 2013). En este sentido, la disminución de glucosa y de triglicéridos tras la administración crónica de los extractos de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* en este estudio, puede deberse en gran parte al efecto ejercido por el ácido clorogénico que se encuentra presente en ambos extractos; sin embargo, no debe descartarse algún posible efecto sinérgico generado con otros componentes de los extractos. Ambos extractos disminuyeron el índice HOMA-IR de manera significativa respecto al grupo hiperglucémico, por lo que la mejoría en la sensibilidad a la insulina podría deberse a la activación de AMPK generada por el ácido clorogénico.

Para el caso de *E. myriochaetum*, el flavonol kaempferol es uno de los principales componentes del extracto de dicha planta. Se ha reportado que el kaempferol es capaz de disminuir la PHG, así como los niveles de glucosa en ayuno en ratones alimentados con dieta alta en grasa. También, se ha documentado la disminución en la actividad de la enzima PC por kaempferol, es decir, este compuesto inhibe la vía gluconeogénica desde el primer paso regulatorio. Este metabolito también incrementa la fosforilación de la enzima Akt, lo cual puede indicar un mejoramiento en la transducción de la señal de la insulina (Alkhalidy, Moore, Wang, Luo, McMillan, Wang, et al., 2018).

En otros estudios, se ha observado que el kaempferol no modifica la cantidad de enzima PC presente en ratones hiperglucémicos, es decir, el efecto inhibitorio sobre esta enzima es directamente sobre su actividad y no modifica la expresión de otras enzimas paso limitantes de la gluconeogénesis, como PEPCK y G-6-Pasa. Por último, este compuesto aumenta la concentración de glucógeno almacenado en el hígado, sin modificar el metabolismo oxidativo de la glucosa (Alkhalidy, Moore, Wang, Luo, McMillan, Zhen, et al., 2018).

Al comparar los efectos descritos del kaempferol con el efecto observado por el extracto de *E. myriochaetum* en este estudio, se puede concluir que hay un consenso, es decir, el extracto disminuyó significativamente los niveles de glucosa

plasmática en ayuno al compararlo con el grupo hiperglucémico, además de que inhibió la PHG en la prueba de tolerancia a piruvato. Sin embargo, para determinar si el efecto de inhibición de la gluconeogénesis por esta planta está dado, en mayor proporción, por la enzima F-1,6-BisPasa o por PC, se propone realizar pruebas de tolerancia al glicerol, ya que, de esta manera, se podría evaluar el efecto de la F-1,6-BisPasa en la inhibición de la vía de forma más específica.

La comprobación de la disminución de la RI por parte de los extractos de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia*, determinada por la reducción significativa en el índice HOMA-IR, es un punto crucial para su efecto terapéutico, ya que la RI es la principal característica de la DM2. Es importante continuar con más estudios para dilucidar cómo se da esta mejora en la RI y, de esta manera, contribuir a la descripción de sus mecanismos de acción en el tratamiento de la DM2, que es una enfermedad con una alta prevalencia en nuestro país. Para el caso de *E. myriochaetum*, también es importante describir cómo realiza la inhibición de la PHG, con la finalidad de coadyuvar a las personas que utilizan esta especie y que padecen síndrome metabólico o que se encuentran en fases iniciales de DM2.

CONCLUSIONES

El extracto de *E. myriochaetum* fue capaz de inhibir la gluconeogénesis hepática en las pruebas de tolerancia a piruvato, por lo que se concluye que uno de los mecanismos por los cuales dicha planta ejerce su efecto hipoglucemiante, previamente reportado, se debe a la disminución de la producción de glucosa por parte del hígado. Es importante mencionar que este extracto no inhibió la actividad de la enzima G-6-Pasa, de modo que la disminución de la glucosa tras la administración de piruvato a las ratas hiperglucémicas STZ-NA, se debe a la inhibición de la enzima F-1,6-BisPasa, o bien, a otro posible mecanismo de acción.

En cuanto a la inhibición de la enzima F-1,6-BisPasa, los extractos de las tres plantas fueron capaces de inhibir dicha enzima, por lo que la inhibición de la gluconeogénesis por parte de *A. petiolaris* y *C. obtusifolia* se debe en parte al efecto inhibitorio ejercido sobre las dos enzimas paso limitantes de la vía, es decir, la G-6-Pasa y la F-1,6-BisPasa.

Tras la administración crónica de los extractos en ratas hiperglucémicas STZ-NA, se observó que tanto *A. petiolaris* como *C. obtusifolia* lograron disminuir el índice HOMA-IR al compararlo con el control hiperglucémico, de modo que el tratamiento con estos extractos disminuye la RI.

Al ser utilizadas estas plantas como “agua de uso”, la inhibición de la enzima F-1,6-BisPasa toma una gran relevancia al ser una de las enzimas claves en la vía gluconeogénica, ya que esa vía metabólica se encuentra activa de manera constante en la persona con diabetes debido a la RI hepática, de modo, que al ser tomadas a lo largo del día de forma tradicional, la gluconeogénesis es inhibida, trayendo como consecuencia la disminución y el control de los niveles de glucosa.

PERSPECTIVAS

Debido a que el glicerol es un sustrato gluconeogénico que evita dos pasos regulatorios de la vía (las reacciones catalizadas por las enzimas PEPCK y PC), se sugiere la realización de pruebas de tolerancia a glicerol, con la finalidad de comparar dicho resultado con lo obtenido en las pruebas de tolerancia a piruvato y, de manera indirecta, determinar si los extractos pueden estar inhibiendo a las enzimas PEPCK y PC.

Para la determinación de qué mecanismo es el responsable de reducir la RI, se sugiere la realización de otros estudios en donde se evalúe directamente la fosforilación de los componentes de la vía de señalización de la insulina en los hígados de las ratas tratadas con los extractos, como los IRS o la proteína cinasa Akt.

Adicionalmente, se sugiere analizar si el tratamiento crónico de los extractos aumenta el almacenamiento de la glucosa en el hígado, es decir, medir la cantidad de glucógeno presente en el tejido tras la administración crónica del extracto. Por último, también se recomienda determinar si el tratamiento crónico con los extractos puede modificar los niveles de expresión de las enzimas gluconeogénicas PC, PEPCK, F-1,6-BisPasa y G-6-Pasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, B., Sultana, R., & Greene, M. W. (2021). Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137(December 2020), 111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, A., Luo, J., McMillan, R. P., Wang, Y., Zhen, W., Hulver, M. W., & Liu, D. (2018). Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.014>
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, Y., Luo, J., McMillan, R., Zhen, W., Zhou, K., & Liu, D. (2018). The Flavonoid Kaempferol Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing Hepatic Glucose Production. *Molecules*, 23(9), 2338. <https://doi.org/10.3390/molecules23092338>
- American Diabetes Association. (2021). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement_1), S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., & Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.031>
- Andrade-Cetto, A., Cabello-Hernández, C. A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2015). Alpha-Glucosidase Inhibiting Activity of Five Mexican Plants Used in the Treatment of Type 2 Diabetes . *PharmacologyOnLine*, 1, 67–71.
- Andrade-Cetto, A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.016>
- Andrade-Cetto, A., & Cárdenas Vázquez, R. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 93–97.
- Andrade-Cetto, A., Escandón-Rivera, S. M., Torres-Valle, G. M., & Quijano, L. (2017). Phytochemical composition and chronic hypoglycemic effect of

- rhizophora mangle cortex on STZ-NA-induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(6), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.007>
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2011). From the field into the lab: useful approaches to selecting species based on local knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00020>
- Andrade-Cetto, A., & Wiedenfeld, H. (2001). Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 145–149. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00335-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00335-X)
- Andrade Cetto, A., Wiedenfeld, H., Revilla, M. C., & Islas, S. (2000). Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 129–133. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00218-X)
- Bao, L., Li, J., Zha, D., Zhang, L., Gao, P., Yao, T., & Wu, X. (2018). Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF-κB pathways. *International Immunopharmacology*, 54(November 2017), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.021>
- Barthel, A., & Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(4), E685–E692. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00253.2003>
- Bustos-Brito, C. (2016). *AISLAMIENTO , DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES DEL GÉNERO Ageratina*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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*, 185, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.048>

- Choi, S. I., Lee, H. A., & Han, J. S. (2016). Gynura procumbens extract improves insulin sensitivity and suppresses hepatic gluconeogenesis in C57BL/KsJ-db/db mice. *Nutrition Research and Practice*, *10*(5), 507–515. <https://doi.org/10.4162/nrp.2016.10.5.507>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2022). *Cecropia obtusifolia*. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/49-morac3m.pdf
- Cruz, E. C., & Andrade-Cetto, A. (2015). Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, *159*, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.021>
- Csala, M., Margittai, É., Senesi, S., Gamberucci, A., Bánhegyi, G., Mandl, J., & Benedetti, A. (2007). Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. *FEBS Letters*, *581*(8), 1693–1698. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.045>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *July*, 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Elgorriaga, A., Escapa, I. H., Rothwell, G. W., Tomescu, A. M. F., & Rubén Cúneo, N. (2018). Origin of Equisetum : Evolution of horsetails (Equisetales) within the major euphyllophyte clade Sphenopsida. *American Journal of Botany*, *105*(8), 1286–1303. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1125>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. Lou, Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., & Gabbay, R. A. (2023). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*, *46*(Supplement_1), S140–S157. <https://doi.org/10.2337/dc23-S009>
- Engel, H., Xiong, L., Reichenberger, M. A., Germann, G., Roth, C., & Hirche, C.

- (2019). Rodent models of diet-induced type 2 diabetes mellitus: A literature review and selection guide. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1), 195–200.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.020>
- Escandón-Rivera, S. M., Mata, R., & Andrade-Cetto, A. (2020). Molecules isolated from Mexican hypoglycemic plants: A review. *Molecules*, 25(18), 1–33.
<https://doi.org/10.3390/molecules25184145>
- Espino, J. D. (2010). Diagnosis and management of type 2 diabetes. *Atencion Primaria*, 42(SUPPL. 1), 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(10\)70002-0](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(10)70002-0)
- Espinoza-Hernández, F. A. (2017). EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti Y DE LA PARTE AÉREA DE *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. SOBRE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA EN RATAS STZ-NA. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ferrannini, E. (2012). Physiology of glucose homeostasis and insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(1), 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.01.003>
- Fonseca, V. (2003). Clinical significance of targeting postprandial and fasting hyperglycemia in managing type 2 diabetes mellitus. *Current Medical Research and Opinion*, 19(7), 635–631.
<https://doi.org/10.1185/030079903125002351>
- Gheibi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95(24), 605–613.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.098>
- Giovannini, P., Howes, M.-J. R., & Edwards, S. E. (2016). Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 58–71.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.034>
- Gizak, A., Duda, P., Wisniewski, J., & Rakus, D. (2019). Fructose-1,6-bisphosphatase: From a glucose metabolism enzyme to multifaceted regulator

- of a cell fate. *Advances in Biological Regulation*, 72(February), 41–50.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.001>
- Gökçay Canpolat, A., & Şahin, M. (2021). Glucose Lowering Treatment Modalities of Type 2 Diabetes Mellitus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1307, 7–27. https://doi.org/10.1007/5584_2020_516
- Govindarajan, S., Babu, S. N., Vijayalakshmi, M. A., Manohar, P., & Noor, A. (2021). Aloe vera carbohydrates regulate glucose metabolism through improved glycogen synthesis and downregulation of hepatic gluconeogenesis in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 281.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114556>
- Goyal, S. N., Reddy, N. M., Patil, K. R., Nakhate, K. T., Ojha, S., Patil, C. R., & Agrawal, Y. O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*, 244, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>
- Guerra, S., & Gastaldelli, A. (2020). The role of the liver in the modulation of glucose and insulin in non alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 55, 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.10.016>
- Hamilton, J. S., & Klett, E. L. (2021). Linoleic acid and the regulation of glucose homeostasis: A review of the evidence. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 175(July), 102366.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2021.102366>
- Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). Gluconeogenesis. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00040-2>
- Hari Kumar, K. V. S. (2020). The good, the bad, and the ugly facets of insulin resistance. *Medical Journal Armed Forces India*, 76(1), 4–7.
<https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2019.07.001>
- Heinrich, M., & Jäger, A. K. (Eds.). (2015). *Ethnopharmacology* (Primera). John Wiley & sons Ltd.

- Heng, S., Harris, K. M., & Kantrowitz, E. R. (2010). Designing inhibitors against fructose 1,6-bisphosphatase: exploring natural products for novel inhibitor scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(4), 1478–1484.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.055>
- Husby, C. (2013). Biology and Functional Ecology of Equisetum with Emphasis on the Giant Horsetails. *The Botanical Review*, 79(2), 147–177.
<https://doi.org/10.1007/s12229-012-9113-4>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). Estadísticas a propósito del día mundial de la Diabetes (14 de noviembre). Datos nacionales. *Comunicado de Prensa. No. 645/21, 2019*, 1–5.
<https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10th ed.). International Diabetes Federation. www.diabetesatlas.org
- Jia, Y., Guo, D., Sun, L., Shi, M., Zhang, K., Yang, P., Zang, Y., Wang, Y., Liu, F., Chen, G.-C., Zhang, Y., & Zhu, Z. (2022). Diet, Lifestyle Behaviour and Other Risk Factors Associated With Type 2 Diabetes Beyond Body Mass Index: A Mendelian Randomization Study. *Canadian Journal of Diabetes*.
<https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2022.06.001>
- Katz, A., Nambi, S. S., Mather, K., Baron, A. D., Follmann, D. A., Sullivan, G., & Quon, M. J. (2000). Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(7), 2402–2410.
<https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6661>
- Kaur, R., Dahiya, L., & Kumar, M. (2017a). Fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors: A new valid approach for management of type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 473–505.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.029>
- Kaur, R., Dahiya, L., & Kumar, M. (2017b). Fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors: A new valid approach for management of type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 473–505.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.09.029>

- Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V., & Sankaran, U. (2021). Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review. *Laboratory Animal Research*, 37(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s42826-021-00101-4>
- Krako Jakovljevic, N., Pavlovic, K., Zujovic, T., Kravic-Stevovic, T., Jotic, A., Markovic, I., & Lalic, N. M. (2021). In vitro models of insulin resistance: Mitochondrial coupling is differently affected in liver and muscle cells. *Mitochondrion*, 61, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.10.001>
- Leithner, K. (2021). New roles for gluconeogenesis in vertebrates. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100389>
- Li, J., Yu, H., Wang, S., Wang, W., Chen, Q., Ma, Y., Zhang, Y., & Wang, T. (2018). Natural products, an important resource for discovery of multitarget drugs and functional food for regulation of hepatic glucose metabolism. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 121–135.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S151860>
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., & Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47(2), 224–229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519717>
- Mata-Torres, G., Andrade-Cetto, A., Espinoza-Hernández, F. A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2020). Hepatic Glucose Output Inhibition by Mexican Plants Used in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 11(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00215>
- Moreno-Vargas, A. D. (2019). *Estudio del efecto del extracto acuoso de la parte aérea de Ageratina petiolaris (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. y del L-quirositol sobre la secreción de insulina en ratas STZ-NA*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(August

- 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Naz, S., Zahoor, M., Umar, M. N., AlQahtany, F. S., Elnahas, Y. M., & Ullah, R. (2020). In vivo glucose-6-phosphatase inhibitory, toxicity and antidiabetic potentials of 2-picolylamine thioureas in Swiss albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3267–3273. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.048>
- Nirmalan, N., & Nirmalan, M. (2017). Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 18(10), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.06.019>
- Norton, L., Shannon, C., Gastaldelli, A., & DeFronzo, R. A. (2022). Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 129, 155142. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155142>
- Olazarán-Santibañez, F., Rivera, G., Vanoye-Eligio, V., Mora-Olivo, A., Aguirre-Guzmán, G., Ramírez-Cabrera, M., & Arredondo-Espinoza, E. (2021). Antioxidant and Antiproliferative Activity of the Ethanolic Extract of Equisetum myriochaetum and Molecular Docking of Its Main Metabolites (Apigenin, Kaempferol, and Quercetin) on β -Tubulin. *Molecules*, 26(2), 443. <https://doi.org/10.3390/molecules26020443>
- Olivares Reyes, J., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2019). *Health at a glance 2019: OECD indicators*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>
- Ovalle-Magallanes, B., Navarrete, A., Haddad, P. S., Tovar, A. R., Noriega, L. G., Tovar-Palacio, C., & Mata, R. (2019). Multi-target antidiabetic mechanisms of mexicanolides from Swietenia humilis. *Phytomedicine*, 58, 152891. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152891>
- Patarrão, R. S., Wayne Lutt, W., & Paula Macedo, M. (2014). Assessment of

- methods and indexes of insulin sensitivity. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 9(1), 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2013.10.004>
- Patel, B. M., & Goyal, R. K. (2019). Liver and insulin resistance: New wine in old bottle!!! *European Journal of Pharmacology*, 862(September).
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172657>
- Proença, C., Oliveira, A., Freitas, M., Ribeiro, D., Sousa, J. L. C., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2020). Structural Specificity of Flavonoids in the Inhibition of Human Fructose 1,6-Bisphosphatase. *Journal of Natural Products*, 83(5), 1541–1552.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00014>
- Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Revilla-Monsalve, C., Quezada-Tovar, G., Andrade-Cetto, A., Angel, P. G. M., Gallardo-Hernández, A. G., Altamirano-Bustamante, M., & de la Chesnaye-Caraveo, E. (2020). Chronic hypoglycemic and hypolipidemic effect of equisetum myriochaetum aerial parts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*, 2, 200–212.
- Revilla, María Cristina, Andrade-Cetto, A., Islas, S., & Wiedenfeld, H. (2002). Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 117–120.
- Revilla, Maria Cristina, Andrade-Cetto, A., Palomino-Garibay, M. A., Wiedenfeld, H., & Islas Andrade, S. (2007). Hypoglycemic effect of Cecropia obtusifolia Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 636–640. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.014>
- Rodrigues, R. (2016). A Comprehensive Review: The Use of Animal Models in Diabetes Research. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 3(6), 3–6. <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.03.00071>
- Rojo, A., Rodríguez, J., & Ángel, S. (2002). *La flora del Pedregal de San Ángel* (1a Edición). www.ine.gob.mx.

- Sah, S. P., Singh, B., Choudhary, S., & Kumar, A. (2016). Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.07.010>
- Samario, J. (2013). *Efecto de la administración aguda de extractos de Cecropia obtusifolia Bertol en la concentración plasmática de insulina en ratas NAD-STZ*. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Sánchez-Villaseñor, G. (2019). *Estudio crónico del efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de la parte aérea de Ageratina petiolaris (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. en ratas hiperglucémicas STZ*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santoro, A., McGraw, T. E., & Kahn, B. B. (2021). Insulin action in adipocytes, adipose remodeling, and systemic effects. *Cell Metabolism*, 33(4), 748–757.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.019>
- Sgrò, P., Emerenziani, G. Pietro, Antinozzi, C., Sacchetti, M., & Di Luigi, L. (2021). Exercise as a drug for glucose management and prevention in type 2 diabetes mellitus. *Current Opinion in Pharmacology*, 59, 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.05.006>
- Shamah, L. T., Cuevas, N. L., Romero, M. M., Gaona, P. E. B., Gómez, A. L. M., Mendoza, A. L., Méndez, G. H. I., & Rivera, D. J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados Nacionales. In *Instituto Nacional de Salud Pública*. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
- Sharma, P., Singh, S., Thakur, V., Sharma, N., & Grewal, A. S. (2021). Novel and emerging therapeutic drug targets for management of type 2 Diabetes Mellitus. *Obesity Medicine*, 23(October 2020), 100329.
<https://doi.org/10.1016/j.obmed.2021.100329>
- Siqueira, J. T., Batistela, E., Pereira, M. P., da Silva, V. C., de Sousa Junior, P. T., Andrade, C. M. B., Kawashita, N. H., Bertolini, G. L., & Baviera, A. M. (2016). Combretum lanceolatum flowers ethanol extract inhibits hepatic

- gluconeogenesis: an in vivo mechanism study. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1671–1679. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1120321>
- SyLOW, L., Tokarz, V. L., Richter, E. A., & Klip, A. (2021). The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metabolism*, 33(4), 758–780. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.020>
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 237(5), 481–490. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>
- Tahapary, D. L., Pratisthita, L. B., Fitri, N. A., Marcella, C., Wafa, S., Kurniawan, F., Rizka, A., Tarigan, T. J. E., Harbuwono, D. S., Purnamasari, D., & Soewondo, P. (2022). Challenges in the diagnosis of insulin resistance: Focusing on the role of HOMA-IR and Tryglyceride/glucose index. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 102581. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102581>
- Tan, M. H., Alquraini, H., Mizokami-Stout, K., & MacEachern, M. (2016). Metformin: From research to clinical practice. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45(4), 819–843. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.008>
- Triggle, C. R., Mohammed, I., Bshesh, K., Marei, I., Ye, K., Ding, H., MacDonald, R., Hollenberg, M. D., & Hill, M. A. (2022). Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*, 133(May), 155223. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155223>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2022a). *Ageratina petiolaris (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob.* <http://www.tropicos.org/Image/100014376>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2022b). *Cecropia obtusifolia Bertol.* <http://www.tropicos.org/Image/49912>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2022c). *Equisetum myriochaetum Schlttdl. & Cham.* <http://www.tropicos.org/Image/101104969>
- Unit for Laboratory Animal Medicine. (2022). *Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Rats.*
- van Poelje, P. D., Dang, Q., & Erion, M. D. (2007). Fructose-1,6-bisphosphatase as

- a therapeutic target for type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 4(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2007.10.003>
- van Schaftingen, E., & Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *The Biochemical Journal*, 362(Pt 3), 513–532.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222414&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Wang, T., Jiang, H., Cao, S., Chen, Q., Cui, M., Wang, Z., Li, D., Zhou, J., Wang, T., Qiu, F., & Kang, N. (2017). Baicalin and its metabolites suppresses gluconeogenesis through activation of AMPK or AKT in insulin resistant HepG-2 cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 92–100.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.049>
- Wang, Y., & Fang, Y. (2022). Postabsorptive homeostasis model assessment for insulin resistance is a reliable biomarker for cardiovascular disease mortality and all-cause mortality. *Diabetes Epidemiology and Management*, 6, 100045.
<https://doi.org/10.1016/j.deman.2021.100045>
- White, M. F., & Kahn, C. R. (2021). Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Molecular Metabolism*, 52(July), 101304.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101304>
- Wiedenfeld, H., Andrade Cetto, A., & Perez Amador, C. (2000). Flavonol glycosides from Equisetum myriochaetum. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(4), 395–397. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00074-5)
- Williams, R. (chair) et al. (2019). IDF Diabetes Atlas 9th. In *IDF Diabetes Atlas, 9th edition*. https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2019/07/IDF_diabetes_atlas_ninth_edition_en.pdf
- World Health Organization. (2019). *WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019*. World Health Organization (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
- Zhang, Y., Chen, J., Zeng, Y., Huang, D., & Xu, Q. (2019). Involvement of AMPK activation in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by Ficus carica leaf extract in diabetic mice and HepG2 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(June 2018), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.077>



Hepatic Glucose Output Inhibition by Mexican Plants Used in the Treatment of Type 2 Diabetes

Gerardo Mata-Torres¹, Adolfo Andrade-Cetto^{1*},
Fernanda Artemisa Espinoza-Hernández¹ and René Cárdenas-Vázquez²

¹ Laboratorio de Etnofarmacología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,

² Laboratorio de Biología Animal Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Giuseppe Esposito,
Sapienza University of Rome, Italy

Reviewed by:

Aline Carvalho Pereira,
Universidade Federal de Lavras, Brazil
Armando Caceres,
Universidad de San Carlos
de Guatemala, Guatemala

*Correspondence:

Adolfo Andrade-Cetto
aac@ciencias.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 29 August 2019

Accepted: 14 February 2020

Published: 03 March 2020

Citation:

Mata-Torres G, Andrade-Cetto A,
Espinoza-Hernández FA and
Cárdenas-Vázquez R (2020) Hepatic
Glucose Output Inhibition by Mexican
Plants Used in the Treatment of Type
2 Diabetes.
Front. Pharmacol. 11:215.
doi: 10.3389/fphar.2020.00215

De novo hepatic glucose production or hepatic gluconeogenesis is the main contributor to hyperglycemia in the fasting state in patients with type 2 diabetes (T2D) owing to insulin resistance, which leads to at least twice as much glucose synthesis compared to healthy subjects. Therefore, control of this pathway is a promising target to avoid the chronic complications associated with elevated glucose levels. Patients with T2D in the rural communities of Mexico use medicinal plants prepared as infusions that are consumed over the day between meals, thus following this rationale (consumption of the infusions in the fasting state), one approach to understanding the possible mechanism of action of medicinal plants is to assess their capacity to inhibit hepatic glucose production. Furthermore, in several of these plants, the presence of phenolic acids able to block the enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase) is reported. In the present work, extracts of *Ageratina petiolaris*, *Bromelia karatas*, *Equisetum myriochaetum*, *Rhizophora mangle*, and *Smilax moranensis*, which are Mexican plants that have been traditionally used to treat T2D, were assayed to evaluate their possible hepatic glucose output (HGO) inhibitory activity with a pyruvate tolerance test in 18-h fasted STZ-NA Wistar rats after oral administration of the extracts. In addition, the *in vitro* effects of the extracts on the last HGO rate-limiting enzyme G6Pase was analyzed. Our results showed that four of these plants had an effect on hepatic glucose production in the *in vivo* or *in vitro* assays. *A. petiolaris* and *R. mangle* extracts decreased glucose output, preventing an increase in the blood glucose levels and sustaining this prevented increase after pyruvate administration. Moreover, both extracts inhibited the catalytic activity of the G6Pase complex. On the other hand, even though *S. moranensis* and *B. karatas* did not exhibit a significant *in vivo* effect, *S. moranensis* had the most potent inhibitory effect on this enzymatic system, while the *E. myriochaetum* extract only inhibited hepatic glucose production in the pyruvate tolerance test. Because of the traditional method in which diabetic patients use plants, hepatic glucose production inhibition seems to be a mechanism that partially explains the common hypoglycemic effect. However, further studies must be carried out to characterize other mechanisms whereby these plants can decrease HGO.

Keywords: medicinal plant, hepatic glucose output, type 2 diabetes, glucose 6 phosphatase, traditional medicine

INTRODUCTION

Diabetes is a chronic condition that occurs when the body cannot produce enough insulin or respond properly to the insulin it does produce. In type 2 diabetes (T2D), the inability of the cells to respond to low levels of insulin, defined as insulin resistance, leads to elevated glucose levels in the bloodstream, or hyperglycemia (International Diabetes Federation, 2017). In the long term, uncontrolled hyperglycemia induces the development of complications (neuropathy, nephropathy, and retinopathy, among others) that impair the quality of life of individuals with T2D.

Hyperglycemia in T2D, among other factors, is caused by an increased hepatic glucose output (HGO), which is triggered by insulin resistance in the fasting state. Poor insulin signaling in the liver cannot efficiently suppress HGO. Overall, hyperglycemia is the sum of two glucose inputs, one from the gastrointestinal tract at the postprandial stage, and another from endogenous production. The liver produces approximately 85% of endogenous glucose, and half of this comes from gluconeogenesis. In a healthy subject, the production rate is approximately 1.8–2.0 mg/kg/min after overnight fasting. On the other hand, this rate increases at least two-fold in patients with T2D due to impaired gluconeogenesis (Cersosimo et al., 2018). Furthermore, when the balance between glucose production and glucose storage is disrupted, as observed in patients with T2D, glucose homeostasis is altered and significantly contributes to hyperglycemia (Sharabi et al., 2015). Some of the identified mechanisms responsible for the increased rate of gluconeogenesis include high circulating levels of gluconeogenic precursors such as lactate, pyruvate, alanine, and glycerol; increased free fatty acid oxidation; enhanced sensitivity to glucagon; and decreased sensitivity to insulin (Cersosimo et al., 2018).

Gluconeogenesis is an anabolic pathway that plays a major role in glucose metabolism by maintaining the glucose demand of the organs during starvation and after a meal high in fat and protein without carbohydrates. Gluconeogenesis can be regulated depending on the energy demand of the organism by activation or inhibition of the rate-limiting enzymes at different levels, such as substrate delivery, mass action regulation, allosteric activation, covalent modification, and alteration of gene expression. Among these enzymes, glucose-6-phosphatase (G6Pase) can control hyperglycemia because it determines the production of glucose released from gluconeogenesis and glycogenolysis (HGO) (Jawad et al., 2016). This enzyme is a multifunctional system attached to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) formed by three specific translocases (T1, T2, and T3) whose functions are: T1, glucose-6-phosphate (G6P) influx transport into the ER; T2, phosphate efflux transport; and T3, free glucose efflux transport; and a phosphatase subunit, in accordance with the widely accepted “substrate-transport” model (van Schaftingen and Gerin, 2002).

Inhibition of the rate-limiting enzymes in gluconeogenesis by phytochemicals as a target to treat T2D has attracted attention in recent years. Medicinal plants could provide new therapeutic compounds that allow regulation of gluconeogenic enzymes at different levels (Andrade-Cetto, 2012). For example,

metformin, a first-line drug prescribed for T2D management derived from the medicinal plant *Galega officinalis* L. (Fabaceae) (French lilac or Goat's rue) (Bailey, 2017), can decrease hepatic gluconeogenesis flux by reducing the gene expression of G6Pase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and promoting allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-Pase) (Hardie, 2013; Viollet and Foretz, 2013; Foretz et al., 2014; Tan et al., 2016; Hunter et al., 2018). Moreover, chlorogenic acid (CA), which is the most abundant isomer of caffeoylquinic acid present in foods, such as coffee and green tea, has been identified as a reversible competitive inhibitor of G6Pase T1 translocase (Hemmerle et al., 1997; Charkoudian et al., 2012; Naveed et al., 2018). This phenolic acid is the most studied natural compound found in a wide variety of plant species that has been associated with improved both glucose tolerance and insulin resistance in animal models (Meng et al., 2013).

To assess the potential inhibitory effects of phytochemicals on HGO, fasting hyperglycemic animal models are needed. The STZ-NA hyperglycemic model developed by Masiello et al. (1998), which consists of generating a “type-2-diabetogenic” syndrome with the ability to respond to glucose-stimulated insulin secretion, is characterized by stable hyperglycemia due to the partial protection of nicotinamide (NA) against the specific β -cytotoxic effect of streptozotocin (STZ). Although this model lacks insulin resistance (Szkudelski, 2012), the decreased insulin secretion due to the residual β -cells is responsible for the reduced glucose tolerance in these induced organisms (Szkudelski et al., 2013). Moreover, since β -cells are able to respond to drugs, this model has been used to assess the potential glucose-lowering effects of natural products, which are always evaluated after a fasting period (Eddouks et al., 2012).

In Mexico, type 2 diabetic patients use medicinal plants together with the prescribed medication to control glucose levels (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). As a result of our fieldwork performed in some regions of Mexico, we select five relevant medicinal plants traditionally used for the treatment of the illness. In brief, in the town of “Nopala” in Oaxaca state, diabetic patients use an infusion of the roots from *Smilax moranensis* M. Martens & Galeotti (Smilacaceae, known as “Cocolmecatl”) as well as the infusion of the bark from *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae, known as “Mangle Rojo”) to control the disease. In the state of Hidalgo, in the towns of “Tlanchinol” and “Tamala,” the patients use both the infusions of the aerial parts of *Bromelia karatas* L. (Bromeliaceae, known as “piñuela”) and *Equisetum myriochaetum* Schldt. & Cham. (Equisetaceae, known as “cola de caballo”) which were highly recommended by the traditional healer “Isabel Escalante, RIP” to treat T2D. In Mexico City, in the “Sonora” market of medicinal plants, the sellers suggest the disease control by using an infusion of the aerial parts of *Ageratina petiolaris* (Moc. ex DC.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae, traditionally known by its Spanish name “hierba del ángel,” or its Nahuatl name “Yolochichotl”) which is in part brought to market from “Tenancingo,” Mexico State.

In previous works, we analyzed some aspects of their hypoglycemic effect as well as the phytochemical composition (Andrade-Cetto et al., 2000; Wiedenfeld et al., 2000; Andrade-Cetto, 2011a; Andrade-Cetto and Rubalcaba-Mares, 2012;

Andrade-Cetto and Medina-Hernández, 2013; Bustos-Brito et al., 2016) for some of these plants. We also assessed the chronic hypoglycemic effect, the α -glucosidase inhibition or the insulin secretory effect (Revilla et al., 2002; Andrade-Cetto et al., 2008, 2015, 2017; Escandón-Rivera et al., 2019; Romo-Pérez et al., 2019). In these studies, we noticed that the hypoglycemic effect of a plant cannot be attributed to a single factor but to the combination of different mechanisms.

In the field, we documented that these plants are used as an infusion that diabetic patients usually drink over the course of a day in the so-called preparation “agua de uso.” Since the infusion is consumed during the fasting state, it is a rational that a possible mechanism contributing to the hypoglycemic effect of the plants can be related to HGO inhibition. To test this hypothesis, we performed pyruvate tolerance tests in fasting STZ-NA hyperglycemic rats *in vivo* and evaluated the ability of these plants to inhibit G6Pase *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Plant Extracts

In previous works, two kinds of plant extracts, aqueous (like the traditional infusion) and ethanol-water, were tested for their hypoglycemic effects. In the present study, we selected the extracts and doses that previously presented better biological activity (phytochemical profiles and voucher numbers are provided as **Supplementary Material**): ethanol-water extracts from *R. mangle* (bark, collected in “Manialtepec, Oaxaca, Mexico”) and *S. moranensis* (roots, collected in “Nopala, Oaxaca, Mexico”), aqueous extracts from *A. petiolaris* (aerial parts, collected in “Tenancingo, Estado de Mexico, Mexico”), *B. karatas*, and *E. myriochaetum* (both aerial parts, collected in “Tamala, Hidalgo, Mexico”). The ethanol-water extracts were prepared with 20 g of the plant in 500 ml of a mixture of ethanol:water (1:1) at 40°C for 4 h with agitation. The ethanol was removed on a Büchi rotatory evaporator, and the aqueous portion was frozen at –40°C. The water was eliminated by sublimation with a Labconco freeze dryer at reduced pressure. Aqueous extracts were made by boiling 20 g of the plant in 500 ml of water for 15 min with agitation. Afterward, the extracts were frozen at –40°C, and the water was finally removed by sublimation.

Hyperglycemic Animals

Eight-week-old Wistar rats were obtained from the bioterium of the School of Sciences, National Autonomous University of Mexico (UNAM). Animals were maintained with free access to food and water in a room at 25°C and 55% humidity under 12:12 h light:dark periods.

Hyperglycemia was induced as described previously (Masiello et al., 1998). Briefly, overnight fasting rats were administered 65 mg/kg i.v. injection of STZ (Sigma-Aldrich S0130) in 0.1 M acetate buffer, pH 4.5, and 15 min later they received a 150 mg/kg i.p. injection of NA (Sigma-Aldrich). One week later, the animals with fasting glucose values over 180 mg/dl were selected to perform pyruvate tolerance tests.

This study was carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration and recommendations of the Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011). The protocol was approved by the Committee of Academic Ethics and Scientific Responsibility (CEARC) of the Faculty of Science, UNAM (PI_2020_01_001).

Pyruvate Tolerance Test

Wistar rats fasted for 18 h were administered with vehicle (saline), metformin (Roche®) or extracts by gavage. Fifteen minutes later, vehicle or sodium pyruvate (2 g/kg bw, Sigma-Aldrich) were injected intraperitoneally. Blood samples were taken from the tail vein, and glucose levels were measured just before pyruvate administration (time 0) and 30, 60, 90, and 120 min later by using an Accutrend Plus (Roche®) glucometer. The animals were assigned into ten experimental groups ($n = 6$ per group): normoglycemic (N); normoglycemic + pyruvate (NP); hyperglycemic (H); hyperglycemic + pyruvate (HP); hyperglycemic + pyruvate + metformin 500 mg/kg (HPM); hyperglycemic + pyruvate + *A. petiolaris* 160 mg/kg (HPAp); hyperglycemic + pyruvate + *B. karatas* 218 mg/kg (HPBk); hyperglycemic + pyruvate + *E. myriochaetum* 330 mg/kg (HPEm); hyperglycemic + pyruvate + *R. mangle* 90 mg/kg (HPRm) and hyperglycemic + pyruvate + *S. moranensis* 80 mg/kg (HPSm).

Liver Microsome Isolation

Four overnight-fasted Wistar rats were anesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g b.w., i.p.). Livers were dissected and homogenized in a 7 ml Dounce tissue grinder to obtain a 20% homogenate in buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7.4). The homogenate was filtered through a nylon mesh and submitted to differential centrifugation as described previously (Andrade-Cetto and Cárdenas-Vázquez, 2010). The 100,000 \times 1 h pellets were stored at –40°C until use.

Glucose-6-Phosphatase Assay

A colorimetric assay was performed to assess microsomal G6Pase inhibition by the extracts as described previously (Andrade-Cetto and Cárdenas-Vázquez, 2010; Andrade-Cetto, 2011b). The test consists in the addition, from least to greatest, several concentrations of the potential inhibitor in the assayed medium which contains intact rat hepatic microsomes. The reaction starts by supplementing the substrate, while the stop solution, which incorporates sodium molybdate and ascorbic acid, is added at the end. Therefore, a reduced blue phosphomolybdate complex is formed due to the presence of the released inorganic phosphate which is proportional to the enzymatic activity. In brief, in 100 μ l of total assay volume, buffer (40 mM imidazole, 0.25 M sucrose, pH 7), 20 mM G6P, microsomes and CA or plant extracts at different concentrations were added. The reaction was started by the addition of G6P, incubated at 22°C for 20 min and stopped with the addition of 900 μ l of a solution containing 0.42% ammonium molybdate in 1 N H₂SO₄, 10% SDS and 10% ascorbic acid. After incubation of the media at 45°C for 20 min, the

inorganic phosphate was quantified colorimetrically at 830 nm (Arion, 1989). Assays were performed by triplicate.

Statistical Analysis

Pyruvate tolerance test data were expressed as the mean glucose level \pm standard error (SEM) at each time point on the curve. Area under curve (AUC) data were expressed as (mg/dl) \times min \pm SEM. One-way ANOVA with Tukey's *post hoc* tests were performed to compare glucose means among all the groups at each time point, the glucose means from each group versus the corresponding basal value, and the AUC values among the groups. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. IC₅₀ values were calculated by plotting concentration-response curves to find the best fitting regression model (linear or non-linear). Analysis was carried out in GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States).

RESULTS

Phytochemical composition of the tested plants was previously reported by our group (see references above). For reference purposes, we have included the HPLC-DAD profiles of the tested extracts that can be consulted in **Supplementary Material**.

In vivo Pyruvate Tolerance Tests

To evaluate gluconeogenesis as the major HGO source, rats were deprived of food for 18 h to deplete hepatic glycogen storage. Next, pyruvate was administered as the substrate for the inhibition assessment. As shown in **Table 1**, both intraperitoneal injection and oral administration of vehicle to normoglycemic (N) and hyperglycemic (H) control rats did not affect the blood glucose levels over the 2-h period of analysis (N and H groups), while pyruvate injection significantly increased these levels, as observed in the NP and HP groups. However, the effect was different between these two groups, since in the NP group, blood glucose levels significantly increased by approximately 60 mg/dl (57%) between 30 and 60 min after pyruvate administration, and almost returned to basal values after 2 h; in the HP group, pyruvate injection raised glucose levels by approximately 160 mg/dl (81%), which remained higher compared to the control group (H) and did not return to the initial value. In other words, even though pyruvate administration significantly increased the overall glucose in normo- and hyperglycemic rats compared to their controls (**Figure 1A**), a differential effect over time was observed due to the physiological state of each group.

For the treatments, metformin was effective in reducing blood glucose levels (HPM group; **Table 1**) since it was able to attenuate the rising glucose observed at 30 min in the HP group by approximately 51%. In addition, metformin had a significant hypoglycemic effect over the next 1 h and 30 min by decreasing the glucose levels beyond the basal level of the HPM group (15% lower).

The plant extracts did not completely block the rising levels of glucose by pyruvate administration since the basal glucose

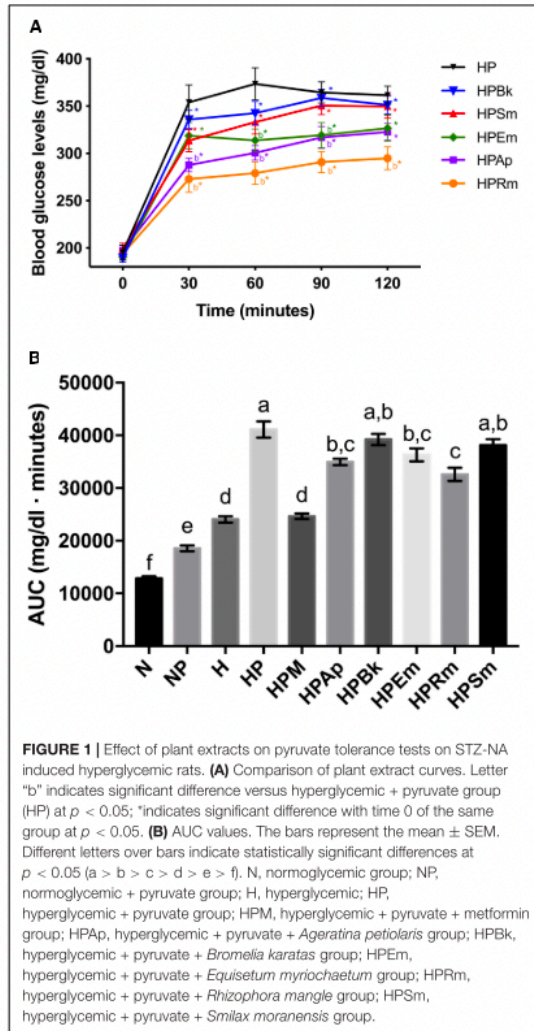
TABLE 1 | Plasma glucose values measured at the pyruvate tolerance test on STZ-NA induced hyperglycemic rats.

Glucose groups	T0 (mg/dl)	T30 (mg/dl)	T60 (mg/dl)	T90 (mg/dl)	T120 (mg/dl)
1. N	109 \pm 4 100%	111 \pm 4 102%	107 \pm 3 98%	104 \pm 4 96%	102 \pm 3 94%
2. NP	111 \pm 3 100%	173 \pm 4 ^{a*} 157%	176 \pm 7 ^{a*} 158%	149 \pm 6 [*] 134%	132 \pm 6 119%
3. H	193 \pm 4 ^a 100%	213 \pm 7 ^{ab} 110%	200 \pm 5 ^{ab} 104%	198 \pm 7 ^{ab} 103%	189 \pm 4 ^{ab} 98%
4. HP	195 \pm 8 100%	354 \pm 18 [*] 181%	373 \pm 17 [*] 192%	365 \pm 11 [*] 188%	362 \pm 10 [*] 187%
5. HPM 500 mg/kg	190 \pm 4 100%	246 \pm 6b [*] 130%	212 \pm 7b 112%	189 \pm 11b 100%	160 \pm 10b 85%
6. HPAP 160 mg/kg	197 \pm 5 100%	288 \pm 7b [*] 147%	301 \pm 8b [*] 153%	317 \pm 11b [*] 161%	323 \pm 9 [*] 165%
7. HPBK 218 mg/kg	189 \pm 4 100%	336 \pm 10 [*] 178%	343 \pm 12 [*] 181%	359 \pm 9 [*] 190%	351 \pm 10 [*] 186%
8. HPEM 330 mg/kg	191 \pm 4 100%	319 \pm 14 [*] 168%	314 \pm 12b [*] 166%	319 \pm 13b [*] 169%	327 \pm 14 [*] 173%
9. HPRM 90 mg/kg	194 \pm 5 100%	273 \pm 14b [*] 142%	279 \pm 12b [*] 145%	291 \pm 11b [*] 151%	295 \pm 12b [*] 154%
10. HPSM 80 mg/kg	199 \pm 6 100%	314 \pm 12 [*] 158%	333 \pm 13 [*] 168%	351 \pm 10 [*] 178%	350 \pm 12 [*] 178%

The values represent the mean \pm SEM. Letter "a" indicates significant difference versus normoglycemic (N) group at *p* < 0.05, letter "b" indicates significant difference versus hyperglycemic + pyruvate group (HP) at *p* < 0.05; * indicates significant difference with time 0 of the same group at *p* < 0.05. Change in blood glucose levels is represented as percentage. N, normoglycemic group; NP, normoglycemic + pyruvate group; H, hyperglycemic; HP, hyperglycemic + pyruvate group; HPM, hyperglycemic + pyruvate + metformin group; HPAP, hyperglycemic + pyruvate + *Ageratina petiolaris* group; HPBK, hyperglycemic + pyruvate + *Bromelia karatas* group; HPEM, hyperglycemic + pyruvate + *Equisetum myriochaetum* group; HPRM, hyperglycemic + pyruvate + *Rhizophora mangle* group; HPSM, hyperglycemic + pyruvate + *Smilax moranensis* group.

values were significantly lower than those at 30 min in all experimental groups. Although all of the extracts were able to reduce the hyperglycemic peak, only two plants showed a significant decrease. The experimental groups treated with the extracts of *A. petiolaris* and *R. mangle* exhibited similar behavior (HPAP and HPRM groups). These plant extracts were able to significantly reduce the hyperglycemic peak by approximately 20% at 30 min versus the HP control group. This significant difference was maintained during the remainder of the test, showing an inhibitory effect on gluconeogenesis.

The *S. moranensis* extract (HPSM group) decreased the hyperglycemic peak by 11%; however, the glucose values started to increase starting at 60 min. Similarly, the HPEM group reduced its hyperglycemic peak by approximately 10%; nevertheless, the *E. myriochaetum* extract maintained significantly lower glucose levels after 60 and 90 min. These outcomes showed that both extracts, at the doses used, exhibited a weak inhibitory effect on gluconeogenesis: the former lowered the hyperglycemic peak, and the latter showed an antihyperglycemic effect. No significant differences were found in gluconeogenesis after oral administration of the *B. karatas* extract (HPBK group) versus the



HP control group at any time point; therefore, this extract had no effect on glucose synthesis generated by pyruvate.

In addition to the comparison among extract effects on the pyruvate tolerance test (Figure 1A), an AUC analysis was performed for the evaluation of the effect of the plant extracts on blood glucose at a global level (Figure 1B). This analysis showed that *B. karatas* and *S. moranensis* had no effect on the overall glucose generated by pyruvate injection since their AUC values were not statistically significant versus the AUC of HP. However, *A. petiolaris*, *E. myriochaetum*, and *R. mangle* significantly decreased whole glucose levels over 120 min versus the HP group. Among these three extracts, *R. mangle* showed the greatest hypoglycemic effect due to gluconeogenesis inhibition

by pyruvate administration since this AUC was significantly different from the others. In contrast to the extracts, the AUC of metformin was notably similar to the H group; that is, this hypoglycemic drug was able to restore glucose to the levels prior to pyruvate administration.

To summarize, administration of *A. petiolaris* and *R. mangle* extracts showed both higher and more stable HGO inhibition than *B. karatas*, *E. myriochaetum*, and *S. moranensis*.

In vitro G6Pase Activity

To evaluate the direct inhibition of G6Pase activity, concentration-response assays were performed, and the best-fitting regression model (linear or non-linear) to obtain the IC_{50} of each plant extract was chosen. CA was used as a positive control since it is a well-characterized inhibitor of G6Pase T1 translocase. As shown in Table 2 and Figure 2, CA exerted the most potent inhibitory effect, followed by the extracts from *S. moranensis* and *R. mangle*. *A. petiolaris* was the less effective; however, it exhibited a higher inhibitory effect than *B. karatas*. On the other hand, *E. myriochaetum* did not show an effect at any assayed concentration.

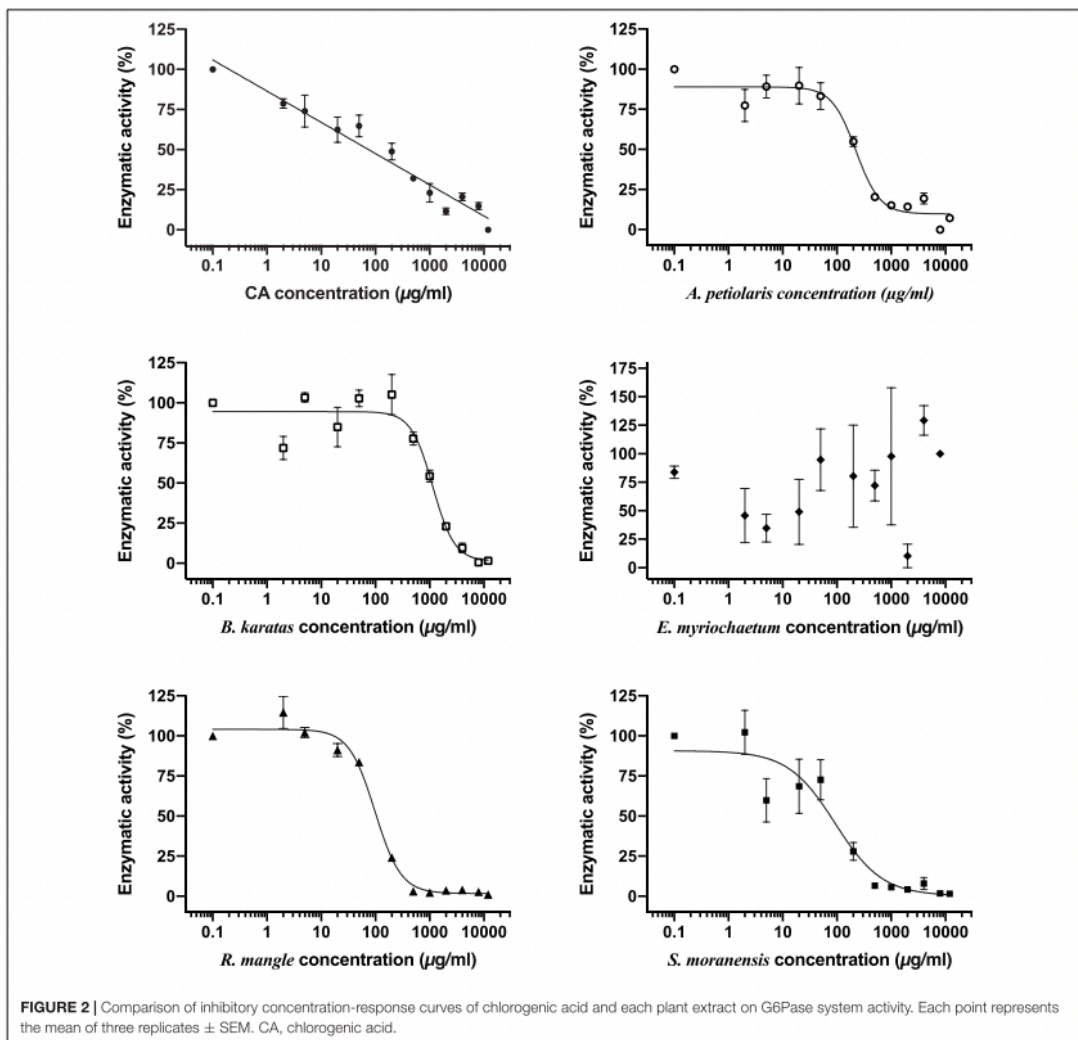
DISCUSSION

In Mexican traditional medicine, a common practice to treat T2D among patients is to drink an infusion of a medicinal plant between meals (fasting state) to control the disease (blood glucose levels). The fact that the plants are consumed in the fasting state associated with the statement that CA and other polyphenols have been related with the blockage of the enzyme G6Pase (because these compounds have been reported in several plants) led us to propose a link between the traditional use and the action mechanism. This link is not necessarily the best pharmacological option, but it explains the traditional use, considering the great number of plants that have been reported as hypoglycemic.

According to our results, the pyruvate-STZ-NA model was a good tool to assess the effect of plant extracts on HGO *in vivo* since pyruvate administration raised and maintained the glucose levels of fasting animals to approximately 200 mg/dl throughout the test. Additionally, the model was responsive to the hypoglycemic drug metformin. As shown, the glucose levels of the N group returned to a basal value at the end of the test because of an unaltered insulin secretion. On the other hand, the H group showed an increase in blood glucose, which never

TABLE 2 | IC_{50} values of plant extracts obtained from G6Pase system inhibition assay.

Plant extract	IC_{50} value
1. CA	63 μ g/ml
2. <i>A. petiolaris</i>	223 μ g/ml
3. <i>B. karatas</i>	1136 μ g/ml
4. <i>E. myriochaetum</i>	–
5. <i>R. mangle</i>	99 μ g/ml
6. <i>S. moranensis</i>	84 μ g/ml

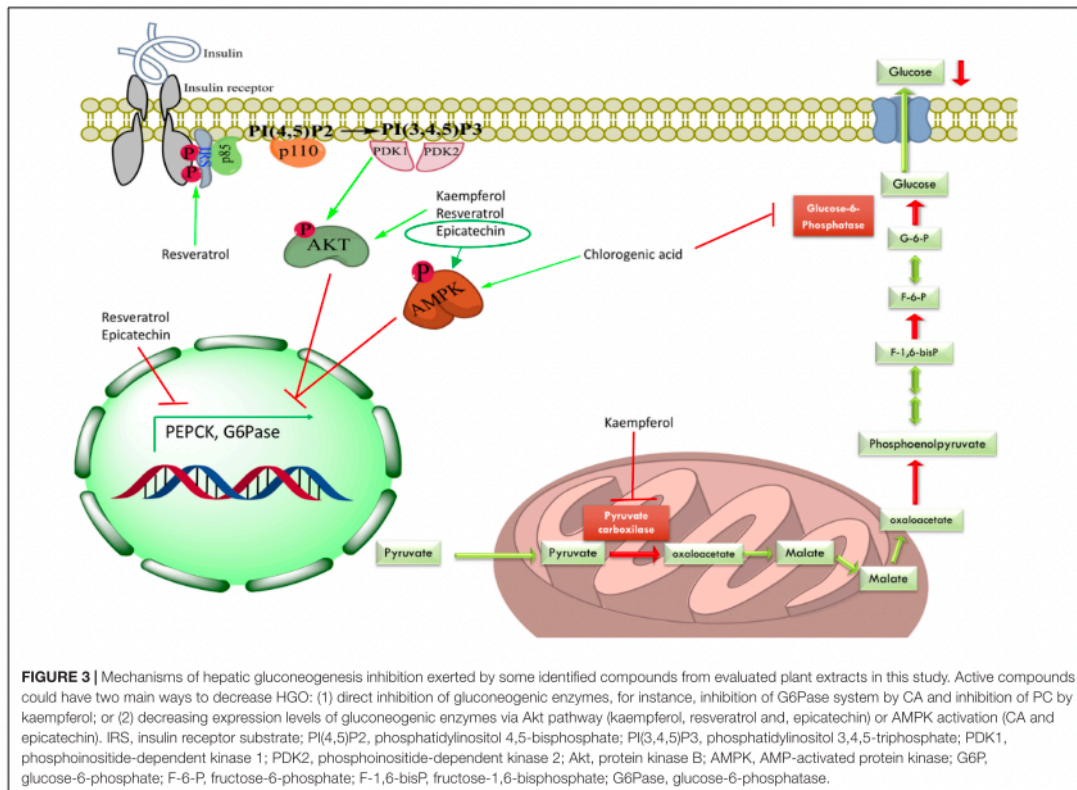


returned to the initial values due to impaired insulin secretion, resulting in a low uptake of glucose by skeletal muscle and adipose tissue. Despite the damage to insulin secretory cells caused by STZ, the main effect of metformin was shown: its ability to reduce glucose levels via inhibition of gluconeogenesis (Tan et al., 2016).

The tested plant extracts were able to decrease the hyperglycemic peak after pyruvate administration. Based on the phytochemical composition of the extracts and previous reports in the international literature (see below), possible explanations for the observed effects could be: (1) the presence of CA in the extracts, which was not only able to inhibit G6Pase T1 translocase but also able to raise the phosphorylation levels of AMP-activated

protein kinase (AMPK) (Ong et al., 2013); (2) inhibition of the G6Pase system by other compounds; (3) inhibition of another gluconeogenic enzyme; or (4) suppression of HGO via protein kinase B (Akt) or AMPK activation (Figure 3).

Rhizophora mangle was able to effectively inhibit the G6Pase system *in vitro*. In addition, the reduction of gluconeogenesis *in vivo* by the *R. mangle* extract can also be attributed to the decrease in the activity of other gluconeogenic enzymes such as PEPCK. Epicatechin, one of the main compounds found in *R. mangle*, has been shown to reduce the enzyme expression leading to diminished HGO in both NRK-52E and HepG2 cells. Additionally, this phenolic compound increased the total and phosphorylated protein levels of the insulin receptor (IR), insulin



receptor substrate-1 (IRS-1), and AMPK (Cordero-Herrera et al., 2014; Álvarez-Cilleros et al., 2018).

Ageratina petiolaris showed an inhibitory effect in the pyruvate tolerance test *in vivo* that could be correlated with its capacity of decreasing the activity of G6Pase system *in vitro* owing to its content of CA (Bustos-Brito et al., 2016). Furthermore, D-chiro-inositol, a polyalcohol present in many Fabaceae plants that has been chronically administered to high-fat diet STZ-treated Sprague Dawley rats, has induced a significant decreasing in fasting insulin levels, increasing hepatic glycogen, raising expression levels of glycogen synthase and GLUT4 genes, and increasing phosphorylation of hepatic Akt (Gao et al., 2016). Therefore, the isomer L-chiro-inositol identified in *A. petiolaris*, by our group, could have a similar ability to positively modulate the insulin signaling pathway, which would inhibit HGO in the pyruvate tolerance test or promote glycogen synthesis.

Smilax moranensis showed the most potent inhibitory effect on the G6Pase system, this could also be correlated with the content of CA and the presence of 3-O-caffeoylquinic acid, an isomer of CA (Romo-Pérez et al., 2019). However, it did not show a significant effect in the pyruvate tolerance test, which could be explained by its pharmacokinetics, either poor intestinal

absorption (Zibera et al., 2014) or metabolism of the G6Pase inhibitor before it can reach the target. *S. moranensis* contains *trans*-resveratrol, which has been associated with increased phosphorylation of both Akt and IRS-1; this activation involves the reduction of both insulin resistance and gluconeogenic enzyme expression (Szkudelski and Szkudelska, 2015).

Equisetum myriochaetum had a positive effect over the HGO in the pyruvate tolerance test but did not show G6Pase system inhibition, thus its mechanism of action could be related to directly inhibit another gluconeogenic enzyme. Some of the main isolated metabolites from *E. myriochaetum* were several types of kaempferols that have been shown to decrease pyruvate carboxylase (PC) activity with no change in protein expression levels due to an increase in hepatic Akt in high-fat diet-fed obese mice (Alkhalidy et al., 2018).

Although *B. karatas* showed a hypoglycemic effect in previous studies (Andrade-Cetto and Medina-Hernández, 2013), its aqueous extract did not show an inhibitory effect in the pyruvate tolerance test. Moreover, in the G6Pase inhibition assay, the IC₅₀ for this extract was the highest one, suggesting that the mechanism of action of this extract is not related to the inhibition of HGO. However, further studies must be performed to determine how this hypoglycemic plant works.

Inhibition of G6Pase, which has been proposed to be a shared hypoglycemic mechanism of plants, presents two major problems as a therapeutic target in patients with T2D; (1) since this enzyme is present in both gluconeogenesis and glycogenolysis pathways, inhibitors may cause hypoglycemia; and (2) accumulation of intracellular G6P may induce the expression of lipogenic genes that could result in hepatic steatosis (Agius, 2007). Further studies are needed to prove if the extracts affect HGO in other ways, but a possible common mechanism of action for these plants could be found.

CONCLUSION

In summary, four of the tested plants showed an inhibitory effect on HGO by either decreasing gluconeogenesis in the pyruvate tolerance test or diminishing the HGO-related activity of G6Pase. This inhibition could be a shared mechanism that could be associated with the phytochemical composition of the plants, CA among other compounds, contributing to their hypoglycemic effect. These observations can be correlated to the traditional way of consumption of the plants.

The present work was a starting point approach to characterize the hypoglycemic effects related to HGO inhibition. Based on the known plant composition and literature review, further studies must be performed to test whether these extracts have an effect not only on other gluconeogenic enzymes but also on the signal transduction pathways related to gluconeogenesis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

REFERENCES

- Agius, L. (2007). New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 587–605. doi: 10.1016/j.beem.2007.09.001
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, A., Luo, J., McMillan, R. P., Wang, Y., et al. (2018). Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *J. Nutr. Biochem.* 58, 90–101. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.04.014
- Álvarez-Cilleros, D., Martín, M. Á., and Ramos, S. (2018). (-)-Epicatechin and the colonic 2,3-dihydroxybenzoic acid metabolite regulate glucose uptake, glucose production, and improve insulin signaling in renal NRK-52E cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 62, 1–9. doi: 10.1002/mnfr.201700470
- Andrade-Cetto, A. (2011a). Hypoglycemic effect of *Smilax moranensis* root on N5-STZ diabetic rats. *Pharmacol. OnLine* 1, 111–115.
- Andrade-Cetto, A. (2011b). Inhibition of gluconeogenesis by *Malmea depressa* root. *J. Ethnopharmacol.* 137, 930–933. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.028
- Andrade-Cetto, A. (2012). Effects of medicinal plant extracts on gluconeogenesis. *Bot. Targets Ther.* 2, 1–6. doi: 10.2147/BTAT.S24726
- Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., and Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alpha-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 116, 27–32. doi: 10.1016/j.jep.2007.10.031
- Andrade-Cetto, A., Cabello-Hernández, C. A., and Cárdenas-Vázquez, R. (2015). Alpha-glucosidase inhibiting activity of five Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol. OnLine* 1, 67–71.

ETHICS STATEMENT

The protocol was approved by the Committee of Academic Ethics and Scientific Responsibility (CEARC) of the Faculty of Sciences, UNAM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA-C idealized the work. All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This project was partially sponsored by the DGAPA, PAPIIT IN226719.

ACKNOWLEDGMENTS

This article is a requirement for obtaining the degree of Doctor of GM-T at “Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.” We acknowledge M. en C. Christian Alan Cabello-Hernández for maintaining the animals at the Bioterium and Dr. Sonia Marlen Escandón-Rivera for performing the HPLC profiles.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00215/full#supplementary-material>

- Andrade-Cetto, A., and Cárdenas-Vázquez, R. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J. Ethnopharmacol.* 130, 93–97. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.016
- Andrade-Cetto, A., Escandón-Rivera, S. M., Mata Torres-Valle, G., and Quijano, L. (2017). Phytochemical composition and chronic hypoglycemic effect of *Rhizophora mangle* cortex on STZ-NA-induced diabetic rats. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 744–750. doi: 10.1016/j.bjp.2017.09.007
- Andrade-Cetto, A., and Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99, 325–348. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.019
- Andrade-Cetto, A., and Medina-Hernández, A. E. (2013). Hypoglycemic effect of *Bromelia plumieri* (E. Morren) L.B. Sm., leaves in STZ-NA-induced diabetic rats. *Front. Pharmacol.* 4:36. doi: 10.3389/fphar.2013.00036
- Andrade-Cetto, A., and Rubalcaba-Mares, M. L. (2012). Hypoglycemic effect of the *Rhizophora mangle* cortex on STZ-NA-induced diabetic rats. *Pharmacol. OnLine* 3, 1–5.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., Revilla, M. C., and Islas, S. (2000). Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 72, 129–133. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00218-x
- Arion, W. J. (1989). “Measurement of intactness of rat liver endoplasmic reticulum,” in *Methods in Enzymology*, eds S. Fleischer, B. Fleischer, J. Abelson, and M. Simon (Cambridge, MA: Academic Press), 58–67. doi: 10.1016/0076-6879(89)74010-6
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia* 60, 1566–1576. doi: 10.1007/s00125-017-4318-z

- Bustos-Brito, C., Andrade-Cetto, A., Giraldo-Aguirre, J. D., Moreno-Vargas, A. D., and Quijano, L. (2016). Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *J. Ethnopharmacol.* 185, 341–346. doi: 10.1016/j.jep.2016.03.048
- Cersosimo, E., Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Mandarino, L. J., and DeFronzo, R. A. (2018). *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.
- Charkoudian, L. K., Farrell, B. P., and Khosla, C. (2012). Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase. *Medchemcomm* 3:926. doi: 10.1039/c2md20008b
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Goya, L., and Ramos, S. (2014). Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 10–19. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.014
- Eddouks, M., Chattopadhyay, D., and Zeggwagh, N. A. (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012:142087. doi: 10.1155/2012/142087
- Escandón-Rivera, S. M., Andrade-Cetto, A., and Sánchez-Villaseñor, G. (2019). Phytochemical composition and chronic hypoglycemic effect of *Bromelia karatas* on STZ-NA-induced diabetic rats. evidence-based complement. *Altern. Med.* 2019:9276953. doi: 10.1155/2019/9276953
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., and Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20, 1–14. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018
- Gao, Y., Zhang, M., Wang, T., Wu, T., Ai, R., and Zhang, Z. (2016). Hypoglycemic effect of D-chiro-inositol in type 2 diabetes mellitus rats through the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 433, 26–34. doi: 10.1016/j.mce.2016.05.013
- Hardie, D. G. (2013). Metformin-acting through cyclic AMP as well as AMP? *Cell Metab.* 17, 313–314. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.011
- Hemmerle, H., Burger, H. J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P. W., et al. (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J. Med. Chem.* 40, 137–145. doi: 10.1021/jm9607360
- Hunter, R. W., Hughey, C. C., Lantier, L., Sundelin, E. I., Pegg, M., Zegiraj, E., et al. (2018). Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nat. Med.* 24, 1395–1406. doi: 10.1038/s41591-018-0159-7
- International Diabetes Federation (2017). *IDF Diabetes Atlas*, 8th Edn. Brussels: International Diabetes Federation.
- Jawad, A. H., Ibrahim, A. E., Alsayed, R., Hallab, Z. S., and Al-qaisi, Z. (2016). Study the impact of glucose-6-phosphatase activity in type 2 diabetic patients and non diabetic counterparts. *Preprints* 2016100137, 1–6. doi: 10.20944/preprints201610.0137.v1
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-buys, D., et al. (1998). Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 47, 224–229. doi: 10.2337/diab.47.2.224
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., and Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 1–11. doi: 10.1155/2013/801457
- National Research Council (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th Edn. Washington, DC: National Academies Press.
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., et al. (2018). Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 97, 67–74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064
- Ong, K. W., Hsu, A., and Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1341–1351. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.008
- Revilla, M. C. C., Andrade-Cetto, A., Islas, S., and Wiedenfeld, H. (2002). Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J. Ethnopharmacol.* 81, 117–120. doi: 10.1016/S0378-8741(02)00053-3
- Romo-Pérez, A., Escandón-Rivera, S. M., and Andrade-Cetto, A. (2019). Chronic hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Smilax moranensis* roots. *Brazilian J. Pharmacogn.* 29, 246–253. doi: 10.1016/j.bjp.2019.02.007
- Sharabi, K., Tavares, C., Rines, A., and Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol. Aspects Med.* 46, 21–33. doi: 10.1016/j.mam.2015.09.003
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* 237, 481–490. doi: 10.1258/ebm.2012.011372
- Szkudelski, T., and Szkudelska, K. (2015). Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1852, 1145–1154. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.10.013
- Szkudelski, T., Zywert, A., and Szkudelska, K. (2013). Metabolic disturbances and defects in insulin secretion in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. *Physiol. Res.* 62, 663–670.
- Tan, M. H., Alquraini, H., Mizokami-Stout, K., and MacEachern, M. (2016). Metformin: from research to clinical practice. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 45, 819–843. doi: 10.1016/j.ecl.2016.06.008
- van Schaftingen, E., and Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362, 513–52. doi: 10.1042/0264-6021:3620513
- Viollet, B., and Foretz, M. (2013). Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Ann. Endocrinol.* 74, 123–129. doi: 10.1016/j.ando.2013.03.006
- Wiedenfeld, H., Andrade Cetto, A., and Perez Amador, C. (2000). Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 395–397. doi: 10.1016/S0305-1978(99)00074-5
- Ziberna, L., Fornasaro, S., Čvorović, J., Tramer, F., and Passamonti, S. (2014). “Bioavailability of flavonoids: the role of cell membrane transporters,” in *Polyphenols in Human Health and Disease*, eds R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi (Cambridge, MA: Academic Press), 489–511.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Mata-Torres, Andrade-Cetto, Espinoza-Hernández and Cárdenas-Vázquez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.