



**Casa abierta al tiempo**

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, División de  
Ciencias Biológicas y de la Salud**

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Efecto antihiper glucémico de *Tillandsia usneoides* Linneo: posible  
participación de Flav1 sobre la translocación de GLUT2 y GLUT4”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:**

**M. en B. E. Jhovan Eduardo Miranda Núñez**

**Directores:**

Dr. Gerardo Blancas Flores

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

**Asesor:**

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

**Iztapalapa, Ciudad de México, octubre 2021**

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 15 de octubre de 2021

Comisión Académica del Posgrado

### **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presente

El que suscribe **JHOVAN EDUARDO MIRANDA NÚÑEZ** alumno con número de matrícula **2143800937**, del posgrado **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“EFECTO ANTIHIPERGLUCÉMICO DE *TILLANDSIA USNEOIDES* LINNEO: POSIBLE PARTICIPACIÓN DE FLAV1 SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE GLUT2 Y GLUT4”** a desarrollar en **LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



**JHOVAN EDUARDO MIRANDA NÚÑEZ**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El que suscribe **JHOVAN EDUARDO MIRANDA NÚÑEZ**, alumno del posgrado **EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“EFECTO ANTIHIPERGLUCÉMICO DE TILLANDSIA USNEOIDES LINNEO: POSIBLE PARTICIPACIÓN DE FLAV1 SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE GLUT2 Y GLUT4”**,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante **LA COMISIÓN DEL POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** para lo obtención del grado de **DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 15 de octubre del 2021.

Atentamente



**JHOVAN EDUARDO MIRANDA NÚÑEZ**

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Codirectores:**

#### **Dr. Gerardo Blancas Flores**

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología

Departamento de Ciencias de la Salud. D. C. B. S.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

[gera@xanum.uam.mx](mailto:gera@xanum.uam.mx)

#### **Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**

Departamento de Fitoquímica Farmacológica

Centro de Investigación Biomédica del Sur

Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos, México

[azamilpa\\_2000@yahoo.com.mx](mailto:azamilpa_2000@yahoo.com.mx)

### **Asesor:**

#### **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Profesor titular C

Área de Medicina Experimental y Traslacional

Departamento de Ciencias de la Salud. D. C. B. S.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

[legq@xanum.uam.mx](mailto:legq@xanum.uam.mx)

**“El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**

**Para la realización de los estudios de doctorado, el alumno Jhovan Eduardo Miranda Núñez contó con el apoyo de beca CONACyT, mediante el número de CVU/BECARIO: 635513/570377.**

## Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada: **“Efecto antihiper glucémico de *Tillandsia usneoides* Linneo: posible participación de Flav1 sobre la translocación de GLUT2 Y GLUT4”**, que presentó el M. en B. E. Jhovan Eduardo Miranda Núñez el día 20 de octubre del 2021.

### Presidente

#### Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
aaaf@xanum.uam.mx



---

Firma

### Secretaria

#### Dr. Margarita Diaz Flores

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.  
Centro Médico Nacional Siglo XXI.  
mardiaz2001@yahoo.com



---

Firma

### Vocal

#### Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Área de Medicina Experimental y Traslacional.  
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
legq@xanum.uam.mx



---

Firma

### Vocal

#### Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera

Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
anfor1110@gmail.com



---

Firma

## DEDICATORIAS

**“TODO COMIENZA CON UN SUEÑO, MUCHOS DE ELLOS PARECEN IMPOSIBLES. LAS COSAS QUE TE SUCEDEN A LO LARGO DE TU VIDA SON EL RESULTADO DE LAS DECISIONES QUE TOMASTE AYER. SOLO AQUELLOS QUE SE ATREVEN A TENER GRANDES SUEÑOS TERMINAN CONSIGUIENDO LA GRANDEZA. LA CONFIANZA EN SÍ MISMO ES EL PRIMER SECRETO DEL ÉXITO”**

**Este trabajo lo dedico a las personas más importantes en mi vida. Su cariño, amor y paciencia fueron fundamentales para realizar este sueño.**

A mi familia **Miguel, Erika, Stefany, Rubí, Miguel y Erick**, por su ayuda en los momentos más difíciles de mi carrera. Su paciencia y perseverancia me han convertido en el hombre que soy. Cada enojo, cada lagrima y cada sonrisa que viví durante este camino fueron fundamentales en la construcción de este sueño, y ustedes fueron parte de él. Gracias por todo el amor que me dedicaron durante estos últimos años.

A **Keysi, Lissie, Hela, Mila y Bruno**, por hacerme olvidar esos malos momentos y convertirlos en sonrisas.

## AGRADECIMIENTOS

A mis amigos **Carlos, Erika, Consuelo, Felipe, Diana y Elizabeth**, por mostrarme el verdadero valor de la amistad. Gracias por sus palabras de aliento en situaciones difíciles. Su apoyo fue importante en estos tiempos difíciles.

A mis amigos de laboratorio, **Hilda, Wendy, Beatriz, Rocío, Diana y Jesús**, por su apoyo incondicional. Ustedes fueron una pieza fundamental en momentos de tristeza y soledad. Gracias por los buenos momentos que compartimos durante este camino.

A **Maetzin e Israel**, por darme buenos consejos y críticas constructivas para ser una mejor persona. Gracias por creer en mí.

A **Edgar, Alejandra y Adán**, por brindarme horas de compañía y excelentes momentos a su lado. Su amistad fue fundamental para no renunciar a este proyecto.

A **Lulú, Ixchel y Lola**, por su ayuda, generosidad y amabilidad en todo momento.

Al **Dr. Gerardo Blancas Flores** y a la **Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera**, por ser los pilares en la construcción de este trabajo. Su tiempo y dedicación fue un ejemplo a seguir durante mi formación académica.

Al **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar** y al **Dr. Julio César Almanza Pérez**, su conocimiento y experiencia me impulsaron a ser un mejor investigador.

Al **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**, por su amabilidad y buenas ideas. Su dedicación y profesionalismo fue un modelo a seguir en la construcción de este proyecto.

Al **Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**, por brindarme su apoyo y consejos durante el desarrollo de este trabajo.



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	II
ABREVIATURAS .....	III
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Diabetes mellitus .....	1
1.2. Epidemiología y clasificación de la DM .....	1
1.3. Mecanismo de regulación de la insulina .....	4
1.4. Distribución y expresión de los transportadores de glucosa en tejidos sensibles a la insulina .....	5
1.5. GLUT4 y su participación en el metabolismo de glucosa en músculo esquelético .....	7
1.6. Expresión y translocación de GLUT2 y GLUT4 en hepatocitos .....	9
1.7. Almacenamiento de glucosa en hígado y músculo esquelético .....	11
1.8. Alteraciones metabólicas de la DT2 y su importancia en el hígado .....	12
1.9. RI, alteraciones metabólicas en músculo esquelético .....	15
1.10. Terapia farmacológica para el control de la DT2 .....	16
1.10.1. Biguanidas .....	17
1.10.2. Sulfonilureas .....	18
1.10.3. Meglitinidas .....	19
1.10.4. Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas .....	19
1.10.5. Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) .....	20
1.10.6. Tiazolidinedionas (TZD) .....	21
1.10.7. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) .....	23
1.10.8. Insulinoterapia .....	23
1.11. Las plantas medicinales como alternativa de tratamiento en DT2 .....	24
2. ANTECEDENTES .....	25
3. JUSTIFICACIÓN .....	27

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	29
5. HIPÓTESIS .....	29
6. OBJETIVO GENERAL.....	29
7. OBJETIVOS PARTICULARES .....	29
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
8.1. Diagrama de flujo del diseño experimental.....	30
8.2. Análisis fitoquímico .....	30
8.2.1. Material vegetal de <i>T. usneoides</i> .....	30
8.2.2. Obtención del extracto acuoso y las fracciones de <i>T. usneoides</i> por bipartición .....	31
8.2.3. Fraccionamiento químico de la fracción TU-AcOEt.....	31
8.2.4. Caracterización y fraccionamiento químico de la fracción CIF3 por HPLC, MS y RMN .....	32
8.3. Estudios <i>in vivo</i> .....	35
8.3.1. Animales de experimentación .....	35
8.3.2. Estudio hipoglucémico .....	35
8.3.3. Efecto del extracto acuoso y las fracciones de <i>T. usneoides</i> en la prueba de tolerancia a la glucosa .....	36
8.3.4. Efecto de las fracciones C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 en la prueba de tolerancia a la glucosa .....	36
8.3.5. Efecto de la fracción C1F3 en la prueba de tolerancia al almidón.....	37
8.3.6. Efecto de la fracción C1F3 sobre la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> .....	37
8.4. Estudios <i>in vitro</i> .....	38
8.4.1. Cultivo de mioblastos C2C12.....	38
8.4.2. Aislamiento y cultivo primario de células hepáticas de ratón.....	39
8.5. Prueba de funcionalidad celular en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.....	40
8.6. Condiciones experimentales para los mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.....	41
8.7. Inmunofluorescencia de GLUT2 y GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.....	42

9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
10.	RESULTADOS.....	43
10.1.	Efecto hipoglucémico y/o antihiper glucémico de <i>T. usneoides</i> .....	43
10.1.1.	Efecto hipoglucémico del extracto acuoso y las fracciones de <i>T. usneoides</i> .....	43
10.1.2.	Efecto de la TU-AcOEt en la prueba de tolerancia a la glucosa.....	44
10.2.	Análisis fitoquímico de la fracción TU-AcOEt.....	46
10.3.	Efecto de las fracciones (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5) de TU-AcOEt en la prueba de tolerancia a la glucosa.....	47
10.4.	Efecto de la fracción C1F3 sobre la glucemia en la prueba de tolerancia al almidón.....	48
10.5.	Prueba de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> .....	49
10.6.	Fraccionamiento de C1F3 por cromatografía en columna y caracterización química por HPLC, MS y RMN.....	50
10.7.	Prueba de viabilidad en modelos <i>in vitro</i> por rojo neutro.....	56
10.7.1.	Mioblastos C2C12.....	56
10.7.2.	Hepatocitos primarios.....	59
10.8.	Ensayos de inmunofluorescencia.....	62
10.8.1.	Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 por microscopía confocal.....	62
10.8.2.	Efecto de las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) y Flav1 sobre la translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios.....	65
10.8.3.	Inmunodetección de GLUT2 en hepatocitos primarios por microscopía confocal.....	68
11.	DISCUSIÓN.....	71
12.	CONCLUSIONES.....	80
13.	PERSPECTIVAS.....	80
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	81
15.	PUBLICACIÓN.....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la insulina en músculo esquelético. ....	9
Figura 2. <i>Tillandsia usneoides</i> Linneo. ....	25
Figura 3. Diseño experimental. ....	30
Figura 4. Cultivo de mioblastos C2C12 (10X) en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. ....	39
Figura 5. Aislamiento de hepatocitos primarios de ratón por el método de perfusión de colagenasa. ....	40
Figura 6. Efecto hipoglucémico de la TU-AcOEt, TU-Acuosa y el extracto acuoso de <i>T. usneoides</i> . ....	44
Figura 7. Prueba de tolerancia a la glucosa vía i.p. en ratones sanos. ....	45
Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa vía i.g. en ratones sanos. ....	46
Figura 9. CCF de fase reversa de las fracciones obtenidas de TU-AcOEt. ....	47
Figura 10. Efecto de C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 sobre la glucemia en ratones CD-1. ....	48
Figura 11. Prueba de tolerancia al almidón en ratones CD-1 con 12 h de ayuno. ....	49
Figura 12. CCF de fase reversa de las fracciones obtenidas de C1F3. ....	50
Figura 13. Análisis por HPLC de C1F3 y las fracciones C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44. ....	52
Figura 14. Espectro de MS y estructura química de Flav1. ....	53
Figura 15. CCF de fase normal de las fracciones obtenidas de C2F38-44. ....	53
Figura 16. Análisis por RMN de la fracción C3F6-9. ....	55
Figura 17. Estructura química de Flav1. ....	56
Figura 18. Efecto de las fracciones C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41 y Flav1 sobre la viabilidad celular en mioblastos C2C12. ....	59
Figura 19. Efecto de las fracciones C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41 y Flav1 sobre la viabilidad celular en hepatocitos primarios. ....	62
Figura 20. Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 a 15 min. ....	63
Figura 21. Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 a 30 min. ....	65
Figura 22. Translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios a 15 min. ....	66
Figura 23. Translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios a 30 min. ....	68
Figura 24. Translocación de GLUT2 en hepatocitos primarios cultivados con 25 mM de glucosa durante 15 min. ....	69

Figura 25. Translocación de GLUT2 en hepatocitos primarios cultivados con 25 mM de glucosa durante 30 min. ....	70
---	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento (%) del extracto acuoso y las fracciones (TU-Acuosa y TU-AcOEt) de <i>T. usneoides</i> . ....	31
Tabla 2. Rendimiento (%) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de TU-AcOEt.....	32
Tabla 3. Condiciones cromatográficas para C1F3, C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44 por HPLC y cuantificación de la flavona en la fracción TU-AcOEt.....	34
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> . ....	50

## **ABREVIATURAS**

ABC: Área bajo la curva

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

Akt: Proteína cinasa B

AS160: Sustrato de Akt de 160 KDa

BSA: Albúmina de suero bovino

Ca<sup>2+</sup>: Calcio

CAT: Catalasa

CBP/p300: Proteína coactivadora transcripcional p300

CCF: Cromatografía en capa fina

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DG: Diabetes gestacional

DM: Diabetes mellitus

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DT1: Diabetes tipo 1

DT2: Diabetes tipo 2

DPP-4: Dipeptidil peptidasa-4

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

FATP2: Proteína transportadora de ácidos grasos tipo 2

FATP5: Proteína transportadora de ácidos grasos tipo 5

FA: Ácidos grasos

FDA: Food and Drug Administration

FID: Federación Internacional de Diabetes

Flav1: 5, 7, 4'-trihidroxi-3, 6, 3', 5'-tetrametoxiflavona

FoxO1: Factores de transcripción Forkhead

GAP: Proteína activadora de GTPasas

GIP: Polipéptido insulínico dependiente de glucosa

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1

GLUT1: Transportador de glucosa tipo 1

GLUT2: Transportador de glucosa tipo 2

GLUT3: Transportador de glucosa tipo 3

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4

GPX: Glutación peroxidasa

GS: Glucógeno sintasa

GSK-3: Glucógeno sintasa cinasa 3

G6P: Glucosa-6-fosfato

G6Pase: Glucosa-6-fosfatasa

HBSS: Solución salina balanceada de Hanks

HbA1c: Hemoglobina glicada

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico

HMG: Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IL-6: Interleucina-6

IR: Receptor de insulina

IRS: Sustrato receptor de insulina

IRS-1: Sustrato receptor de insulina tipo 1

IRS-2: Sustrato receptor de insulina tipo 2

K<sup>+</sup>: Potasio

K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>: Canal de K<sup>+</sup> dependiente de ATP

LC-CoA: Acil-CoA de cadena larga

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

MS: Espectrometría de masas

mTORC2: Complejo blanco de la rapamicina en mamíferos 2

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólica

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

NF-κB: Factor nuclear kappa B

OCTs: Transportadores de cationes orgánicos

OCT1: Transportadores de cationes orgánicos 1

OCT3: Transportadores de cationes orgánicos 3

PA: Ácido fosfatídico

PDK1: Proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1



PDX1: Factor 1 homeobox pancreático y duodenal

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PH: Dominio de homología a pleckstrina

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PIP<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PKA: Proteína cinasa A

PKC-ε: Proteína cinasa C épsilon

PKC-ζ: Proteína cinasa C atípica zeta

PKC-θ Proteína cinasa C theta

PKC-λ: Proteína cinasa C atípica lamda

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

PPARα: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa

PPARδ: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas delta

PPARγ: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma

PPRE: Elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas

PTB: Dominio de unión a fosfotirosinas

RI: Resistencia a la Insulina

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RXR: Receptor retinoide X

SFB: Suero fetal bovino

SGLT1: Cotransportador sodio-glucosa tipo 1

SGLT2: Cotransportador sodio-glucosa tipo 2

SH2: Dominios con homología a Src 2

SOD: Superóxido dismutasa

SREBP-1c: Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1c

SRC-1: Coactivador del receptor nuclear 1

SU: Sulfonilureas

SUR1: Receptor de sulfonilurea 1

S6K: Proteínas cinasas ribosomales S6

TAG: Triacilglicéridos

*T. usneoides*: *Tillandsia usneoides* Linneo

TFA: Ácido trifluoroacético

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

TR: Tiempo de retención

TU-AcOEt: Fracción de acetato de etilo

TU-Acuosa: Fracción acuosa

TZD: Tiazolidinedionas

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta resolución

## RESUMEN

### Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DT2) es un trastorno metabólico crónico caracterizado por hiperglucemia sostenida asociada con resistencia a la insulina (RI) y ausencia en la producción de insulina. La RI afecta a diferentes órganos, incluyendo al músculo esquelético y al hígado, lo cual contribuye a las alteraciones del metabolismo de carbohidratos y lípidos características de la DT2.

Los transportadores de glucosa (GLUT) son un grupo de proteínas transmembranales cuya función principal es transportar hexosas, incluida la glucosa. El GLUT2 desempeña un papel esencial en el transporte de glucosa en hígado. GLUT4 se encuentra principalmente en músculo esquelético y su translocación a la membrana depende de insulina. Aunque el hígado carece de una expresión significativa de GLUT4, algunos estudios revelan su importancia en las enfermedades metabólicas del hígado. El metabolismo de glucosa mediado por GLUT4 depende de la activación de la vía PI3K/Akt estimulada por la insulina, que regula también procesos proliferativos. La RI conduce a un aumento en la producción de glucosa en hígado y un desequilibrio en la captación y almacenamiento de glucosa en músculo esquelético. Alteraciones en GLUT2 y GLUT4 pueden conducir a condiciones fisiopatológicas relacionadas con la diabetes. Por lo tanto, la modulación de la activación de GLUT2 y GLUT4 podría considerarse un objetivo terapéutico para el control de la DT2.

El manejo de la DT2 incluye cambios en el estilo de vida del individuo. El uso de agentes farmacológicos ha contribuido al control de la DT2; sin embargo, muchos fármacos generan efectos adversos indeseables. Esta situación ha llevado a continuar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la diabetes. Las plantas medicinales representan una fuente importante de sustancias activas que pueden ayudar a controlar diferentes enfermedades, incluyendo la DT2.

*Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*) es una planta que se distribuye en México. Esta planta pertenece a la familia Bromeliaceae y es usada para tratar la

diabetes mellitus (DM). Un estudio fitoquímico reveló la presencia del ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), entre otros compuestos, el cual mostró efecto hipoglucémico en ratones sanos. Sin embargo, el HMG también mostró efectos adversos. Por lo tanto, es posible que *T. usneoides* contenga otros compuestos que puedan explicar el efecto sobre la glucemia, sin presentar los efectos adversos observados con el HMG.

En otros estudios, sobre la elucidación del mecanismo de acción hipoglucemiante del extracto acuoso de *T. usneoides* en células RINm5f, no se observó aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ni en la secreción de insulina. Por lo tanto, esta acción sobre la glucemia puede involucrar un mecanismo extrapancreático asociado con la captación y almacenamiento de glucosa a nivel periférico. El extracto acuoso también incrementó la expresión de GLUT2 y disminuyó la actividad de GSK-3 $\beta$  en hepatocitos. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de las acciones de *T. usneoides* sobre la glucemia, todavía es necesario explorar qué otros constituyentes podrían estar participando en esta acción y determinar su efecto sobre el transporte y almacenamiento de glucosa en células musculares y hepáticas.

### **Objetivo**

Obtener un compuesto de *T. usneoides* con acción sobre la glucemia en ratones debido a la regulación de GLUT2 y GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.

### **Metodología**

El extracto acuoso y las fracciones (TU-AcOEt y TU-Acuosa) de *T. usneoides* se evaluaron en un bioensayo de actividad hipoglucémica y pruebas de tolerancia a la glucosa en ratones CD-1 sanos. La TU-AcOEt se fraccionó por cromatografía en columna y sus componentes químicos se detectaron por cromatografía en capa fina (CCF), obteniendo 5 fracciones (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5) que se evaluaron en una prueba de tolerancia a la glucosa. La fracción activa (C1F3) se sometió también a pruebas de tolerancia al almidón y de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*. Después, C1F3 se fraccionó y las fracciones resultantes

(C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44) se analizaron por HPLC, junto con C1F3. La fracción C2F38-44 también se analizó por espectrometría de masas (MS) y se sometió a un fraccionamiento adicional. La fracción C3F6-9 proveniente de C2F38-44 se exploró por resonancia magnética nuclear (RMN), resultando en 5, 7, 4'-trihidroxi-3, 6, 3, 5'-tetrametoxiflavona (Flav1), cuyo contenido se cuantificó en la fracción TU-AcOEt por HPLC. El efecto citotóxico de las fracciones (C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44) y el compuesto Flav1 se evaluó mediante una prueba de rojo neutro a diferentes concentraciones, con baja y alta glucosa en mioblastos C2C12 y cultivo primario de hepatocitos. También, se realizó microscopía confocal para evaluar el efecto de las fracciones y Flav1 sobre la translocación de GLUT2 y GLUT4.

## **Resultados**

El extracto acuoso y las fracciones de *T. usneoides* redujeron significativamente la glucosa en sangre. La fracción TU-AcOEt redujo los niveles de glucosa (17%) en la prueba de tolerancia a la glucosa, efecto similar al observado con la metformina; su fraccionamiento resultó en 5 fracciones, de las cuales C1F3 redujo la glucemia (19%) en la prueba de tolerancia a la glucosa, similar a metformina. También, C1F3 redujo la glucosa en sangre en la prueba de tolerancia al almidón y la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*. El fraccionamiento de C1F3 generó nuevas fracciones (C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44) que se analizaron por HPLC. La fracción mayoritaria (C2F38-44) fue explorada por MS y sometida a un nuevo fraccionamiento; el análisis por RMN de C3F6-9 reveló la presencia de Flav1. El tratamiento con Flav1 incrementó la translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios; en este cultivo de hepatocitos, la translocación de GLUT2 también se incrementó.

## **Conclusiones**

*T. usneoides* es una planta antidiabética con efecto antihiper glucémico mediado, al menos en parte, por la translocación de GLUT2 y GLUT4 debido a Flav1. Estos datos apoyan la idea de que *T. usneoides* podría servir como fuente de materia

prima para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que ofrezcan una alternativa de tratamiento para la DT2.

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic metabolic disorder characterized by sustained hyperglycemia associated with insulin resistance (IR) and the absence of insulin production. IR affects different organs, like skeletal muscle, and liver, which contributes to the imbalance in carbohydrate and lipid metabolism characteristic of T2D.

The glucose transporters (GLUT) are a group of transmembrane proteins whose primary function is to transport hexoses, including glucose. GLUT2 plays an essential role in the transport of glucose in the liver. GLUT4 is mainly found in skeletal muscle, and its translocation to the membrane depends on insulin. Although the liver lacks a significant expression of GLUT4, some studies reveal its importance in metabolic diseases of the liver. Glucose metabolism mediated by GLUT4 depends on activating the PI3K/Akt pathway stimulated by insulin, which also regulates proliferative processes. IR increases liver glucose production, causing an imbalance in the uptake and storage of glucose in the skeletal muscle. Alterations in GLUT2 and GLUT4 can lead to pathophysiological conditions related to diabetes. Therefore, the modulation of the activation of GLUT2 and GLUT4 could be considered a therapeutic target for the control of T2D.

The management of T2D includes changes in the individual's lifestyle. The use of pharmacological agents has contributed to the control of T2D; however, many drugs generate undesirable adverse effects. This situation has led to continuing the search for new therapeutic alternatives for diabetes. Medicinal plants represent an important source of active substances that can help control different diseases, including T2D.

*Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*) is a plant that is distributed in Mexico. This plant belongs to the Bromeliaceae family and is used to treat diabetes mellitus (DM). A phytochemical study revealed the presence of the 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG), among other compounds, which showed a hypoglycemic effect in normal mice. However, HMG also exhibited adverse effects. Therefore, it is

possible that *T. usneoides* contains other compounds that may explain the effect on the glycemia, without the adverse effects of the HMG.

In other studies, about the elucidation of the hypoglycemic action mechanism of the aqueous extract of *T. usneoides* in RINm5f cells, there were no observed increase in the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  nor insulin secretion. Therefore, this action over glycemia may involve an extra-pancreatic mechanism associated with the intake and storage of glucose at the peripheral level. The aqueous extract increased the expression of GLUT2 and decreased the activity of GSK-3 $\beta$  in the primary culture of hepatocytes. Although the knowledge of the actions on the glycemia of *T. usneoides* has increased, it is yet necessary to explore what other constituents might be participating in this action and determine its effect on the transport and storage of glucose in muscle and liver cells.

### **Objective**

To obtain a compound of *T. usneoides* with action on glycemia in mice due to the regulation of GLUT2 and GLUT4 in myoblasts and primary hepatocytes.

### **Methodology**

The aqueous extract and the fractions (TU-AcOEt and TU-Aqueous) of *T. usneoides* were evaluated in a bioassay for hypoglycemic activity and glucose tolerance tests in healthy CD-1 mice. TU-AcOEt was fractionated by column chromatography, and its chemical components were detected by thin-layer chromatography (TLC), obtaining 5 fractions (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, and C1F5) that were evaluated in a glucose tolerance test. The active fraction (C1F3) was also tested for starch tolerance and inhibition of  $\alpha$ -glucosidases *in vitro*. Then, C1F3 was fractionated, and the resulting fractions (C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44) were analyzed by HPLC, along with C1F3. The C2F38-44 fraction was also analyzed by mass spectrometry (MS) and subjected to further fractionation. The C3F6-9 fraction from C2F38-44 was explored by nuclear magnetic resonance (NMR), resulting in 5, 7, 4'-trihydroxy-3, 6, 3, 5'-tetramethoxyflavone (Flav1), whose content was quantified in the TU-AcOEt fraction by HPLC. The cytotoxic effect of the fractions (C2F9-12,



C2F22-25, and C2F38-44) and the Flav1 compound was evaluated by a neutral red test at different concentrations, with low and high glucose in C2C12 myoblasts and primary culture of hepatocytes. Also, confocal microscopy was performed to evaluate the effect of fractions and Flav1 on the translocation of GLUT2 and GLUT4.

## Results

The aqueous extract and the *T. usneoides* fractions significantly reduced blood glucose. The TU-AcOEt fraction reduced glucose levels (17%) in the glucose tolerance test, an effect like that seen with metformin; its fractionation resulted in 5 fractions, where C1F3 reduced glycemia (19%) in the glucose tolerance test, like metformin. Also, C1F3 reduced blood glucose in the starch tolerance test and  $\alpha$ -glucosidase activity *in vitro*. The fractionation of C1F3 generated new fractions (C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44) analyzed by HPLC. The majority fraction (C2F38-44) was explored by MS and subjected to a new fractionation; the NMR analysis of C3F6-9 revealed the presence of Flav1. Treatment with Flav1 increased GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts and primary hepatocytes; in this hepatocytes culture, GLUT2 translocation was also increased.

## Conclusions

*T. usneoides* is an antidiabetic plant with antihyperglycemic effect mediated, at least in part, by GLUT2 and GLUT4 translocation due to Flav1. These data support the idea that *T. usneoides* could serve as a source of raw material for developing new therapeutic agents that offer an alternative treatment for T2D.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas que se caracterizan por concentraciones elevadas de glucosa, como resultado de defectos en la secreción y/o acción a la insulina, afectando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Eid et al., 2015). La prevalencia de DM está incrementando de manera alarmante en todo el mundo. Factores como el estilo de vida, hábitos alimenticios y la predisposición genética han contribuido al incremento en el número de casos de personas con DM en las últimas tres décadas, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La DM tipo 2 (DT2) es el tipo de diabetes predominante (Hameed et al., 2015; Laguna-Hernández et al., 2017).

### **1.2. Epidemiología y clasificación de la DM**

De acuerdo con los datos establecidos en 2017, la prevalencia de la DM en personas de 20 a 79 años era de 425 millones en el mundo. Se estima que para el año 2045 este número aumentará a 629 millones. Al incrementar el intervalo de edad (18-99 años), se encontró una prevalencia de 451 millones de personas con diabetes en 2017. Se espera que para el año 2045 estos valores incrementen a 693 millones, lo que equivale al 9.9% de la población mundial. En el caso de la mortalidad por diabetes, se estableció que en 2017 fueron 5 millones de muertes en personas de 20 a 99 años. También, el gasto sanitario mundial se estimó en 850 millones de dólares en 2017 para las personas de 18 a 99 años con diabetes, y para el año 2045 podría ser de 958 mil millones de dólares (Cho et al., 2018).

La clasificación más aceptada y hasta la fecha adoptada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), incluye cuatro grupos: diabetes mellitus tipo 1 (DT1), DT2, diabetes gestacional (DG) y otros tipos de DM. La clasificación de la diabetes es de suma importancia, ya que determina el tipo de tratamiento, especialmente en adultos jóvenes (ADA, 2014).

- a) DT1. Representa del 5% al 10% de las personas diagnosticadas de diabetes y del 80% al 90% de los casos de DM en niños y adolescentes. Según la

Federación Internacional de Diabetes (FID), el número de nuevos casos diagnosticados en menores (0-14 años) es de 78,900 por año (Kharroubi and Darwish, 2015; Rorsman and Braun, 2013). Se debe a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. La respuesta humoral generada por las células  $\beta$  y el estado inflamatorio, promueven la presencia de anticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos, generando su destrucción en un mecanismo dependiente de las células T. La biopsia pancreática de pacientes con DT1 confirmó la presencia de linfocitos T CD4 y CD8, macrófagos y linfocitos B. Se ha establecido que la expresión de FasL en células T citotóxicas promueve la progresión de esta enfermedad, incrementando la apoptosis de células  $\beta$  pancreáticas en un mecanismo regulado por la proteína Fas (Devendra et al., 2004; Kharroubi and Darwish, 2015). Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto de cómo los anticuerpos producen una respuesta autoinmune, es posible detectarlos en el suero de los pacientes años antes de que se manifieste la enfermedad. Algunos síntomas característicos de la DT1 es la polifagia, polidipsia, poliuria, cansancio extremo y cetoacidosis diabética.

- b) DT2. La DT2 por lo general se presenta en adultos y representa alrededor del 80%-90% de los casos de diabetes. La FID en 2013 reportó un 8.3% de personas con DT2 (198 millones de hombres y 184 millones de mujeres) y se espera que esta cifra aumente a 592 millones para el 2035 (Kharroubi and Darwish, 2015). Este tipo de diabetes resulta de un defecto progresivo en la secreción de insulina, generalmente se acompaña de resistencia a la insulina (RI) en músculo esquelético, tejido adiposo y la desregulación metabólica en hígado (Lee et al., 2010). La RI contribuye a una disminución de la captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo, junto con una pérdida de la secreción de insulina por la célula  $\beta$ , dando como resultado niveles elevados de glucosa en sangre. Algunos pacientes con DT2 son obesos o presentan mayor porcentaje de grasa acumulada en la región abdominal. Por lo tanto, ambas condiciones causan RI. El riesgo de padecer DT2 aumenta

con la edad, la obesidad y con la disminución de la actividad física (Zheng et al., 2018).

- c) Diabetes gestacional: Se presenta en el embarazo y se genera por intolerancia a los carbohidratos, provocando RI. Tanto las madres como los bebés tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes a lo largo de su vida (Ainuddin et al., 2015; Baci et al., 2013). El diagnóstico de esta enfermedad ocurre durante las 24 y 28 semanas de gestación. El estado hiperglucémico durante el embarazo puede generar algunos riesgos en el recién nacido y en la madre, entre ellos: macrosomía (peso del bebé al nacer  $\geq 4.5$  kg), preeclampsia y parto por cesárea, debido al incremento en el tamaño de los bebés. Para diagnosticar diabetes durante el embarazo, las mujeres deben presentar una concentración plasmática de glucosa en ayunas  $\geq 126$  mg/dL (7 mmol/L) o bien, 2 h después de una carga oral de glucosa (75 g) presentar valores  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L). El sedentarismo, la obesidad, la edad de la madre y antecedentes familiares de diabetes son algunos factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de diabetes durante el embarazo (Kharroubi and Darwish, 2015).
- d) Los otros tipos de diabetes pueden ser ocasionados por defectos genéticos en la función de las células  $\beta$ , enfermedades del páncreas exócrino, uso de drogas o químicos y después de un trasplante de órganos (Kharroubi and Darwish, 2015). La diabetes monogénica ocurre por una disminución en la proliferación de la célula  $\beta$  debido a una disminución en la expresión del factor de transcripción PDX1 (Factor 1 homeobox pancreático y duodenal). PDX1 participa en el desarrollo y diferenciación de la célula  $\beta$ , ya que regula la expresión de diferentes genes, entre ellos: Ngn3, insulina, Slc2a2 y GcK. Mutaciones en PDX1 puede contribuir al desarrollo de MODY4, un tipo de diabetes que se presenta al inicio de la madurez en los jóvenes (aproximadamente a los 25 años de edad), que generalmente se acompaña por una disminución en la secreción de insulina y un estado moderado de

intolerancia a la glucosa (Deng et al., 2019; Yang and Chan, 2016). Por otro lado, existe una variedad de complicaciones que pueden generar daño al páncreas, como: pancreatitis, carcinoma pancreático e infección. El incremento de grasa en páncreas puede provocar esteatosis pancreática, generando una disminución en la secreción de insulina. La pérdida de funcionalidad de la célula  $\beta$  se asocia con atrofia del páncreas exócrino, contribuyendo a la RI y diabetes. Finalmente, algunos estudios han demostrado que el uso de hormonas como el cortisol, la hormona del crecimiento, glucagón y epinefrina para tratar acromegalia, glucagonoma y el síndrome de Cushing, pueden provocar una disminución en la secreción de insulina que generalmente se acompaña de hiperglucemia. También, la terapia farmacológica con glucocorticoides, ácido nicotínico e interferón gamma puede contribuir al desarrollo de diabetes (ADA, 2014; Kharroubi and Darwish, 2015).

### **1.3. Mecanismo de regulación de la insulina**

La insulina es una hormona anabólica que inicia sus acciones biológicas mediante su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular de varios tejidos, incluidos el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína tetrámerica que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento. El IR está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades  $\beta$  unidas por enlaces disulfuro (da Silva Rosa et al., 2020; Olivares Reyes and Arellano Plancarte, 2008). La unión de la insulina a la subunidad  $\alpha$  genera un cambio conformacional en la subunidad  $\beta$ , lo que permite la transfosforilación entre las subunidades  $\beta$  en residuos de tirosina en el bucle de activación. La fosforilación en residuos de Tyr<sup>1158</sup>, Tyr<sup>1162</sup> y Tyr<sup>1163</sup>, junto con una fosforilación adicional en Tyr<sup>972</sup> en la región yuxtamembranal, son fundamentales para el reclutamiento de sustratos del IR. Actualmente, la familia de proteínas IRS incluyen IRS-1-IRS-6. Aunque los seis sustratos tienen sitios de fosforilación muy similares, *in vivo* su activación involucra funciones distintas, siendo IRS-1 e IRS-2 proteínas fundamentales en el metabolismo de la glucosa en músculo esquelético

e hígado (Petersen and Shulman, 2018). La activación del IR permite el reclutamiento de IRS a la membrana mediante la interacción de dominios específicos en el IRS, llamados PTB (dominio de unión a fosfotirosinas). Su fosforilación en múltiples residuos de tirosina por el IR promueve la unión de proteínas que contienen dominios de homología a Src 2 (SH2). Los efectos de la insulina promueven procesos mitogénicos y metabólicos. Los procesos mitogénicos se encuentran relacionados con la activación de la vía MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos), mientras que los mecanismos metabólicos involucran la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), vía importante en la regulación de GLUT4 (Boucher et al., 2014; Huang et al., 2018).

#### **1.4. Distribución y expresión de los transportadores de glucosa en tejidos sensibles a la insulina**

Los GLUTs son proteínas integrales que participan en el transporte de carbohidratos y pequeños compuestos de carbono en células eucariontes. La concentración de glucosa en sangre y su transporte al interior de la célula dependen de mecanismos homeostáticos, los cuales promueven la captación de glucosa a través de un sistema por difusión facilitada. Debido a la composición química de la bicapa lipídica de las células, las membranas celulares son impermeables a la glucosa, lo que implica el uso de estos transportadores en la homeostasis de la glucosa (Lacombe, 2014; Mueckler and Thorens, 2013). Existen dos categorías de transportadores de glucosa en mamíferos codificados en diferentes genes. Ambos grupos pueden incorporar la glucosa, sin embargo, la captación de glucosa en las células epiteliales del intestino delgado y el borde en cepillo de los túbulos contorneados proximales del riñón, dependen de un mecanismo activo que involucra cotransportadores de sodio, facilitando la captación de glucosa en contra del gradiente de concentración (Lacombe, 2014). Por otro lado, la familia GLUT está constituida por 14 miembros distribuidos en todas las células del cuerpo. De acuerdo con las características funcionales y estructurales, se clasifican en tres grupos: La clase I incluye a GLUT1-4 y 14, la clase II comprende a GLUT5, 7, 9 y 11, mientras que la clase III engloba a GLUT6, 8, 10, 12 y 13 (conocido como HMIT) (Karim et al., 2012). Aunque muchos

de ellos participan en el transporte de glucosa en diferentes tejidos, los primeros estudios determinaron que GLUT1, 2, 3 y 4 se encuentran involucrados en la homeostasis de la glucosa, sin embargo, una expresión y actividad alterada de estos transportadores puede asociarse con DT2 (Mueckler and Thorens, 2013).

El transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) es una proteína de 54 KDa presente en humanos y roedores. Se encuentra distribuido en la mayoría de los tejidos, principalmente eritrocitos, membranas neuronales, ojos, placenta y hepatocitos (periportales y perivenosos). El principal sustrato de GLUT1 es la glucosa, con una  $K_m = 1-2$  mmol/L, pero también puede transportar otros hidratos de carbono, como galactosa, glucosamina y manosa (Karim et al., 2012). Un alto nivel de expresión de GLUT1 se ha asociado con una amplia variedad de tumores, incluyendo carcinoma hepatocelular (Amann et al., 2009).

Por otro lado, el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) representa uno de los principales transportadores de la familia GLUT; su expresión es abundante en células  $\beta$  pancreáticas, el túbulo contorneado proximal, células intestinales y hepatocitos. El gen GLUT2 codifica una proteína de 524 aminoácidos con una afinidad alta por la glucosa (17 mmol/L), lo cual permite transportarla de manera eficiente. GLUT2 se encuentra altamente expresado en hígado, y su actividad en hepatocitos regula la captación y liberación de glucosa durante el estado de ayuno y la ingesta de alimentos (Mueckler and Thorens, 2013). El incremento de GLUT2, junto con la alta actividad de la glucocinasa, promueve un incremento del glucógeno hepático, mecanismo importante para regular la concentración de glucosa (~5 mmol/L) en individuos sanos. Sin embargo, alteraciones genéticas de GLUT2 en humanos, se ha asociado con hipoglucemia en ayunas, hepatomegalia (defectos en el almacenamiento de glucógeno en hígado) y DT2 (Chadt and Al-Hasani, 2020).

El transportador de glucosa tipo 3 (GLUT3) es una proteína de 496 aminoácidos presente en una variedad de tejidos, como células musculares, neuronas, riñones, corazón y en hígado con niveles más bajos de expresión. Su alta afinidad ( $K_m = 1.8$  mmol/L) hacia la glucosa permite transportarla de manera eficiente, pero también puede transportar maltosa, xilosa, manosa y galactosa. Se ha observado que la alta

demanda energética de los glóbulos blancos genera un incremento de GLUT3, facilitando la absorción de glucosa, factor alterado durante la diabetes (Karim et al., 2012). En el caso de GLUT4, su expresión es alta en adipocitos, músculo esquelético y cardiomiocitos. Su  $K_m$  para la glucosa es de 5 mmol/L, pero también puede transportar glucosamina. Su translocación a la membrana celular depende de insulina, un mecanismo altamente regulado y que se encuentra alterado durante la diabetes. Aunque, el hígado carece de una expresión significativa de GLUT4, se ha asociado el incremento de GLUT4 en células hepáticas con una mejora metabólica, atenuando los efectos producidos por la DT2 (Chadt and Al-Hasani, 2020; Karim et al., 2012; Tong et al., 2018).

### **1.5. GLUT4 y su participación en el metabolismo de glucosa en músculo esquelético**

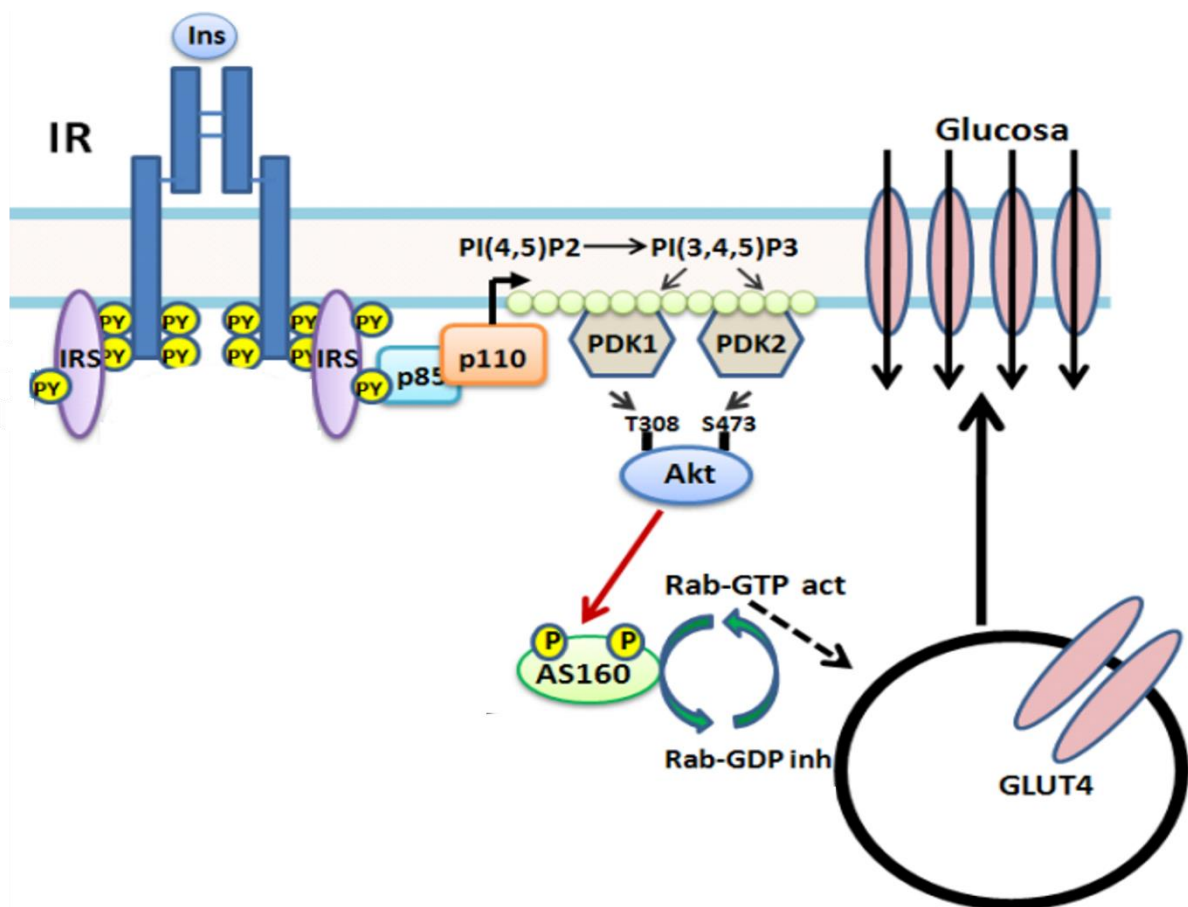
El músculo esquelético es un tejido que participa en el metabolismo de glucosa en el organismo. La mayor parte de la glucosa disponible después de la digestión es absorbida y almacenada en forma de glucógeno en este tejido. La insulina promueve cambios metabólicos a través de la vía PI3K/proteína cinasa B (Akt). La unión del IR-IRS permite el reclutamiento de PI3K a la membrana celular mediante dominios SH2. PI3K es un heterodímero formado por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). Las subunidades reguladoras están codificadas por tres diferentes genes. *Pik3r1* codifica a p85 $\alpha$ , p50 $\alpha$  y p55 $\alpha$ ; por otro lado, *Pik3r2* codifica a p85 $\beta$ ; mientras que *Pik3r3* codifica a p55 $\gamma$ . Las subunidades catalíticas de PI3K, p110 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  se derivan de *Pik3ca*, *Pik3cb* y *Pik3cd*. En músculo esquelético se ha observado que las isoformas reguladoras (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\alpha$ ) y las subunidades catalíticas (p110 $\alpha$  y  $\beta$ ) son relevantes en la vía de la insulina en este tejido (Petersen and Shulman, 2018). La interacción de la subunidad reguladora sobre la catalítica permite la estabilidad del complejo y su inhibición, mientras que la unión de la subunidad reguladora de PI3K a IRS induce la activación de la subunidad catalítica. Este evento induce la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), resultando en el reclutamiento de diferentes proteínas a la membrana plasmática con dominios PH



(dominio de homología a pleckstrina), como PDK1 (proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1) y Akt. La activación de PDK1 y Akt derivado de la unión de  $\text{PIP}_3$  en sus dominios PH resulta en un incremento de la fosforilación de Akt en  $\text{Thr}^{308}$  mediada por PDK1. Sin embargo, el estado activo de Akt depende de una segunda fosforilación en  $\text{Ser}^{473}$  en su motivo hidrofóbico, la cual es regulada por el complejo blanco de la rapamicina en mamíferos 2 (mTORC2) (Fazakerley et al., 2019). Existen tres isoformas de Akt codificadas en diferentes genes, ambas isoformas son proteínas cinasas de serina/treonina que tienen dominios PH, esto les confiere la capacidad de interactuar con el  $\text{PIP}_3$ . La isoforma que participa en el control del metabolismo energético en tejidos sensibles a insulina como músculo esquelético e hígado es Akt2. Se ha observado que en ratones con delección de Akt2 desarrollan RI y diabetes. Akt2 regula diferentes funciones celulares que van desde la síntesis de proteínas, hasta la proliferación celular mediada por las proteínas cinasas ribosomales S6 (S6K1 y S6K2). Por otro lado, el efecto con mayor estudio en la vía de señalización de la insulina es el transporte de glucosa mediado por GLUT4 (Boucher et al., 2014; Olivares Reyes and Arellano Plancarte, 2008).

Existen diferentes proteínas implicadas en la captación de glucosa en músculo esquelético que son reguladas por Akt. El sustrato de Akt de 160 KDa (AS160) es una proteína asociada a vesículas de GLUT4. La estimulación con insulina provoca que Akt2 fosforile a AS160, lo que conduce a su inhibición y a la activación de proteínas GTPasas pequeñas que promueven la translocación de GLUT4 a la membrana celular (Zheng and Cartee, 2016). Las proteínas GTPasas pequeñas de la familia Rab se han identificado como responsables de la regulación del tráfico, anclaje y fusión de vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática. La forma activa de AS160 funciona como una proteína activadora de GTPasas (GAP), generando la hidrólisis del GTP (guanosina 5'-trifosfato) presente en la proteína Rab, lo que conduce a un estado inactivo de esta proteína y la formación de Rab-GDP, por lo que la inhibición de AS160 mediada por Akt permite la movilización de las vesículas a la membrana en un evento regulado por Rab en su forma activa (Rab-GTP) (Chavez et al., 2008; Sakamoto and Holman, 2008) (Figura 1). Algunos miembros de la familia, como Rab8A, Rab10 y Rab13 se expresan en músculo

esquelético y se encuentran presentes en vesículas que contienen GLUT4. Su activación con insulina regula la translocación de GLUT4 a la membrana celular. Por otro lado, se ha observado que la activación de la proteína Rac1 de la familia Rho, promueve la translocación de GLUT4 como un segundo mecanismo de señalización dependiente de PI3K, a través de un reordenamiento del citoesqueleto en células musculares. Sin embargo, los mecanismos moleculares que contribuyen a la translocación de GLUT4 por Rac1 aún son desconocidos (Sato, 2014).



**Figura 1.** Mecanismo de acción de la insulina en músculo esquelético. (Olivares Reyes and Arellano Plancarte, 2008).

### 1.6. Expresión y translocación de GLUT2 y GLUT4 en hepatocitos

GLUT2 representa el transportador más abundante en hepatocitos y regula el transporte de glucosa bidireccionalmente; comparte el 81% de similitud con las

secuencias de aminoácidos entre el humano y el ratón. La estimulación con glucosa promueve que la proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBP)-1c se una a la región promotora de GLUT2, incrementando su expresión. En condiciones normales GLUT2 permite la entrada de glucosa para su almacenamiento en glucógeno, contribuyendo a un estado metabólico normal en los seres humanos; sin embargo, mutaciones de GLUT2 en humanos se relacionan con defectos en el almacenamiento de glucógeno en hígado (Narasimhan et al., 2015; Zhao and Keating, 2007). Se ha observado que en animales diabéticos la concentración de GLUT2 en la membrana plasmática de hepatocitos incrementa. También, una dieta alta en grasas promovió una alteración de los niveles de GLUT2 a la membrana plasmática, contribuyendo al estado fisiopatológico del hígado en ratas (Leturque et al., 2009). Por otra parte, la disminución de GLUT2 en hígado se ha relacionado con una pérdida del contenido de glucógeno en modelos murino diabéticos (Jayachandran et al., 2018; Mokashi et al., 2017). Aunque existen pocos estudios que respaldan la función de GLUT2 en el desarrollo de la DT2 en hígado, es necesario continuar con nuevas investigaciones para sustentar la acción reguladora de GLUT2 en hepatocitos (Leturque et al., 2009).

Por otro lado, GLUT4 es un transportador muy importante que modula la absorción de glucosa dependiente de insulina. Su distribución se encuentra en gran medida en el tejido adiposo y músculo esquelético (Chadt and Al-Hasani, 2020). Aunque se cuenta con pocos estudios que respaldan la función de GLUT4 en hígado, se ha determinado que GLUT4 cumple una función muy importante durante la RI en hígado (Tong et al., 2018) . Algunos tipos celulares presentes en hígado, como las células endoteliales sinusoidales y células estrelladas presentan alta expresión de GLUT4, mediando la captación de glucosa en un evento dependiente de la vía PI3K/Akt (Chandrashekar et al., 2017; Karim et al., 2012). Sin embargo, el incremento de GLUT4 regulado por leptina, induce esteatohepatitis no alcohólica y RI. La obesidad es un estado patológico que suele estar asociado con RI e hiperleptinemia; ambos estados pueden conducir al desarrollo de DT2 y esteatohepatitis no alcohólica. Los pacientes con la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) en su forma avanzada pueden desarrollar fibrosis hepática. Las

células estrelladas hepáticas participan en la producción de matriz extracelular y su activación descontrolada puede generar fibrosis hepática. Se ha observado que la alta demanda energética de estas células conduce a un incremento de GLUT4, junto con la producción de matriz extracelular, contribuyendo al desarrollo de fibrosis hepática (Tang and Chen, 2010). En el caso de los hepatocitos, la baja expresión y translocación de GLUT4 a la membrana contribuye al desarrollo de cirrosis hepática y RI. Muchos estudios han informado el papel importante de GLUT4 en las enfermedades metabólicas del hígado, incluyendo una atenuación en la sensibilidad a la insulina (Kim et al., 2014).

### **1.7. Almacenamiento de glucosa en hígado y músculo esquelético**

El glucógeno es un polisacárido presente en hígado y músculo esquelético. Alrededor de 55000 unidades de glucosa componen el glucógeno en músculo y representa la principal fuente de energía en el organismo. Su estructura química está organizada por la unión de glucosas a través de enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), mientras que sus ramificaciones se encuentran unidas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (Adeva-Andany et al., 2016). En un individuo sano, el músculo esquelético representa entre el 40-50% del peso corporal y contiene el 80% del glucógeno almacenado. Por otro lado, el hígado es un órgano más pequeño y en un individuo joven puede almacenar alrededor de 100 g. Durante un ayuno prolongado el 65% del glucógeno hepático disminuye. Este mecanismo ayuda a mantener la glucemia en el organismo en un estado fisiológico, debido a que el hígado contribuye a la liberación de glucosa a la sangre. Sin embargo, la disminución de la glucosa 6-fosfatasa en músculo esquelético permite que la obtención de energía, producto de la degradación del glucógeno, sea para uso local y sólo se encuentre disponible para situaciones de ejercicio y supervivencia (lucha o huida) (Han et al., 2016; Jensen et al., 2011).

La fosforilación de GSK-3 (cinasa de la glucógeno sintasa 3) por Akt, permite el almacenamiento de glucógeno en hígado y músculo esquelético. GSK-3 es una serina/treonina cinasa importante en la homeostasis de la glucemia. Se conocen dos isoformas de GSK-3 (GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ ) codificadas en diferentes genes, su inhibición es mediada por la señalización de la insulina, lo que conduce a la

fosforilación en su extremo amino terminal en Ser21 para GSK-3 $\alpha$  y Ser9 para GSK-3 $\beta$  por Akt. La inhibición de GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$  por insulina en ambos tejidos permite la activación de la glucógeno sintasa (GS), una enzima importante para la formación de glucógeno (MacAulay et al., 2007; Rayasam et al., 2009). La producción de glucógeno es regulada mediante la activación de diferentes enzimas. Cuando la glucosa ingresa a la célula, la hexocinasa fosforila a la glucosa, generando glucosa 6-fosfato. Después, el grupo fosfato del carbono 6 es transferido al carbono 1 de la glucosa a través de la fosfoglucomutasa-1. El siguiente paso es la formación de UDP (uridina 5'-difosfato)-glucosa a partir de UTP y glucosa 1-fosfato. Este proceso es catalizado por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa. La transferencia de glucosa para la formación de glucógeno se debe a la actividad de la glucogenina, la cual transfiere la glucosa proveniente de la UDP-glucosa, formando una cadena de aproximadamente 10 a 20 unidades de glucosa. Finalmente, el crecimiento de las cadenas iniciales del glucógeno es catalizado por la GS, a partir de la transferencia de glucosa proveniente de la UDP-glucosa. La GS promueve la adición de enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre las glucosas de las cadenas en formación, mientras que la enzima ramificante añade enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) en los puntos de ramificación de las cadenas del glucógeno (Adeva-Andany et al., 2016). Además, la actividad de GS puede ser regulada por la alta concentración de glucosa 6-fosfato y por fosforilaciones en Ser641, Ser645, Ser649 y Ser653 mediadas por GSK-3. Por lo tanto, el incremento de glucógeno en músculo esquelético e hígado depende de la inhibición de GSK-3 y de su activación alostérica (Jensen et al., 2011; MacAulay et al., 2007).

### **1.8. Alteraciones metabólicas de la DT2 y su importancia en el hígado**

Defectos en la señalización de la insulina generan que el metabolismo de glucosa y ácidos grasos se modifique, aumentando la producción hepática de glucosa y alterando su captación y almacenamiento en tejidos insulino dependientes, como músculo esquelético y tejido adiposo. A pesar de que en estos tejidos el balance energético es importante, el hígado es uno de los principales órganos susceptibles a la hiperglucemia, conduciendo a la lesión de los tejidos en este órgano (Mohamed et al., 2016). Esto es seguido por alteraciones en el metabolismo de proteínas,

lípidos e hidratos de carbono, generando inhibición de la lipogénesis y la síntesis de glucógeno, lo que provoca dislipidemia e hiperglucemia, factores claves en el desarrollo de DT2.

El hígado es el principal órgano destoxicador del cuerpo y participa en la homeostasis metabólica, principalmente para la síntesis, almacenamiento y redistribución de carbohidratos, proteínas y lípidos. El desarrollo de la RI junto con la obesidad es un proceso fisiopatológico donde las células no responden normalmente a la insulina (Bechmann et al., 2012). Por lo tanto, un incremento en la producción de glucosa en hígado y una disminución en la captación de glucosa mediada por GLUT4 son factores que contribuyen al desarrollo de DT2. La hiperglucemia es generada por el exceso de glucosa hepática y la absorción reducida de glucosa por los tejidos periféricos. Esto genera que las células  $\beta$  del páncreas aumenten la producción y secreción de insulina, generando un estado de hiperinsulinemia. Si el aumento de insulina en sangre se mantiene, el páncreas deja de secretar insulina, contribuyendo al estado fisiopatológico de la DT2 (Bazotte et al., 2014), afectando la captación de glucosa en hígado. Los hepatocitos son las células efectoras del hígado, ya que la mayoría de las funciones del hígado podrían atribuirse a su actividad. Estas células representan el 80% de la masa total del hígado y desempeñan un papel importante en el metabolismo de lípidos a través de la síntesis de muchas clases de lipoproteínas y catabolismo del colesterol derivado de la sangre (Maslak et al., 2015).

El aumento de la obesidad en todo el mundo se asocia con el aumento en la prevalencia de la NAFLD. NAFLD se caracteriza por una acumulación de lípidos dentro del hepatocito; si no se controla, puede generar una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Después de la ingesta de alimento, la grasa se digiere en el intestino delgado y se absorbe en los enterocitos, formando triacilglicéridos (TAG). Posteriormente, son secretados al sistema linfático como quilomicrones y, al llegar al hígado a través de la circulación, liberan ácidos grasos no esterificados (NEFA). Los NEFA ingresan al hepatocito principalmente por las proteínas transportadoras de ácidos grasos tipo 2 y 5 (FATP 2 y 5), promoviendo el almacenamiento y

distribución de lípidos (Rui, 2014). Sin embargo, durante el proceso de lipólisis y degradación de las gotas de lípidos, un proceso de autofagia desempeña un papel importante en la homeostasis hepática de lípidos. La macro autofagia conduce a la fusión de los lisosomas y las gotas de lípidos, permitiendo la degradación de TAG. Por otro lado, los ácidos grasos (FA) liberados pueden ser degradados por  $\beta$ -oxidación. Durante un ayuno prolongado se genera la inhibición de mTOR, aumentando la autofagia. Esta proteína es fundamental en la señalización de la insulina y durante un estado de RI se encuentra activada, inhibiendo la autofagia e incrementando los FA libres (Bechmann et al., 2012).

El incremento de glucosa y metabolitos, como TAG y FA (Acil-CoA graso, ceramidas y diacilglicerol (DAG)) promueve la RI en hígado. Se ha observado que la expresión de SREBP-1c promueve la acumulación de grasa en hígado, debido a la síntesis de FA. En condiciones normales la insulina activa la lipogénesis hepática mediante SREBP-1c. Sin embargo, durante la RI el incremento de insulina (hiperinsulinemia) produce la acumulación de TAG en el hígado. La producción de algunos marcadores, como el ácido fosfatídico (PA) y el DAG, resultantes de la degradación de fosfolípidos de membrana y lípidos (ceramidas y acilcarnitinas), contribuyen al desarrollo de RI (Nagle et al., 2009). PA promueve la activación de mTOR, lo que conduce a la fosforilación de IRS de manera negativa (Foster, 2007). Por su parte, los DAG promueven la activación de la PKC- $\epsilon$  (proteína cinasa C épsilon), suprimiendo la actividad del IRS por una fosforilación en Ser307 mediada por PKC- $\epsilon$ . La disminución de la actividad de IRS causa que PI3K no se active, contribuyendo a la RI de manera sostenida. También, el estado inflamatorio induce la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) en hepatocitos debido a la producción de TNF- $\alpha$ , mientras que el exceso de ceramidas disminuye la actividad de Akt e incrementa la transcripción de PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y G6Pase (glucosa-6-fosfatasa), contribuyendo a la producción de glucosa hepática y al estado hiperglucémico del organismo (Nagle et al., 2009; Zhang et al., 2013).

Durante el estado postprandial, el hepatocito aumenta la captación de glucosa a través de GLUT2, en contraste con GLUT4, ya que la expresión y actividad de

GLUT2 es independiente de la señalización de la insulina. GLUT4 es dependiente de insulina y durante una respuesta normal a la insulina, esta hormona actúa para estimular la captación de glucosa través de cascadas enzimáticas intracelulares, aumentando la movilización de GLUT4 a la membrana (Kim et al., 2014). La formación de glucosa 6-fosfato en el hepatocito promueve la producción de ATP, conduciendo a una reducción en las concentraciones de glucosa intracelular. La glucosa 6-fosfato actúa como precursor para la síntesis de glucógeno. La glucosa 6-fosfato también puede integrarse a la vía de las pentosas fosfato para generar NADPH y sintetizar FA en un proceso de lipogénesis. Sin embargo, durante una respuesta de ayuno, los hepatocitos aumentan la degradación de glucógeno y aumentan la formación de glucosa a través de la gluconeogénesis (Rui, 2014). Se sabe que la RI inducida por una dieta alta en grasas aumenta la gluconeogénesis hepática, disminuyendo la formación de glucógeno. Por lo tanto, este proceso sirve como un marcador de RI específico para el tejido hepático (Bazotte et al., 2014; Yadav et al., 2017).

### **1.9. RI, alteraciones metabólicas en músculo esquelético**

La RI es un deterioro progresivo en tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, adipocitos e hígado. La acción que ejerce la insulina en un individuo sano permite que la captación y almacenamiento de glucosa en estos tejidos se lleve a cabo. Específicamente en músculo esquelético, la reducción en la captación y almacenamiento de glucosa se ve afectada durante la RI. Uno de los principales factores que contribuyen en la RI en músculo, es la acumulación de lípidos (Sokolowska and Blachnio-Zabielska, 2019). Entre las rutas metabólicas alteradas durante la RI, se encuentran defectos en el metabolismo de FA, incluyendo alteraciones en la captación de FA, así como síntesis y degradación de TAG. El incremento circulante combinado con el aumento intracelular de FA, DAG, ceramidas, TAG y Acil-CoA de cadena larga (LC-CoA) contribuyen al incremento de RI y DT2. La insulina promueve la activación de IRS-1 e IRS-2, desencadenando una activación de diferentes intermediarios, como PI3K, Akt, PKC- $\zeta$  (proteína cinasa C atípica zeta) y PKC- $\lambda$  (proteína cinasa C atípica lambda). Este proceso conduce a



la movilización de GLUT4 a la membrana plasmática y a la síntesis de glucógeno en un mecanismo regulado por la GS en músculo esquelético. Sin embargo, la acumulación de ceramidas, LC-CoA y DAG en este tejido provoca que la vía de señalización de la insulina se vea afectada (Turcotte and Fisher, 2008). Una de las principales proteínas que se activan por DAG y LC-CoA es PKC- $\theta$  (proteína cinasa C theta); su activación se asocia con una disminución de PI3K y el IRS-1, generando que GLUT4 no se transloque a la membrana plasmática, dando como resultado una disminución en la producción de glucógeno (Derek and Gerald, 2010). A pesar de que la insulina promueve efectos benéficos sobre el metabolismo de glucosa, el estado inflamatorio puede contribuir a la reducción de la señalización de esta hormona. La actividad de NF- $\kappa$ B promueve la transcripción de TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral alfa) e IL-6 (interleucina-6). Se ha observado que el incremento de ambas citocinas durante la RI se acompaña de una reducción de GLUT4 en todos los tejidos sensibles a la insulina. Se ha observado que el tratamiento con TNF- $\alpha$  en miotubos induce fosforilación de IRS-1 en Ser307, mientras que la adición de IL-6 incrementa la producción de glucosa hepática y reduce la captación de glucosa en músculo esquelético, aún con el tratamiento con insulina (Leguisamo et al., 2012; Nieto-Vazquez et al., 2008).

### **1.10. Terapia farmacológica para el control de la DT2**

El control glucémico y metabólico es el principal objetivo de la terapia farmacológica para la DT2. Evitar episodios de hipoglucemia en el organismo podría ayudar a prevenir complicaciones micro y macrovasculares en el individuo. La actividad física puede mejorar el estado metabólico del paciente, ayudando a disminuir las concentraciones de glucosa y lípidos en sangre, presión arterial y el contenido de grasa hepática. A pesar de esto, es necesario implementar el uso de fármacos que puedan corregir el desequilibrio metabólico generado por la DT2. El tratamiento farmacológico debe basarse en las necesidades individuales, calidad de vida y el estado metabólico del paciente (Padhi et al., 2020). La adición de un solo fármaco puede aminorar los efectos de la DT2 en su etapa temprana; conforme avancen las complicaciones de la DT2 es necesario incorporar un segundo fármaco que difiera

en el mecanismo de acción. Sin embargo, existen pocos estudios clínicos que apoyen la idea del uso combinado de fármacos para el tratamiento de la DT2 (Pfeiffer and Klein, 2014). Por lo tanto, la edad, peso corporal, estadio y las comorbilidades de la enfermedad son factores importantes para la selección de una terapia farmacológica eficaz. A continuación, se describen algunos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2, los cuales difieren en su mecanismo de acción.

### **1.10.1. Biguanidas**

Estos fármacos ayudan a mejorar la respuesta de la insulina en tejidos insulino dependientes. Su mecanismo de acción se asocia con la disminución de la glucosa hepática (inhibición de la gluconeogénesis) y el incremento de la glucólisis, mejorando la señalización de la insulina. Las biguanidas incluyen a la metformina, fenformina y buformina. La metformina se utiliza como tratamiento inicial cuando los pacientes son diagnosticados con DT2 (Padhi et al., 2020). El mecanismo antihiper glucémico de la metformina se asocia con la regulación de la glucemia en el organismo, a través de una reducción del proceso gluconeogénico y la disminución de los niveles de glucosa en sangre en ayuno. Existen diferentes isoformas de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) que ayudan a movilizar a la metformina desde la luz intestinal hasta la membrana basolateral del riñón y los hepatocitos. En el caso de OCT1 y OCT3 se encuentran mayoritariamente expresados en el tejido hepático y su función es transportar a la metformina de la sangre a los hepatocitos. Aunque los efectos benéficos de la metformina sobre el metabolismo de glucosa aún no están claros. Su administración inhibe la gluconeogénesis hepática a través de diferentes mecanismos. La relación de AMP/ATP a nivel celular puede ser el principal mecanismo por el cual la metformina ejerce sus efectos. El incremento de AMP generado por la inhibición de la NADH oxidoreductasa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, induce la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK); esto conduce a la inhibición de factores de transcripción que participan en la gluconeogénesis hepática (Singh et al., 2016). Dentro de los efectos secundarios más frecuentes se

encuentran, complicaciones gastrointestinales, principalmente al inicio del tratamiento. Sin embargo, una filtración glomerular por debajo de 60 ml/min es una de las principales contraindicaciones para el uso de la metformina en pacientes con DT2. Por lo tanto, el tratamiento con metformina debe contraindicarse en pacientes con problemas renales (Pfeiffer and Klein, 2014).

### **1.10.2. Sulfonilureas**

Las sulfonilureas (SU) se consideran un tratamiento de primera y segunda línea para pacientes con DT2. Actualmente, las SU se clasifican en fármacos de primera y segunda generación (Filion et al., 2019). Las drogas de segunda generación engloban a la glimepirida, gliclazida y glibenclamida. Aunque los agentes de primera generación son eficaces y presentan menos efectos adversos, los fármacos de segunda generación pueden generar metabolitos activos que prolongan su acción. En general, las SU incrementan la secreción de insulina y su uso puede reducir la hemoglobina glicada (HbA1c) entre el 1 y 2%. Su mecanismo de acción involucra el cierre del canal de potasio dependiente de ATP ( $K^{+}_{ATP}$ ), mediante la unión a receptores SUR1 (receptor de sulfonilurea 1) de alta afinidad en la membrana plasmática de las células  $\beta$  pancreáticas. La interacción de SU con SUR1 genera el bloqueo de los canales  $K^{+}_{ATP}$  disminuyendo la concentración de iones potasio ( $K^{+}$ ) en la célula. El incremento de cargas negativas dentro de la célula induce la despolarización de la membrana plasmática, evento que genera la entrada de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) al interior de la célula a través de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. El incremento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático desencadena la secreción de insulina de forma independiente de la concentración de glucosa (Apovian, 2011; Singh et al., 2016). Algunas de las ventajas que se han establecido por el uso de las SU en el tratamiento de la DT2 es la seguridad a largo plazo, bajo costo y extensos ensayos clínicos que demuestran su eficacia en la disminución de la glucosa. Sin embargo, la hipoglucemia y el aumento de peso son los principales efectos adversos generados por las SU. La hipoglucemia es el efecto adverso más frecuente en pacientes con edad avanzada y se ha establecido que el tratamiento

con SU puede asociarse con riesgo cardiovascular (Hoimark et al., 2012; Pfeiffer and Klein, 2014).

### **1.10.3. Meglitinidas**

Los análogos de meglitinida son una clase de fármacos hipoglucemiantes orales derivados del ácido benzoico. Estos fármacos estimulan la liberación de insulina en las células  $\beta$  del páncreas a través de un mecanismo similar a las SU. Aunque el sitio de unión del receptor para SU y meglitinidas es diferente, ambos grupos bloquean los canales de  $K^+_{ATP}$  presentes en la membrana plasmática de las células  $\beta$ , lo que conduce a la despolarización de la membrana y el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, induciendo la liberación de los gránulos de insulina (Padhi et al., 2020). Actualmente, se encuentra la repaglinida (derivado del ácido benzoico) y la nateglinida (derivado de la D-fenilalanina) para uso clínico en la fase temprana de los pacientes con DT2 (Singh et al., 2016). Debido a que sus tiempos de vida media son cortos y el sitio de unión al receptor de sulfonilureas es diferente, deben administrarse con más frecuencia. Algunos ensayos clínicos indican que estos fármacos pueden generar un incremento de peso de 3 kg durante 3 meses de tratamiento. Sin embargo, algunos estudios proporcionan evidencia de que sus efectos podrían ser más benéficos en la reducción de la glucosa posprandial, HbA1c (hasta un 1.5%) y la disminución de episodios de hipoglucemia, que las SU (Apovian, 2011; Black et al., 2007).

### **1.10.4. Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas**

Uno de los principales agentes antidiabéticos orales utilizados en el control de la DT2 son los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas. Durante la digestión se genera la hidrólisis de oligosacáridos a monosacáridos mediante complejos enzimáticos conocidos como  $\alpha$ -glucosidasas ubicados en las microvellosidades de los enterocitos. La adición de estos fármacos genera una disminución de la hiperglucemia posprandial mediante la inhibición reversible de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Esto reduce la absorción y la formación de carbohidratos simples a nivel intestinal, disminuyendo las concentraciones de glucosa en sangre (Padhi et al., 2020; Santa-Cruz and Zacarías-Castillo, 2002). Los inhibidores de  $\alpha$ -

glucosidasas son sacáridos que comparten muchas características químicas y estructurales con los oligosacáridos naturales; esto les confiere mayor afinidad por las  $\alpha$ -glucosidasas y permite disminuir la digestión de carbohidratos como el almidón. Actualmente, se utiliza el miglitol, voglibosa y la acarbosa como tratamiento de la DT2. En particular, la administración de acarbosa ha presentado una disminución del 0.8% de HbA1c, mientras que el miglitol mostró efectos moderados de HbA1c muy similares. También, estos fármacos se han relacionado con el incremento de GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1), lo que ayuda a disminuir el apetito en pacientes con DT2. Algunos de los efectos adversos que se atribuyen son principalmente gastrointestinales, entre ellos: diarrea, dolor abdominal y flatulencias. Por este motivo, están contraindicados en pacientes con trastornos intestinales crónicos como: colitis ulcerosa, cetoacidosis diabética o enfermedad de Crohn (Apovian, 2011; Padhi et al., 2020).

#### **1.10.5. Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)**

Durante la ingesta de alimento las células L del intestino delgado liberan GLP-1, mientras que las células K liberan GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en el organismo. Estas hormonas se conocen como incretinas y participan en la homeostasis de la glucosa. GLP-1 y GIP estimulan la secreción de insulina e inhiben la secreción de glucagón, ejerciendo efectos sobre la proliferación y supervivencia de las células  $\beta$  del páncreas. Su acción reduce la concentración de glucosa en sangre y la gluconeogénesis hepática, mejorando el metabolismo de la glucosa en pacientes con DT2. La liberación de GLP-1 depende de la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en las células L del intestino. El cierre de los canales de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  y la despolarización de la membrana producto del metabolismo de carbohidratos en la célula, provoca el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que conduce a la liberación de GLP-1. El tiempo de vida media del GLP-1 es corto, debido a la actividad enzimática de la DPP-4, una enzima involucrada en la degradación de incretinas (Padhi et al., 2020; Reyes-Sanamé et al., 2015). La DPP-4 es una proteasa de serina presente en la membrana plasmática, la degradación de GLP-1 y GIP ocurre por la actividad de esta enzima

y, la inhibición de su actividad, se considera la base del tratamiento para el control de la DT2. Los pacientes que no siguen una dieta y ejercicio estricto pueden utilizar inhibidores de la DPP-4 como monoterapia y terapia dual en combinación con metformina e insulina (Hoimark et al., 2012; Marín-Peñalver et al., 2016). La sitagliptina, vildagliptina y la saxagliptina son algunos de los inhibidores de la DPP-4 más representativos. La FDA aprobó a la sitagliptina como el primer inhibidor de la DPP-4 (Pfeiffer and Klein, 2014; Singh et al., 2016). Algunos ensayos clínicos mostraron una disminución significativa de HbA1c con el tratamiento de sitagliptina. En general, los inhibidores de DPP-4 se consideran seguros, sin embargo, la combinación con sulfonilureas o insulina pueden generar un mayor riesgo de hipoglucemia. La monoterapia con estos fármacos es la primera línea para pacientes con intolerancia a la metformina. Los efectos adversos más comunes son: dolor de cabeza, mareos, diarrea e infecciones moderadas de vías respiratorias y urinarias (Marín-Peñalver et al., 2016; Padhi et al., 2020).

#### **1.10.6. Tiazolidinedionas (TZD)**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción presentes en diferentes tejidos. Su principal función es modular el metabolismo de glucosa y lípidos, incrementando la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (Marín-Peñalver et al., 2016). Actualmente, se conocen tres isoformas denominadas PPAR $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . Cada isoforma se encuentra distribuida en diferentes tejidos y cumplen una función muy importante en el metabolismo energético. La isoforma gamma (PPAR $\gamma$ ) participa en la diferenciación de los adipocitos, metabolismo de carbohidratos y lípidos. En músculo esquelético mejora la captación de glucosa, mientras que en hígado disminuye el proceso gluconeogénico. El desarrollo de RI en pacientes con DT2 se asocia con pérdida de la función de PPAR $\gamma$ . Por lo tanto, PPAR $\gamma$  puede considerarse un blanco de interés para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que ayuden a disminuir los efectos de la DT2. Algunos agentes antidiabéticos como las TZD (comúnmente conocidas como glitazonas) ofrecen una nueva propuesta terapéutica para el manejo de la DT2 (Noble et al., 2005; Padhi et al., 2020). La acción de las

TZD mejora el metabolismo de los lípidos en tejido adiposo, músculo esquelético y hepático, disminuyendo la lipotoxicidad en ambos tejidos. Este efecto mejora la sensibilidad a la insulina, incrementando la supervivencia de las células  $\beta$  por una reducción en la secreción de insulina, lo que ayuda al control glucémico a largo plazo en tejidos periféricos (Apovian, 2011).

Las TZD son agonistas de PPAR $\gamma$  y, de acuerdo con la FDA, se considera a pioglitazona, rosiglitazona y troglitazona como agentes de primera generación para el tratamiento de la diabetes. La activación de los PPAR es un evento molecular que concluye con la transcripción de genes importantes para el metabolismo energético (Soccio et al., 2014). En el caso de PPAR $\gamma$ , la activación por ligando genera que el correpresor del receptor nuclear libere al heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR (factor retinoide X). Este evento permite la unión de diferentes coactivadores como: SCR-1 (coactivador de receptor nuclear 1) y CBP/p300 (proteína coactivadora transcripcional p300). Finalmente, la unión del heterodímero PPAR-RXR con secuencias específicas en el ADN, llamadas elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE), permite la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. La unión de las TZD al heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR genera un cambio conformacional, lo cual permite su liberación hacia el núcleo de la célula, donde la unión de PPAR $\gamma$ -RXR a PPRE provoca la transcripción de genes diana, mejorando la sensibilidad a la insulina a través de un aumento en la captación y almacenamiento de glucosa (Kelly, 2001; Seimandi et al., 2005; Singh et al., 2016). En músculo esquelético las TZD incrementan la expresión de GLUT1 y GLUT4, mejorando la captación y almacenamiento de glucosa. En el caso del hígado, disminuyen la producción de glucosa hepática (Davidson et al., 2017; Lee et al., 2017). Las TZD pueden presentar insuficiencia cardíaca y pérdida ósea en pacientes con DT2. El tratamiento a largo plazo puede estar asociado con cáncer de vejiga. La hipoglucemia es uno de los efectos adversos menos comunes cuando se administran como monoterapia (Apovian, 2011; Marín-Peñalver et al., 2016).

### **1.10.7. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)**

La filtración glomerular representa un mecanismo muy importante para la obtención de energía. Aproximadamente, los riñones filtran alrededor de 160-180 g de glucosa al día en condiciones normales. SGLT2 es un transportador presente en la membrana apical del túbulo contorneado proximal (segmento 1 y 2) del riñón, su función principal es movilizar la glucosa en contra del gradiente de concentración al interior de las células del túbulo proximal. La presencia y actividad de GLUT2 en la membrana basolateral del túbulo es fundamental para el transporte de glucosa desde el espacio intracelular hacia la sangre. El 90% de la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal depende de SGLT2, mientras que el 10% de la glucosa es reabsorbida por SGLT1 presente en el túbulo contorneado proximal (segmento 3). En pacientes con diabetes se ha observado que la carga de glucosa en sangre excede el umbral de excreción en los túbulos renales a 220 mg/dL, mientras que en un paciente sano el umbral es menor a 180 mg/dL. Este efecto puede atribuirse a una mayor absorción de glucosa en la membrana apical del túbulo proximal producto del incremento en la expresión y densidad de SGLT2 en estas células. Los inhibidores de SGLT2 bloquean la reabsorción de glucosa mediada por SGLT2 en el túbulo proximal y mejoran la excreción de glucosa en la orina. Algunos de los fármacos más comunes son: dapagliflozina, canagliflozina y empagliflozina. El tratamiento con inhibidores de SGLT2 genera una excreción de glucosa en orina entre 60 y 100 g en 24 h. Debido a su mecanismo de acción existe un bajo riesgo de hipoglucemia, sin embargo, en pacientes con insuficiencia renal la eficacia de los inhibidores de SGLT2 es menor. Dentro de los efectos adversos se encuentran: infecciones del tracto urogenital, antropometría y diuresis osmótica (Marín-Peñalver et al., 2016; Padhi et al., 2020; Pancholia, 2018).

### **1.10.8. Insulinoterapia**

En la actualidad, la mayor parte de los pacientes con DT2 necesitan un tratamiento con insulina. Esta hormona ayuda a mantener el control glucémico y metabólico en el organismo, previniendo complicaciones micro y macrovasculares en pacientes con DT2. El tratamiento con insulina sigue siendo muy efectivo y puede recetarse



como monoterapia o con otros medicamentos antidiabéticos como terapia combinada (Apovian, 2011). Algunos análogos de insulina (glulisina, lispro, aspart, glargina, detemir y U-300) han demostrado mayor eficacia en el tratamiento de la diabetes que la insulina regular. Glargina y detemir son insulinas de acción prolongada, mientras que glulisina, lispro y aspart son insulinas de acción rápida. Esto permite definir la dosificación del medicamento de acuerdo con las necesidades y problemas metabólicos de los pacientes con diabetes (Marín-Peñalver et al., 2016). Las personas que presentan altos niveles de glucosa en sangre por la mañana (mayor a 120 mg/dL), pueden optar por un tratamiento nocturno de insulina con acción prolongada, con el objetivo de disminuir la producción de glucosa hepática durante la noche. El control de la glucemia durante la noche es importante, ya que en la fase inicial del tratamiento puede presentarse hipoglucemia nocturna, aunque no es muy común cuando se utilizan análogos de insulina de acción prolongada, el ajuste de la dosis suele ser un factor importante para una terapia óptima. Por otro lado, si el problema principal es el incremento de las concentraciones de glucosa en sangre después de las comidas, la terapia con insulina de acción rápida puede ser una alternativa razonable para el tratamiento del paciente solo a la hora de la comida (Apovian, 2011; Marín-Peñalver et al., 2016; Pfeiffer and Klein, 2014). Algunos ensayos clínicos han demostrado que la monoterapia con insulina puede generar ganancia de peso, mientras que el tratamiento combinado puede generar molestias gastrointestinales, insuficiencia cardíaca y una incidencia elevada de hipoglucemia. Sin embargo, el tratamiento con insulina y algunos agentes orales como metformina se ha asociado con un mejor control glucémico, disminuyendo episodios de hipoglucemia y la ganancia de peso. Por lo tanto, la terapia con metformina puede considerarse una opción adecuada cuando los pacientes reciben tratamiento con insulina (Abdi et al., 2018; Swinnen et al., 2009).

### **1.11. Las plantas medicinales como alternativa de tratamiento en DT2**

A pesar de la extensa terapia farmacológica usada para el control de la DT2, aún está lejos de ser efectiva, generando efectos secundarios no deseados. El uso de

plantas para el tratamiento de enfermedades es una práctica que ha ido en aumento en los últimos tiempos. La distribución de plantas medicinales está relacionada con regiones habitadas por comunidades indígenas. Sin embargo, existen pocos estudios que determinen sus efectos beneficiosos para usos clínicos en México (Laguna-Hernández et al., 2017). Actualmente un número creciente de estudios se han centrado en extractos de hierbas o productos naturales, muchos de los cuales han descubierto productos con potentes efectos contra algunas enfermedades, incluida la DT2 (Hernandez-Galicia et al., 2002; Palma-Tenango et al., 2017). Por lo tanto, las plantas medicinales representan una fuente biológica muy importante de sustancias activas que pueden ofrecer una alternativa de tratamiento para esta enfermedad.

Dentro de las plantas que se utilizan para el tratamiento de la diabetes, se encuentra *Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*). *T. usneoides* es una planta conocida popularmente como “Musgo español” y “Heno” (Figura 2). Esta planta pertenece a la familia Bromeliaceae, está ampliamente distribuida en México y el sur de E.U.A (Luissiana) (Garth, 1964; Hornung-Leoni, 2011). Es usada en la medicina tradicional como coadyuvante para el tratamiento de la diabetes.



**Figura 2.** *Tillandsia usneoides* Linneo.

## **2. ANTECEDENTES**

Se han realizado diferentes estudios para demostrar la actividad de *T. usneoides* sobre la glucemia en modelos *in vivo* e *in vitro*. Se ha informado que el extracto

acuoso a una concentración de 250 mg/kg disminuye la glucosa en sangre en ratas sanas (Sprague-Dawley) después de 4 y 8 h posteriores a su administración (vía intragástrica) (Keller et al., 1981). Este efecto también se observó dentro de las 24 h con la administración del extracto acuoso y etanólico de *T. usneoides* (500 mg/kg) en ratas con diabetes inducida con aloxana. El tratamiento con el extracto acuoso indujo un estado de hipoglucemia durante los 4 y 7 días, bloqueando el desarrollo de diabetes generado por aloxana (Estrella-Parra et al., 2019; Witherup et al., 1995).

La naturaleza de sus componentes químicos se ha determinado por análisis fitoquímicos, mostrando que el extracto acuoso contiene componentes de naturaleza orgánica, como: carbohidratos, ácido cítrico, ácido succínico, triterpenos, 3,6,3',5'-tetrametoxi-5,7,4'-trihidroxi-7-O-glucósido y el ácido 3-hidroxi-3-metilglutarico (HMG). La administración de HMG (100 y 250 mg/kg) disminuyó significativamente los niveles de glucosa en ratones sanos, proponiendo al HMG como la molécula responsable del efecto hipoglucémico de *T. usneoides* (Witherup et al., 1995). Sin embargo, se ha determinado que la acumulación de HMG en ratas induce peroxidación de lípidos, disfunción mitocondrial y estrés oxidante, así como efectos adversos renales en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina, generando complicaciones severas en el organismo. Estos datos apoyan la idea de que podrían existir otros componentes en *T. usneoides* responsables del efecto sobre la glucemia (da Rosa et al., 2020; Deana et al., 1982).

Por otro lado, se observó un efecto hipoglucémico en ratones CD-1 y un incremento en la expresión del gen de insulina en células RINm5F incubadas con alta glucosa (30 mM), debido al extracto acuoso de *T. usneoides*. Sin embargo, la administración del extracto acuoso no incrementó la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, ni la secreción de insulina en células RINm5F (Espejel-Nava, 2014). Estos datos permiten suponer que el mecanismo de acción de *T. usneoides* podría involucrar la captación de glucosa a nivel periférico. Otra investigación mostró que la administración del extracto clorofórmico de *T. usneoides* vía intraperitoneal disminuyó el pico hiperglucémico durante los 30 minutos (min) en ratones sanos CD-1 con 12 h de ayuno (Giacoman-Martínez, 2015).

Adicionalmente, el tratamiento con el extracto acuoso de *T. usneoides* en cultivo primario de hepatocitos de ratón incrementó la expresión de GLUT2 y disminuyó la activación de GSK-3 $\beta$ . Estos datos sugieren que el mecanismo de acción de *T. usneoides* podría involucrar la participación de tejidos sensibles a la insulina como la células hepáticas, modulando la homeostasis de la glucosa (Miranda-Núñez, 2016). En las últimas décadas, el aislamiento y caracterización de moléculas de origen vegetal ha contribuido al estudio de nuevos agentes con posible actividad sobre el metabolismo de glucosa. De acuerdo con los estudios previos, *T. usneoides* es una planta con potencial antidiabético. Aunque se han caracterizado algunos componentes químicos, aún no se ha definido su mecanismo de acción y las posibles moléculas responsables de dicho efecto. En este sentido, es probable que *T. usneoides* contenga moléculas que puedan modular el metabolismo de glucosa a través de la activación de la vía de la insulina y la participación de los transportadores de glucosa en tejidos sensibles a la insulina.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La DM es un problema de salud mundial. En todo el mundo la prevalencia de DM es de 463 millones de personas y se estima que para el año 2045 sean 700.2 millones de personas con DM. En el año 2019, la prevalencia en México fue del 9.9% (12.8 millones de personas) con una tendencia similar para el año 2045. La atención médica para atender las complicaciones de la DT2 genera también un elevado costo para el sistema de salud.

Existen muchos fármacos antidiabéticos disponibles, pero el incremento de la incidencia de DT2 en países en desarrollo ha generado la necesidad de buscar nuevos agentes, más eficaces, seguros y menos costosos, que puedan contribuir al desarrollo de nuevas terapias para la DT2. Se ha demostrado que el uso de plantas medicinales puede tener implicaciones clínicas positivas en la DT2. Sin embargo, es necesario su investigación científica rigurosa para validar su efectividad clínica y los mecanismos de acción hipoglucémicos y antihiperoglucémicos. La evidencia científica podría apoyar, así, el uso de estos recursos en la población, como alternativa viable de tratamiento para la DT2. Por lo tanto, las plantas medicinales

representan una fuente biológica importante de sustancias activas que pueden ofrecer una alternativa de tratamiento, regulando el desequilibrio metabólico generado por la DT2.

*T. usneoides* tiene efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico en modelos murino. El HMG se propuso como el principio activo de *T. usneoides*. Sin embargo, algunos estudios revelan efectos adversos generados por la administración de HMG. Por lo tanto, es probable que otros componentes puedan participar en la regulación de la glucemia, involucrando vías importantes en el almacenamiento y transporte de glucosa.

Durante la DT2 el desbalance energético puede ocurrir en diferentes tejidos, incluyendo el tejido muscular y hepático. Ambos tejidos participan en la homeostasis de la glucosa a través de la activación de transportadores de glucosa, como GLUT2 y GLUT4. Por lo tanto, la regulación de GLUT2 y GLUT4 podría considerarse un objetivo terapéutico para corregir el desbalance metabólico generado por la DT2. Se ha demostrado que *T. usneoides* incrementa la expresión y actividad de algunos reguladores metabólicos importantes en la homeostasis de la glucosa en células RINm5F y hepatocitos primarios. Aunque se ha propuesto que el efecto de *T. usneoides* sobre la glucemia puede deberse a la actividad metabólica de tejidos periféricos, aun no se ha definido su mecanismo de acción.

Con todo lo anterior, es claro que *T. usneoides* tiene propiedades antidiabéticas. Sin embargo, hasta ahora todos los estudios con esta especie se han enfocado a la caracterización de compuestos del extracto acuoso, dejando a un lado los compuestos menos polares. En el presente trabajo se propone un fraccionamiento guiado por bioensayo, el cual podría aportar conocimiento acerca de la acción hipoglucemiante de *T. usneoides*. La obtención e identificación de compuestos vegetales de esta especie podría ofrecer nuevos agentes terapéuticos que promuevan el transporte y almacenamiento de glucosa.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las fracciones y compuestos aislados de *T. usneoides* tendrán efecto sobre los niveles de glucosa sanguínea debido a la acción de los transportadores GLUT2 y GLUT4?

#### **5. HIPÓTESIS**

Si *T. usneoides* tiene compuestos con efecto sobre la glucemia en modelos *in vivo*, entonces regularán la movilización de GLUT2 y GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Obtener un compuesto de *T. usneoides* con acción sobre la glucemia en ratones debido a la regulación de GLUT2 y GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.

#### **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Validar el efecto sobre la glucemia de las fracciones del extracto acuoso de *T. usneoides* en ratones sanos.
- Realizar un fraccionamiento químico biodirigido con la fracción activa del extracto acuoso de *T. usneoides* usando pruebas de tolerancia a la glucosa en ratones sanos.
- Evaluar el efecto de la fracción activa sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* e *in vitro*.
- Caracterizar químicamente la fracción activa mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar si las fracciones o compuestos activos de *T. usneoides* regulan los transportadores de glucosa (GLUT2 y GLUT4) en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Diagrama de flujo del diseño experimental

La extracción, identificación y evaluación de los componente activos de *T. usneoides* se resumen en la Figura 3. Los detalles de cada etapa experimental se describen a continuación.

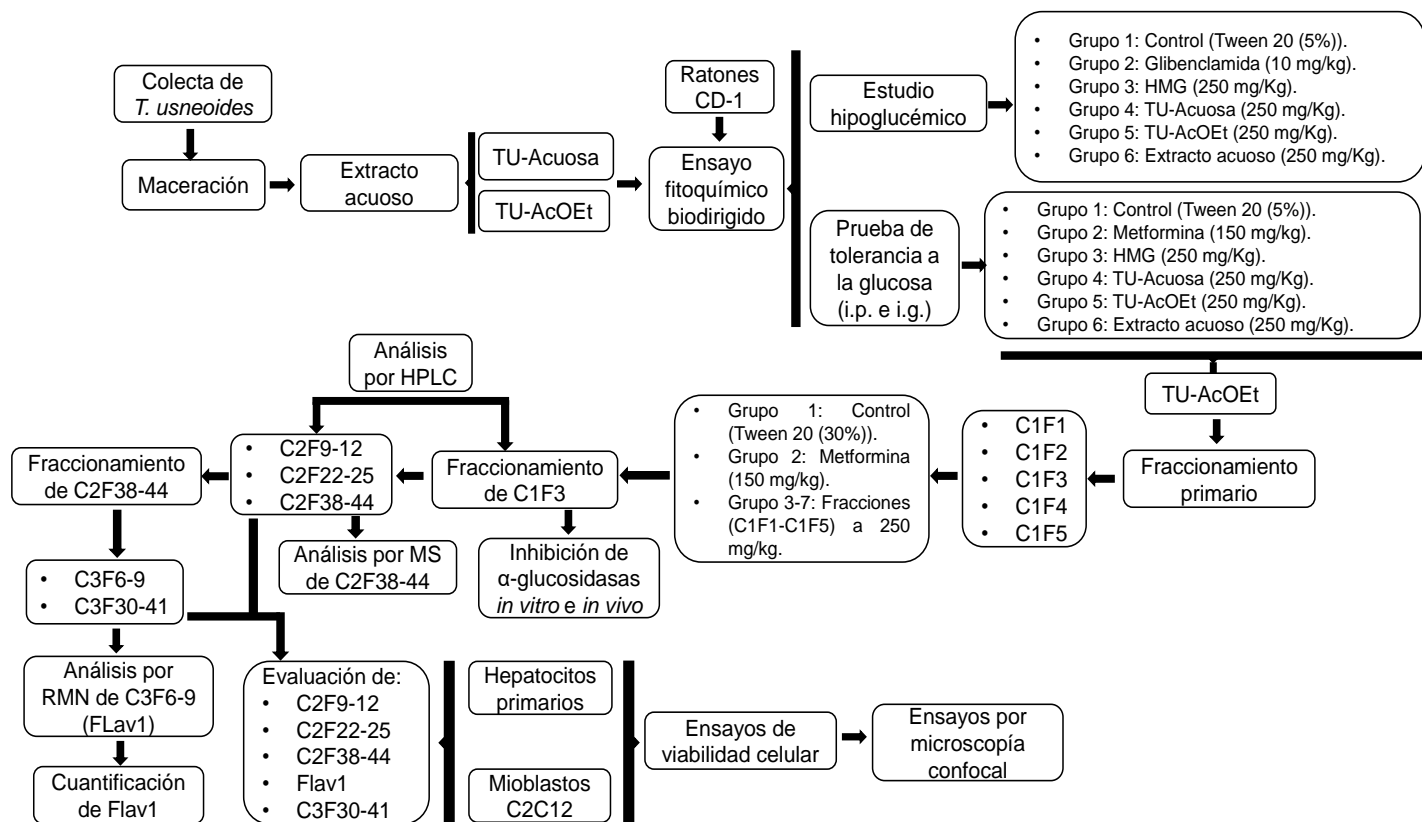


Figura 3. Diseño experimental.

### 8.2. Análisis fitoquímico

#### 8.2.1. Material vegetal de *T. usneoides*

*T. usneoides* se recolectó en marzo de 2017 en el municipio de Amecameca en el Estado de México. A continuación, se muestran las coordenadas donde se realizó la colecta: N 19°07'0.700'', O 98°46'0.476'', a una altitud de 2450 metros sobre el nivel del mar. El material vegetal fue identificado taxonómicamente por el Biólogo

Santiago Xolalpa Molina del Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (Herbario-IMSS-M) y la Dra. María Flores Cruz del Departamento el Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco en la Ciudad de México. El número de registro del ejemplar fue 16409.

### 8.2.2. Obtención del extracto acuoso y las fracciones de *T. usneoides* por bipartición

La planta completa (21 kg) se limpió y molió en un molino manual. El producto resultante se colocó en un recipiente y durante 3 días se deshidrató a temperatura ambiente y aireación constante. El material seco se maceró en 20 L de agua Milli-Q durante 24 h y el material resultante (extracto acuoso) se filtró en un embudo con papel filtro en matraz Kitazato. Posteriormente, en un embudo de separación se agregó el extracto acuoso y se sometió a un proceso de bipartición con acetato de etilo (AcOEt) (Merck, MA, EE. UU.). La mezcla se homogenizó varias veces y las fracciones resultantes, TU-Acuosa (fracción acuosa) y TU-AcOEt (fracción de acetato de etilo) se colectaron en un matraz por separado, donde se concentraron en un evaporador rotatorio (Buchi®); se almacenaron a 4°C para su evaluación farmacológica y posterior fraccionamiento químico. El rendimiento del extracto acuoso y las fracciones (TU-AcOEt y TU-Acuosa) se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Rendimiento (%) del extracto acuoso de *T. usneoides* y sus fracciones (TU-Acuosa y TU-AcOEt).

Planta	Extracción	Rendimiento (%)
<i>T. usneoides</i>	Extracto acuoso	2.6
	TU-Acuosa	73.1
	TU-AcOEt	1.2

### 8.2.3. Fraccionamiento químico de la fracción TU-AcOEt

La TU-AcOEt (7 g) fue sometida a un fraccionamiento primario mediante cromatográfica en columna abierta (500 x 50 mm) usando gel de sílice en fase



normal (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm; Merck) en una proporción de 10 g de sílice/g de TU-AcOEt. Se usó un sistema de fase móvil con gradiente n-hexano (Hx)/AcOEt (Merck), comenzando con Hx (100%) y diluyendo gradualmente con AcOEt (5%) hasta el 100% (el volumen de cada muestra fue de 100 ml). Posteriormente, los componentes de cada fracción se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) de fase reversa (sílica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S; Merck), los cuales se agruparon por similitud química y se concentraron en un evaporador rotatorio (Buchi®). Para la naturaleza química de las fracciones se utilizó el Reactivo de Productos Naturales-Polietilenglicol (revelador para flavonoides), el cual consiste en una solución de polietilenglicol (5 ml) en 35 ml de etanol más 200 mg de difenilboriloxietilamina. Finalmente, se obtuvieron 5 fracciones secundarias (compuestos mayoritarios), que se nombraron: C1F1, C2F2, C1F3, C1F4 y C1F5. En la siguiente tabla se observan los rendimientos de cada una de las fracciones obtenidas de TU-AcOEt (Tabla 2).

**Tabla 2.** Rendimiento (%) de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario de TU-AcOEt.

<b>Extracción</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>C1F1</b>	<b>3.5</b>
<b>C1F2</b>	<b>9.5</b>
<b>C1F3</b>	<b>7.3</b>
<b>C1F4</b>	<b>8.3</b>
<b>C1F5</b>	<b>5.7</b>

#### **8.2.4. Caracterización y fraccionamiento químico de la fracción C1F3 por HPLC, MS y RMN**

La fracción bioactiva (C1F3) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta (400 x 25 mm) de fase reversa, utilizando sílica gel con un tamaño de partícula de 40-63 µm (RP-18, Merck). El gradiente de elución comenzó con H<sub>2</sub>O (100%) y se diluyó gradualmente con acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) (10%).

Se obtuvieron 77 fracciones, las cuales fueron agrupadas en tres fracciones principales de acuerdo con su perfil químico por CCF en fase reversa (RP-18, F<sub>254</sub>S), nombradas como: C2F9-12 (rendimiento 31.1%), C2F22-25 (rendimiento 39.7%) y C2F38-44 (rendimiento 42.8%). Cada fracción se analizó por HPLC, junto con C1F3. El análisis se realizó mediante un módulo de separación SUPELCO (Waters 2690) y un detector UV (Waters 2996). La muestra se inyectó (10 µL) en una columna C18 (25 cm x 4.6 mm; 5 µm) bajo un sistema en gradiente agua-ácido trifluoroacético (TFA) 0.5%/CH<sub>3</sub>CN (Merck), diluyendo gradualmente con CH<sub>3</sub>CN, tal y como se muestra en la Tabla 3. El flujo de fase móvil fue de 1 ml/min por 30 min.

La composición química de la fracción más abundante de C1F3 (C2F38-44) se analizó por UPLC, utilizando un sistema Acquity UPLC (Waters) equipado con una bomba cuaternaria y un horno de columna con automuestreador. Se inyectaron 5 µl de muestra diluida en MeOH/ácido fórmico (0.01%) y la separación se llevó a cabo en una columna Acquity UPLC BEH C18 de 1.7 µm (2.1 x 50 mm), mediante un sistema de elusión en gradiente agua-TFA (0.05%)/CH<sub>3</sub>CN. El caudal de la muestra fue de 0.3 ml/min y la columna se mantuvo a una temperatura de 40°C. La absorción se midió en un rango de longitud de onda de 190-600 nm. El análisis por espectrometría de masas se realizó mediante un sistema de tiple cuadrupolo Xevo TQD (Waters), equipado con una fuente combinada de ionización por electroaspersión (ESI) (Zspray™) calentada a 150°C. La temperatura de desolvatación se ajustó a 500°C y el flujo de nitrógeno fue de 700 l/h, como gas de desolvatación. Se utilizó argón como gas de colisión a un caudal constante de 0.1 ml/min.

Para determinar los componentes químicos de la fracción C2F38-44, su purificación se realizó por cromatografía en columna abierta (400 x 20 mm) de fase normal, previamente empaquetada con sílica gel con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm (Merck). Como fase móvil se utilizó Hx/AcOEt en una proporción 1:1. Se obtuvieron 81 fracciones, donde su composición química se analizó por CCF en placas de sílice gel 60 F<sub>254</sub> desarrolladas con un sistema Hx/AcOEt (1:1). Para

determinar la naturaleza química de las fracciones se utilizó un reactivo para flavonoides. De acuerdo con las características químicas y abundancia en C2F38-44, las fracciones fueron seleccionadas y agrupadas en dos fracciones (C3F6-9 y C3F30-41). Finalmente, la fracción C3F6-9 con rendimiento del 11.3% se sometió a un análisis por RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) a través de un equipo (Agilent DD2) que opera a una frecuencia de 600 MHz, dando como resultado 5, 7, 4'-trihidroxi-3, 6, 3', 5'-tetrametoxiflavona (Flav1), que se cuantificó en la fracción TU-AcOEt por HPLC.

Para la cuantificación se utilizó un módulo de separación SUPELCO (Waters 2690) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2696 UV. Se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  de la TU-AcOEt (2 mg/ml) y cinco concentraciones de Flav1 (0.0125, 0.0250, 0.050, 0.100 y 0.200 mg/ml) en una columna C18 (25 cm x 4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) con un sistema en gradiente agua-TFA al 0.5/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (Merck), con un caudal de 1 ml/min durante 30 min (Tabla 3). Se utilizó una longitud de onda de 360 nm para todas las concentraciones de Flav1 y el área bajo la curva (ABC) de cada pico se analizó por triplicado. Se realizó una curva de calibración y el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 0.9985. El contenido de Flav1 en la TU-AcOEt fue de 57.31 mg/g.

**Tabla 3.** Condiciones cromatográficas para C1F3, C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44 por HPLC y cuantificación de la flavona en la fracción TU-AcOEt. Volumen de inyección de la muestra 10  $\mu\text{L}$ .

Tiempo (min)	Flujo (mL)	H <sub>2</sub> O HPLC (95%)	CH <sub>3</sub> CN (%)
0	0.90	100	0
1	0.90	100	0
2	0.90	95	5
3	0.90	95	5
4	0.90	70	30
20	0.90	70	30
21	0.90	50	50
22	0.90	50	50

23	0.90	50	50
24	0.90	20	80
25	0.90	20	80
26	0.90	0	100
27	0.90	0	100
28	0.90	100	0
30	0.90	100	0

### 8.3. Estudios *in vivo*

#### 8.3.1. Animales de experimentación

Para determinar el efecto de las fracciones de *T. usneoides* sobre la glucemia, se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad, con un peso de 30-35 g. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y se mantuvieron con una dieta básica para roedores a temperatura regulada (25°C), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los estudios experimentales se realizaron siguiendo los estándares nacionales e internacionales de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1991, junto con la aprobación por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana el 31 de enero de 2019 (DCBS.1857.2019).

#### 8.3.2. Estudio hipoglucémico

Para evaluar el efecto hipoglucémico, se formaron 6 grupos de 5 animales cada uno. Después de 12 h de ayuno se les midió la glucemia al tiempo inicial (T = 0). La muestra de sangre se obtuvo por punción de la vena caudal y para la medición de la glucosa se utilizaron tiras reactivas Accu-Chek. Posteriormente, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de la siguiente manera: al grupo 1 se le administró una solución de Tween 20 al 5%; al grupo 2 se le administró glibenclamida (10 mg/kg) como control positivo; el grupo 3 se trató con HMG a 250 mg/kg (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.); los grupos 4, 5 y 6 recibieron 250 mg/kg de la

TU-AcOEt, TU-Acuoso y el extracto acuoso, respectivamente. Finalmente, la glucemia se determinó a los 120, 240 y 360 min.

### **8.3.3. Efecto del extracto acuoso y las fracciones de *T. usneoides* en la prueba de tolerancia a la glucosa**

Para determinar el efecto antihiper glucémico de las fracciones obtenidas de *T. usneoides*, los ratones se agruparon al azar en 6 grupos de 5 animales cada uno y se sometieron a un periodo de ayuno de 12 h. Se les midió la glucosa en sangre (T = 0) y a continuación, el grupo control recibió una solución de Tween 20 (5%); el grupo 2 recibió metformina como control positivo (150 mg/kg); mientras que los grupos 3, 4 y 5 se les administró 250 mg/kg de la TU-AcOEt, TU-acuoso y el extracto acuoso, respectivamente. Todos los tratamientos se administraron por vía intragástrica (i.g.).

Adicionalmente, se utilizaron 6 grupos de 5 animales con 8 semanas de edad, la medición de la glucosa en sangre se realizó después de las 12 h de ayuno (T = 0) y se administraron los mismos tratamientos por vía i.p. En ambos estudios, los animales recibieron una solución de dextrosa (2 g/kg) por vía i.g. 5 minutos después de los tratamientos. Finalmente, se obtuvo la sangre por punción de la vena caudal y se cuantificó la glucemia a los 30, 60, 90 y 120 min para ambos estudios, utilizando el método de deshidrogenasa (Accu-Chek).

### **8.3.4. Efecto de las fracciones C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 en la prueba de tolerancia a la glucosa**

Para determinar el efecto antihiper glucémico de las fracciones (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5) obtenidas de TU-AcOEt, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa adicional. Se utilizaron 7 grupos de 4 animales cada uno con 8 semanas de edad. La glucemia inicial (T = 0) se midió después de que los ratones fueran sometidos a 12 h de ayuno. Los tratamientos se administraron por vía i.g. de la siguiente manera: el grupo control recibió una solución de Tween 20 al 30%; al grupo 2 se le administraron 150 mg/kg de metformina (control positivo); los grupos 3, 4, 5, 6 y 7 se les administró 250 mg/kg de las fracciones obtenidas de TU-AcOEt

(C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5, respectivamente). Se utilizó como vehículo una concentración de Tween 20 al 30% para todos los tratamientos. Posteriormente, se administró una solución de dextrosa por vía i.g. (2 g/kg) 5 minutos después del tratamiento con las fracciones. Finalmente, se obtuvo sangre por punción de la vena caudal y se cuantificó la glucemia a los 30, 60, 90 y 120 min, utilizando el método de deshidrogenasa (Accu-Chek).

### **8.3.5. Efecto de la fracción C1F3 en la prueba de tolerancia al almidón**

Los ratones se dividieron en 3 grupos de 4 animales cada uno. Después de un periodo de ayuno de 12 h se midió la glucemia (T = 0). Posteriormente, se administraron los siguientes tratamientos por vía i.g. de la siguiente manera:

- Grupo control: Se le administró una solución de Tween 20 (5%).
- Control positivo: Se le administró acarbosa (5 mg/kg).
- Grupo de tratamiento: Se le administró la fracción C1F3 a 250 mg/kg.

En todos los tratamientos se utilizó como vehículo una solución de Tween 20 al 5%. Finalmente, a los animales se les administró una solución de almidón (2 g/kg) por vía oral 5 minutos después de los tratamientos y se determinó la glucemia a los 30 min por el método de deshidrogenasa (Accu-Chek).

### **8.3.6. Efecto de la fracción C1F3 sobre la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vitro***

Para evaluar el efecto de las fracciones TU-AcOEt y C1F3 sobre la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*, se llevó a cabo el método reportado por Ramírez *et al*, (2012). Para la obtención de las enzimas ( $\alpha$ -glucosidasas) se utilizaron ratas Wistar hembras adultas con un peso de 200-250 g. Los animales se sacrificaron y la mucosa intestinal se obtuvo por raspado en frío. Después, la enzima se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

Las mezclas de reacción se prepararon por cuadruplicado para cada tratamiento y su volumen final fue de 250  $\mu$ L. Cada reacción estaba constituida por una solución amortiguadora de fosfatos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2 M a pH 7) más una solución de almidón de

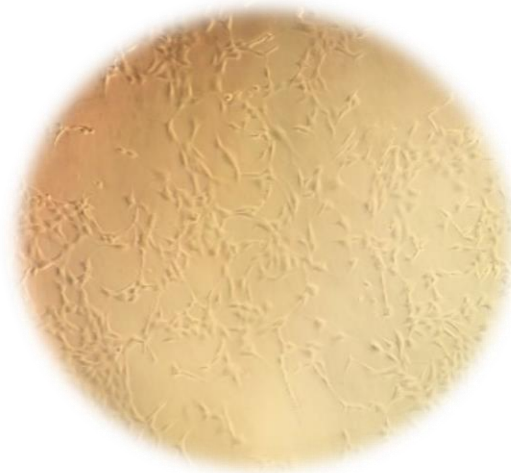
maíz (25 mg/ml) (Sigma-Aldrich, MO, USA) en una proporción 1:1, 12.5 µL de las fracciones TU-AcOEt y C1F3 a una concentración de 1 mg/ml y 10 µL de la enzima. Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 min y se detuvo con 2 µL de una solución de acarbose (0.04 mg/ml), la cual se preparó a partir de un medicamento genérico Sincrosa® (Alpharma). La purificación de este medicamento se realizó mezclando una tableta (100 mg) previamente triturada con 65 ml de etanol. La mezcla se homogenizó durante 5 min y se centrifugó hasta obtener el sobrenadante, el cual se concentró mediante destilación a presión reducida. Para comparar la actividad inhibitoria de las fracciones, se utilizó como control positivo un extracto hidroalcohólico de hojas de *Camellia sinensis*.

Finalmente, la actividad enzimática se determinó en una placa de 96 pozos con reactivo clínico de glucosa oxidasa (250 µL) (SPINREACT) más 2.5 µL de la mezcla de reacción (Ramírez et al., 2012). La absorbancia se midió utilizando un lector de placas a 505 nm y la actividad inhibitoria se reportó como porcentaje de inhibición, considerando a la reacción sin inhibidor el 100% de actividad enzimática.

#### **8.4. Estudios *in vitro***

##### **8.4.1. Cultivo de mioblastos C2C12**

Las células de mioblastos de ratón (C2C12) se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 5.5 mM de glucosa bajo estas condiciones: Atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, hasta llegar a confluencia (Figura 3). El medio fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Penrose, Auckland, NZ), piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y gentamicina 0.01 mg/ml. Posteriormente, se utilizó una solución de tripsina en PBS (0.025%) para resembrar las células en placas de 96 pocillos (5 x 10<sup>3</sup>), una vez que las células llegaron a confluencia se utilizaron para los diferentes tratamientos.



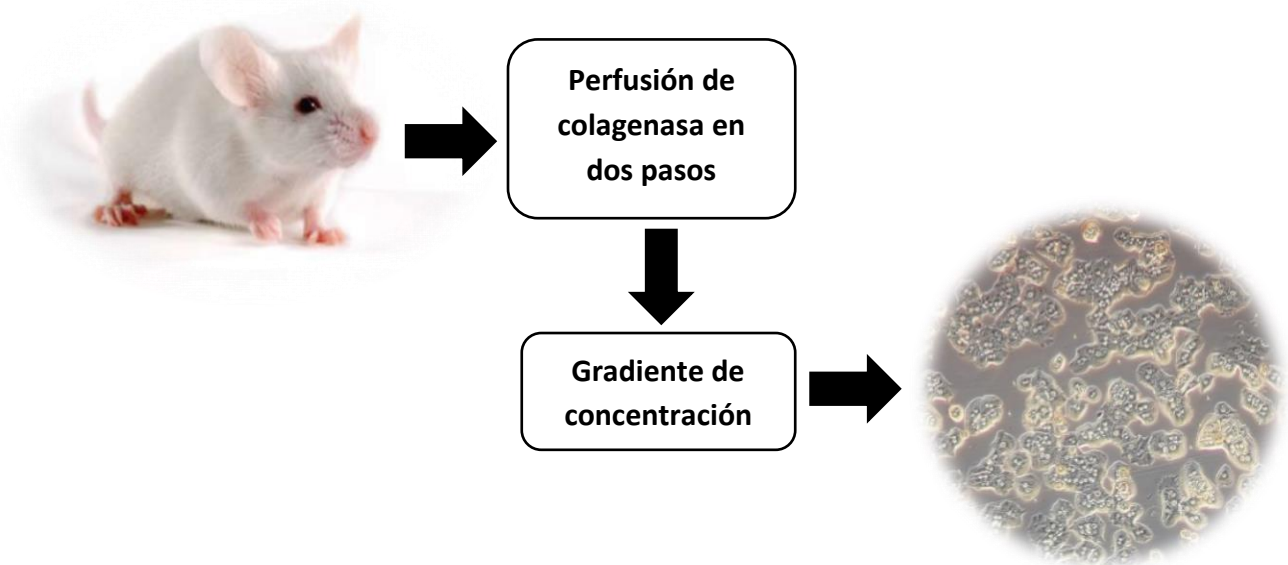
**Figura 4.** Cultivo de mioblastos C2C12 (10X) en medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

#### **8.4.2. Aislamiento y cultivo primario de células hepáticas de ratón**

Se utilizaron células hepáticas aisladas mediante la técnica de perfusión de colagenasa en dos pasos (Clavijo-Cornejo et al., 2013). Los ratones CD-1 machos de 8-12 semanas recibieron vía i.p. 0.8 ml de tribromoetanol (Avertine, 0.6 mg/g, Sigma-Aldrich, MO, USA). Luego, se realizó una incisión en el peritoneo y el tórax para exponer el hígado. Posteriormente, las venas cava inferior y superior se anudaron con hilo de sutura, evitando que el hilo cortara las venas; se canalizó la aurícula derecha del corazón utilizando un catéter acoplado a un equipo de perfusión. El exceso de sangre se drenó cortando la vena cava inferior y la vena porta a través de una solución salina balanceada de Hanks (HBSS): KCl (5.36 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.44 mM),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.30 mM), NaCl (0.136 M),  $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.33 mM) y D-(+)-Glucosa (0.55 mM) con ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES) a 10 mM. Después, se bloqueó la vena cava inferior y el hígado se perfundió a través de la vena porta con 20 ml de HBSS durante 20 min a una temperatura de 37°C. Luego, se administraron 50 ml de colagenasa tipo I (0.05%) (Sigma-Aldrich, MO, USA) en medio Williams 'E (Sigma Aldrich, MO, USA) sin suero con HEPES (10 mM) y  $\text{NaHCO}_3$  (25 mM). Se extrajo el hígado y se colocó en una placa de Petri de 10 cm con 25 ml de medio de adhesión (medio Williams 'E suplementado con 10% de FBS y 1% de albúmina de suero bovino (BSA)). El hígado



se disgregó y las células se pasaron a través de un filtro con poros de 100  $\mu\text{m}$ . El medio celular se centrifugó a 71 x g durante 7 min a 4°C. Las células se suspendieron en 25 ml de medio de adhesión y 25 ml de solución de percoll (Uppsala, Suecia) con solución de Hanks 10X (Sigma-Aldrich, MO, USA) hasta generar una suspensión homogénea. Finalmente, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 209 x g a 4°C. Los hepatocitos viables se suspendieron en 25 ml de medio de adhesión, y el porcentaje de viabilidad se determinó con azul de tripano (dilución 1:1). Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se sembraron en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^3$ ) (Figura 4). Después de 4 h, el medio fue reemplazado con medio nuevo de adhesión y al día siguiente (24 h) las células se utilizaron para los diferentes tratamientos.



**Figura 5.** Aislamiento de hepatocitos primarios de ratón por el método de perfusión de colagenasa.

### **8.5. Prueba de funcionalidad celular en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios**

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de rojo neutro. Este agente es capturado por las células (especialmente por los lisosomas) y, a medida que la célula pierde viabilidad, el colorante permanece en el medio de cultivo. Solo las células viables pueden retener el colorante en el interior. Las células C2C12 se

sembraron en placas de 96 pozos ( $5 \times 10^3$  células/pozo) con medio DMEM completo (5.5 mM de glucosa). Una vez que las células alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia, se retiró el medio y se adicionaron diferentes concentraciones (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ) de las fracciones provenientes de C1F3 (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y C3F30-41) en medio DMEM sin suero con baja y alta glucosa (25 mM). En el caso del tratamiento con Flav1, las células C2C12 se trataron a concentraciones de 1.3, 2.6, 6.4, 12.8, 25.6, 63.9, 127.9, 255.8 y 1278.8  $\mu\text{M}$  (valores equivalentes de 0.5-500  $\mu\text{g/ml}$ ). Por otro lado, los hepatocitos fueron tratados con las mismas concentraciones de las fracciones y Flav1 en medio Williams 'E sin suero con baja y alta glucosa (25 mM). Ambos tratamientos duraron 24 h y se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.01 % como control y vehículo para las fracciones y Flav1. Posteriormente, las células se lavaron con una solución salina tamponada de fosfato (PBS, pH 7.4) y se incubaron durante 3 h con una solución de rojo neutro (0.05 mg/ml) en medio DMEM y medio Williams 'E sin suero bajo estas condiciones, 37°C y 95% de humedad. El medio se retiró y las células se lavaron con una solución de  $\text{CaCl}_2$ /formaldehído (1%/0.5%). Finalmente, se añadió una solución de ácido acético/etanol (1%/50%) durante 10 min. El cambio en la absorbancia se midió a 540 nm en un lector de ELISA y la viabilidad se determinó por el porcentaje de células vivas/células muertas en comparación con el grupo control (Borenfreund and Puerner, 1985).

#### **8.6. Condiciones experimentales para los mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios**

Se cultivaron mioblastos C2C12 en placas de 8 pocillos (Lab-Tek II Chambers Slide System, Thermo-Fisher, MA, USA) con medio DMEM completo, a los cuales se les reemplazó el medio cada 2 días hasta que llegaron a confluencia. En el caso de los hepatocitos primarios se sembraron durante 24 h con medio de adhesión y se utilizó una solución de colágena (0.02%) (Sigma-Aldrich, MO, USA) para su adherencia en las placas. Las concentraciones óptimas de las fracciones (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y la Flav1 (25.6  $\mu\text{M}$ ) para los ensayos de inmunofluorescencia se determinaron mediante el ensayo de viabilidad por rojo neutro. Ambas células recibieron un pretratamiento de medio

DMEM y Williams 'E sin suero una hora antes del tratamiento con las fracciones y Flav1. Las células C2C12 y los hepatocitos primarios recibieron medio sin suero (DMEM y Williams 'E, respectivamente) con 0.01% de DMSO (grupo control). Se incubaron las células C2C12 con las fracciones y Flav1 (10 µg/ml y 25.6 µM, respectivamente) durante 15 y 30 min con medio DMEM sin suero (5.5 mM de glucosa). En el caso de los hepatocitos primarios se usó medio Williams 'E sin suero (11 mM de glucosa). Como control positivo se utilizó insulina (100 nM) (Sigma-Aldrich) en ambos tratamientos. Finalmente, se realizó una prueba adicional en hepatocitos primarios con una carga adicional de glucosa (25 mM) y se utilizaron los mismos tratamientos de las fracciones y Flav1.

#### **8.7. Inmunofluorescencia de GLUT2 y GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios**

Después del tratamiento, se eliminó el medio y las células se fijaron con formaldehído/PBS al 10% durante 10 min. Las células se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 (0.5%) y se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario (dilución 1:1000) contra GLUT2 para los hepatocitos primarios y GLUT4 (Sigma-Aldrich) en ambas células. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 20 y las células se incubaron con un anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con rodamina (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), se usó para detectar el anticuerpo primario para GLUT2 y GLUT4. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 y se agregó una mezcla de PBS/glicerol/DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1:1000) durante 5 min para teñir los núcleos de ambas células. Las muestras se colocaron en un microscopio confocal DRAQ7™ Zen-Sp1 ZEISS con escáner láser y se midió la fluorescencia con una excitación de 405 nm y una emisión de 561 nm. Las imágenes se analizaron utilizando el software de imagen ImageJ de NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Las regiones de interés en las células se seleccionaron y se midió la intensidad promedio de píxeles (Loza-Rodríguez et al., 2020).

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

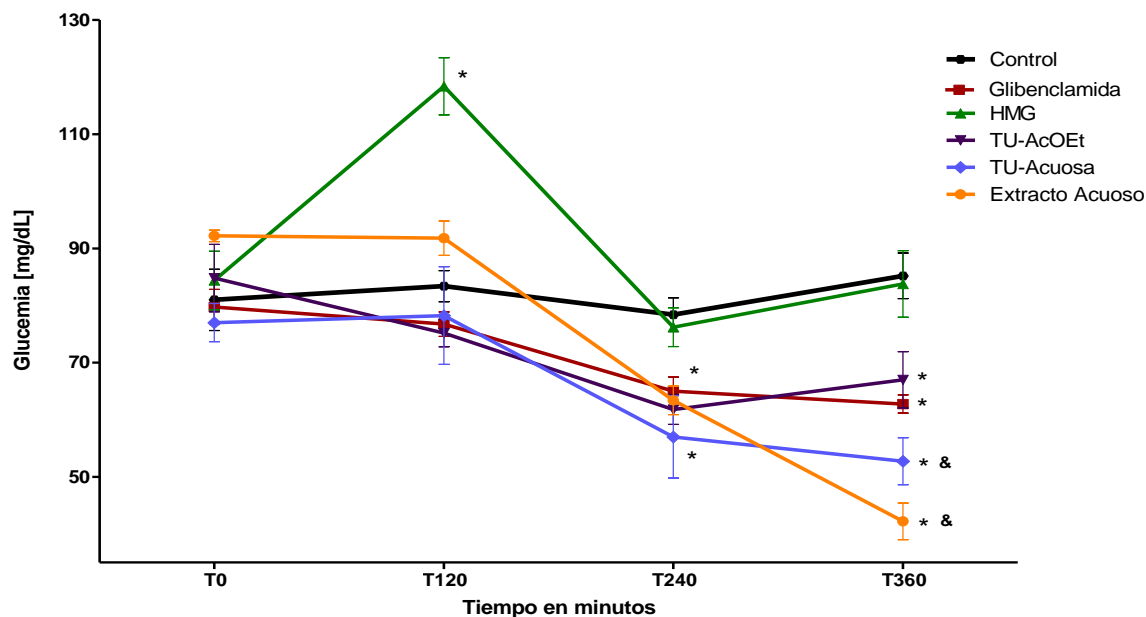
Se determinó el ABC y la concentración media de glucosa mediante un método geométrico (método del trapecioide) en las pruebas de tolerancia a la glucosa. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y Tukey-Kramer como una prueba de comparaciones múltiples. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. En todos los casos, los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.). El análisis se realizó con el paquete NCSS (software estadístico) y GraphPad Prism5.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Efecto hipoglucémico y/o antihiperoglucémico de *T. usneoides*

#### 10.1.1. Efecto hipoglucémico del extracto acuoso y las fracciones de *T. usneoides*

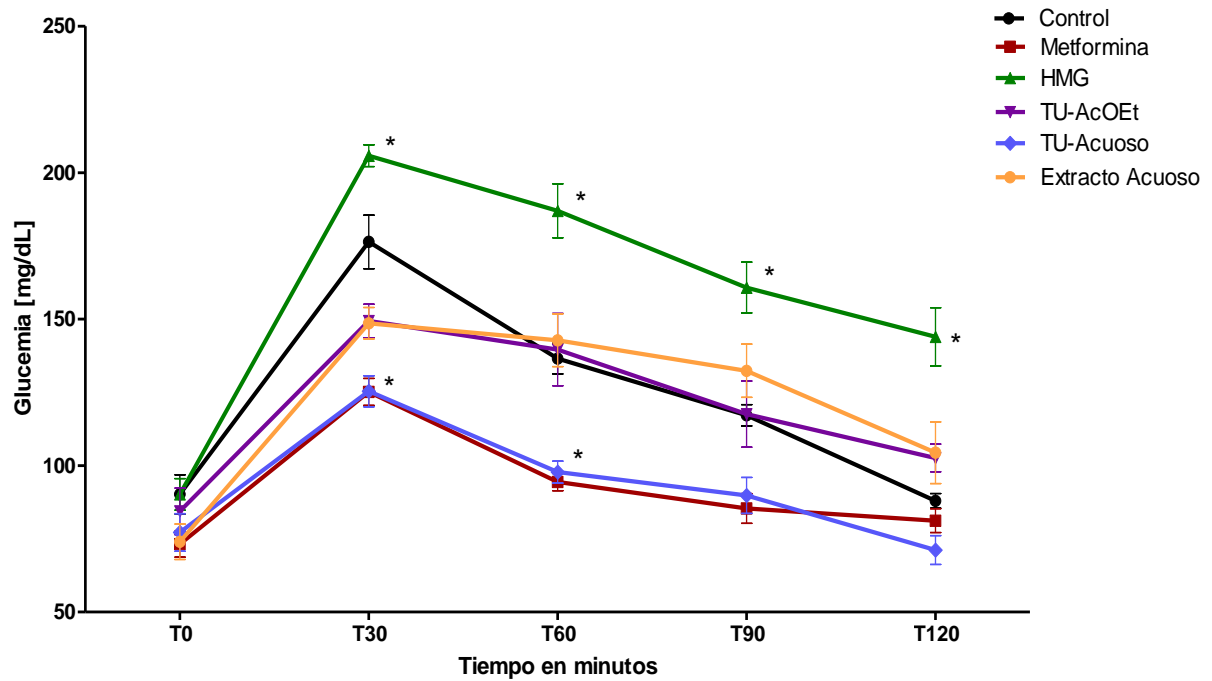
La Figura 6 muestra el efecto hipoglucémico del extracto acuoso y las fracciones (TU-AcOEt y TU-Acuosa) de *T. usneoides* a dosis de 250 mg/kg. El tratamiento con TU-AcOEt, TU-Acuosa y el extracto acuoso provocó un descenso de la glucemia a los 240 min, con un 21, 27 y 17%, respectivamente. Este efecto se mantuvo hasta los 360 min con el tratamiento de ambas fracciones y el extracto acuoso, disminuyendo significativamente la glucemia (21, 38 y 47%, respectivamente) en comparación con el grupo de control, similar al tratamiento con glibenclamida. El tratamiento con el HMG mostró un incremento de la glucemia del 41% a los 120 min en comparación con el grupo control.



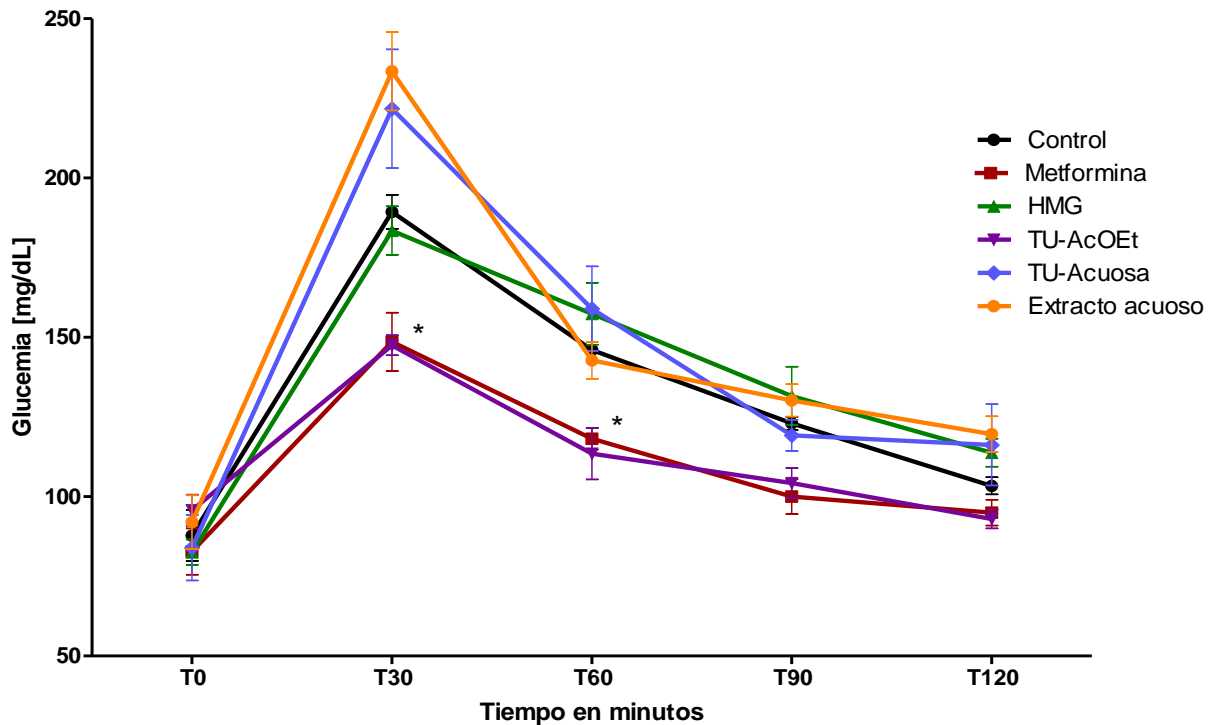
**Figura 6.** Efecto hipoglucémico de la TU-AcOEt, TU-Acuosa y el extracto acuoso de *T. usneoides*. Administración i.g. de la TU-AcOEt (250 mg/kg), TU-Acuosa (250 mg/kg), extracto acuoso (250 mg/kg), HMG (250 mg/kg), Glibenclamida (10 mg/Kg) y solución Tween 20 al 5% en ratones CD-1 machos de 8 semanas de edad. \*Diferencia significativa del grupo de control,  $p < 0.05$ . &Diferencia significativa del control positivo,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E (n=5).

### 10.1.2. Efecto de la TU-AcOEt en la prueba de tolerancia a la glucosa

En la prueba de tolerancia a la glucosa vía i.p. se observó un efecto antihiper glucémico con la administración de la TU-Acuosa durante los 30 y 60 min, con una disminución del ABC del 25%. Esta disminución fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, similar a metformina (26%). El tratamiento con HMG incrementó la glucemia durante los 30 min de manera significativa respecto al grupo control; este efecto se mantuvo hasta los 120 min, con un incremento del ABC del 29% (Figura 7). Por otro lado, el pico hiper glucémico se redujo durante los 30 y 60 min con el tratamiento vía i.g. de la fracción TU-AcOEt, mostrando una disminución del ABC del 17%, en comparación con el grupo control, similar al ABC con el tratamiento con metformina (18%); sin embargo, el extracto acuoso y la fracción TU-Acuosa no mostraron efecto antihiper glucémico (Figura 8).



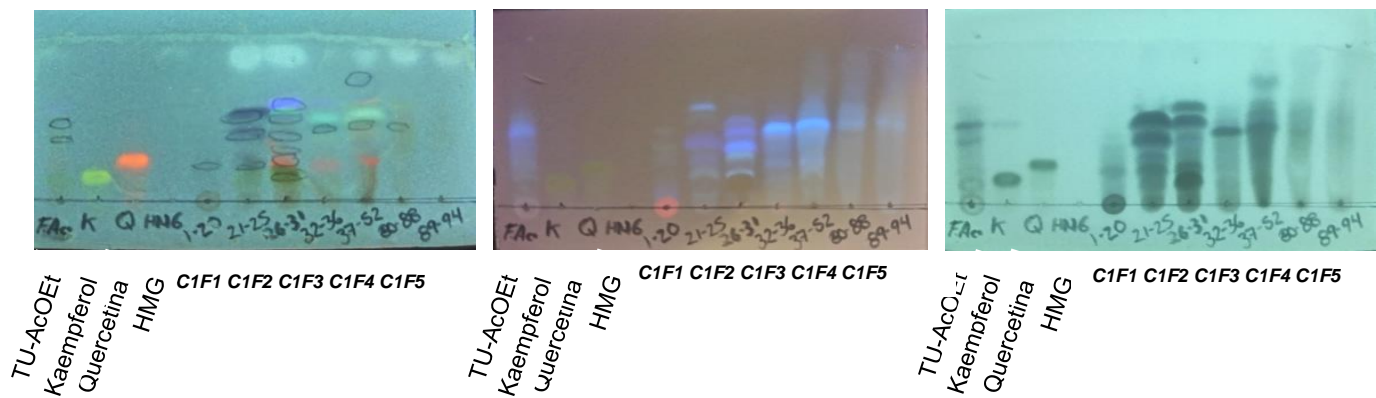
**Figura 7.** Prueba de tolerancia a la glucosa vía i.p. en ratones sanos. Los tratamientos se administraron por vía i.p. de la siguiente manera: Grupo control (Tween 20 al 5%), Metformina (150 mg/kg), HMG (250 mg/kg), TU-AcOEt, TU-Acuosa y el extracto acuoso (250 mg/kg). \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=5).



**Figura 8.** Prueba de tolerancia a la glucosa vía i.g. en ratones sanos. Los tratamientos fueron administrados por vía i.g. de la siguiente manera: Grupo control (Tween 20 al 5%), Metformina (150 mg/kg), HMG (250 mg/kg), TU-AcOEt, TU-Acuoso y el extracto acuoso (250 mg/kg) \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=4).

## 10.2. Análisis fitoquímico de la fracción TU-AcOEt

Dado que la fracción TU-AcOEt mostró efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico, se seleccionó para un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta. Se obtuvieron 115 subfracciones, las cuales se reunieron por CCF de acuerdo con sus características químicas, resultando en 5 fracciones que se nombraron como: C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5. La organización química de la subfracciones se observa en la Figura 9.

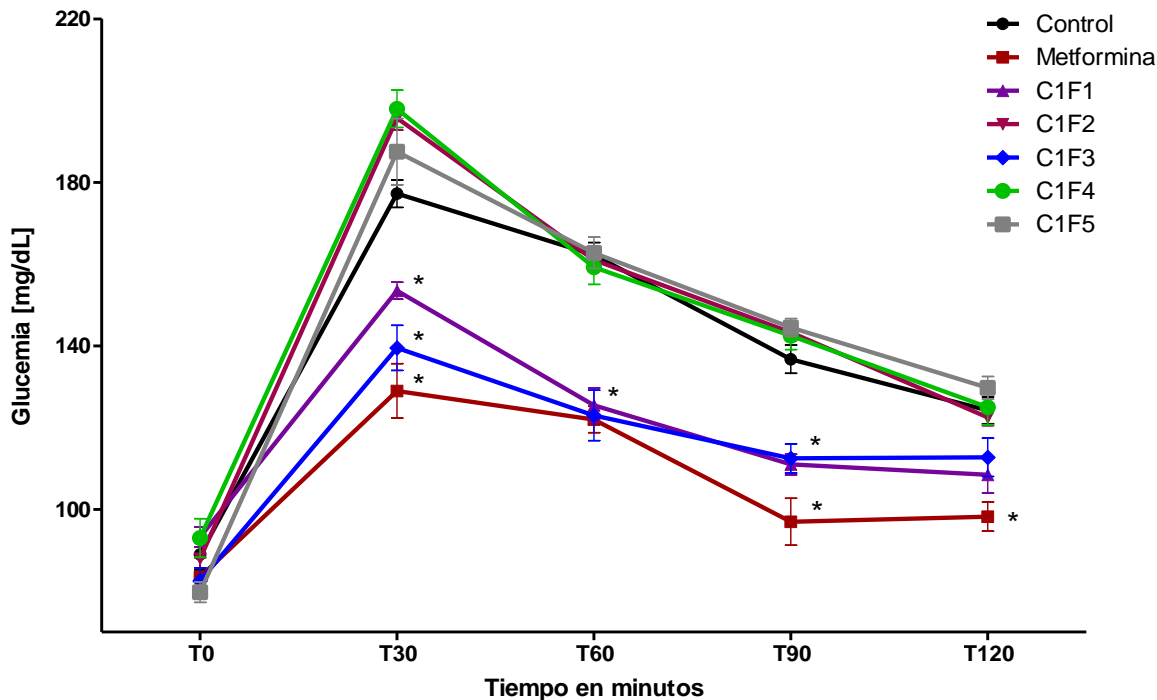


**Figura 9.** CCF de fase reversa de las fracciones obtenidas de TU-AcOEt. El seguimiento de las fracciones se realizó por CCF en un sistema de elución H<sub>2</sub>O (60%)/CH<sub>3</sub>CN (40%), se ordenaron y nombraron de acuerdo con su similitud química utilizando un revelador para flavonoides en: C1F1 (1-20), C1F2 (21-25), C1F3 (26-31), C1F4 (32-52) y C1F5 (80-94). Quercetina, kaempferol y HMG se utilizaron como estándares.

### 10.3. Efecto de las fracciones (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5) de TU-AcOEt en la prueba de tolerancia a la glucosa

Para evaluar el efecto de las fracciones obtenidas de TU-AcOEt sobre la glucemia en ratones, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral. El tratamiento con C1F1 y C1F3 a dosis de 250 mg/kg disminuyeron el pico hiperglucémico durante los 30 min, este efecto sobre la glucemia se mantuvo hasta los 60 y 90 min, con una disminución del ABC de 16 y 19%, respectivamente. Estos valores fueron estadísticamente significativos respecto al grupo control, similares al ABC con el tratamiento con metformina (24%). Sin embargo, las fracciones C1F2, C1F4 y C1F5 no mostraron cambios sobre la glucemia, respecto al grupo control (Figura 10). Por lo tanto, la fracción C1F3 se seleccionó para continuar su purificación.

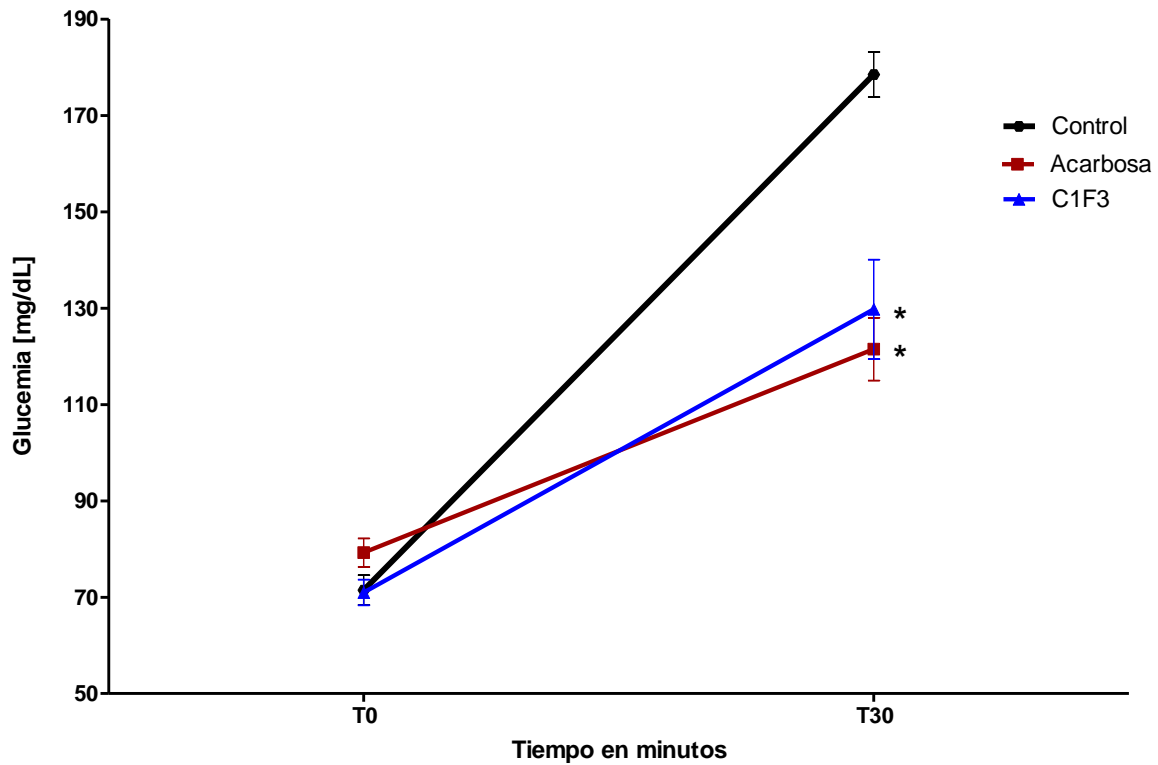




**Figura 10.** Efecto de C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5 sobre la glucemia en ratones CD-1. Los tratamientos se administraron por vía i.g. de la siguiente manera: Grupo control (Tween 20 al 30%), Metformina (150 mg/kg) y las fracciones de TU-AcOEt (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4 y C1F5) a 250 mg/kg. Después de la administración de los tratamientos se determinó la glucemia a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 min). \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=4).

#### 10.4. Efecto de la fracción C1F3 sobre la glucemia en la prueba de tolerancia al almidón

El efecto de C1F3 sobre las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales se determinó mediante la prueba de tolerancia al almidón. El tratamiento con C1F3 disminuyó la glucemia 30 min después de la carga con almidón. Este efecto fue similar a acarbosa y fue estadísticamente significativo en relación con el grupo control (Figura 11).



**Figura 11.** Prueba de tolerancia al almidón en ratones CD-1 con 12 h de ayuno. Glucemias después de la administración (i.g.) de la C1F3 (250 mg/kg), Acarbosa (5 mg/kg) y Tween 20 al 30% (Grupo control). \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=4).

### 10.5. Prueba de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*

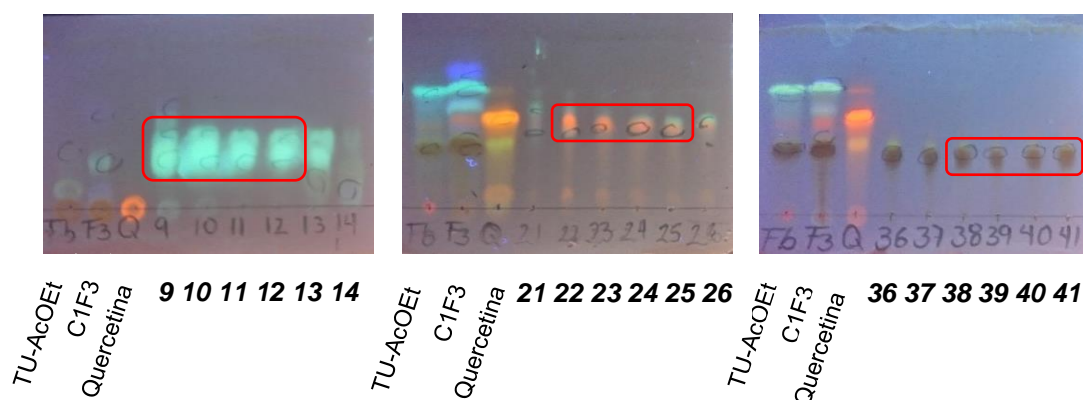
Para determinar el efecto de la TU-AcOEt y C1F3 sobre  $\alpha$ -glucosidasas, se realizó una prueba de inhibición *in vitro*. La fracción TU-AcOEt exhibió un efecto moderado en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, con un valor del 22%, mientras que la fracción C1F3 rica en flavonoides, exhibió una inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas del 21%, lo que indica que ambas fracciones tuvieron menor actividad que el extracto de *Camellia sinensis* (89%). La actividad de la TU-AcOEt y C1F3 se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*.

Extracto o fracción 1mg/ml	Porcentaje de inhibición de $\alpha$ - glucosidasa (%)
<i>Camellia sinensis</i>	89.7 $\pm$ 2.2
TU-AcOEt	22.0 $\pm$ 7.6
C1F3	21.1 $\pm$ 5.6

#### 10.6. Fraccionamiento de C1F3 por cromatografía en columna y caracterización química por HPLC, MS y RMN

La fracción C1F3 se sometió a un nuevo fraccionamiento por cromatografía en columna. El análisis por CCF permitió reunir 77 fracciones obtenidas de acuerdo con sus características y similitud química. Se obtuvieron tres grupos de fracciones que se nombraron de la siguiente manera: C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44. El uso de un revelador para flavonoides durante el análisis por CCF ayudó a determinar la presencia de compuestos fenólicos en los tres grupos de fracciones, tal como se muestra en los cuadros en color rojo (Figura 12).

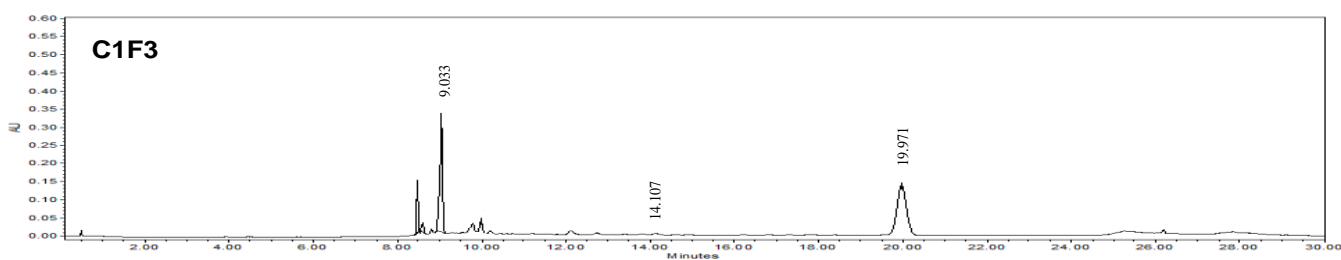


**Figura 12.** CCF de fase reversa de las fracciones obtenidas de C1F3. Para el desplazamiento de las fracciones se utilizó un sistema de elusión H<sub>2</sub>O (70%)/CH<sub>3</sub>CN

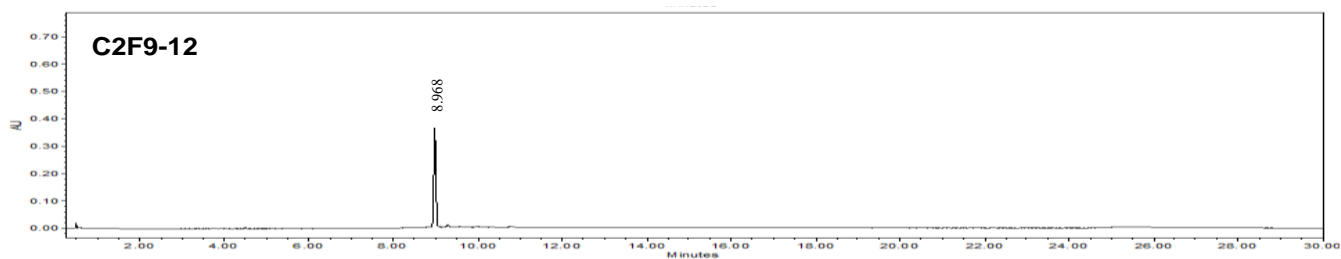
(30%). Se utilizó un revelador de flavonoides para la identificación de sus posibles componentes químicos. Se obtuvieron tres grupos de compuestos que se nombraron de acuerdo con su similitud química en: C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44. Marcando en color rojo los posibles compuestos fenólicos y flavonoides.

Los tres grupos de fracciones (C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44), junto con C1F3, se analizaron por HPLC. Se encontraron tiempos de retención (RT) de 8.968, 14.143 y 19.953 para C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44, respectivamente. Estos valores fueron similares a tres señales presentes en C1F3 (tiempos de retención de 9.033, 14.107 y 19.971) (Figura 13).

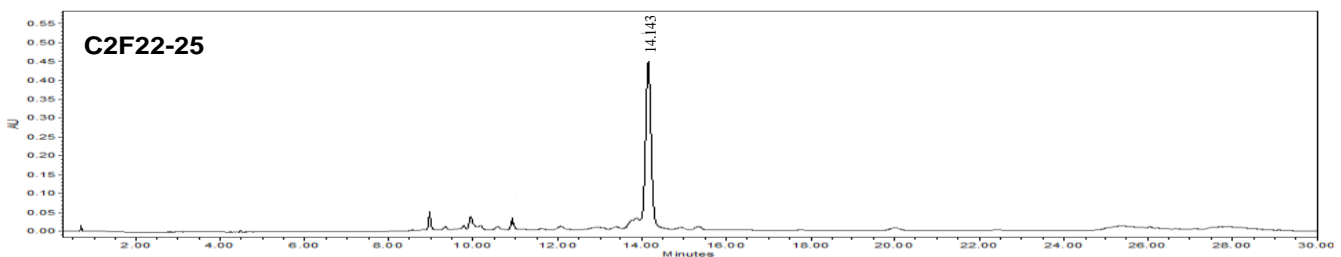
A)

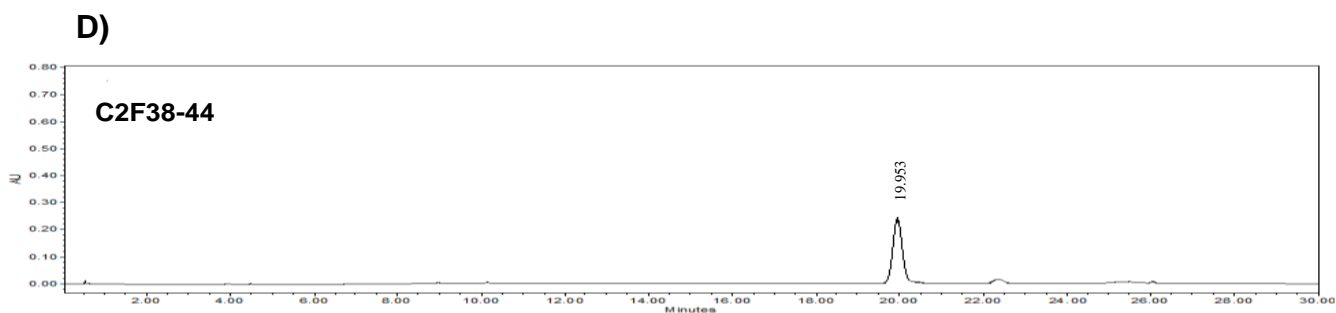


B)



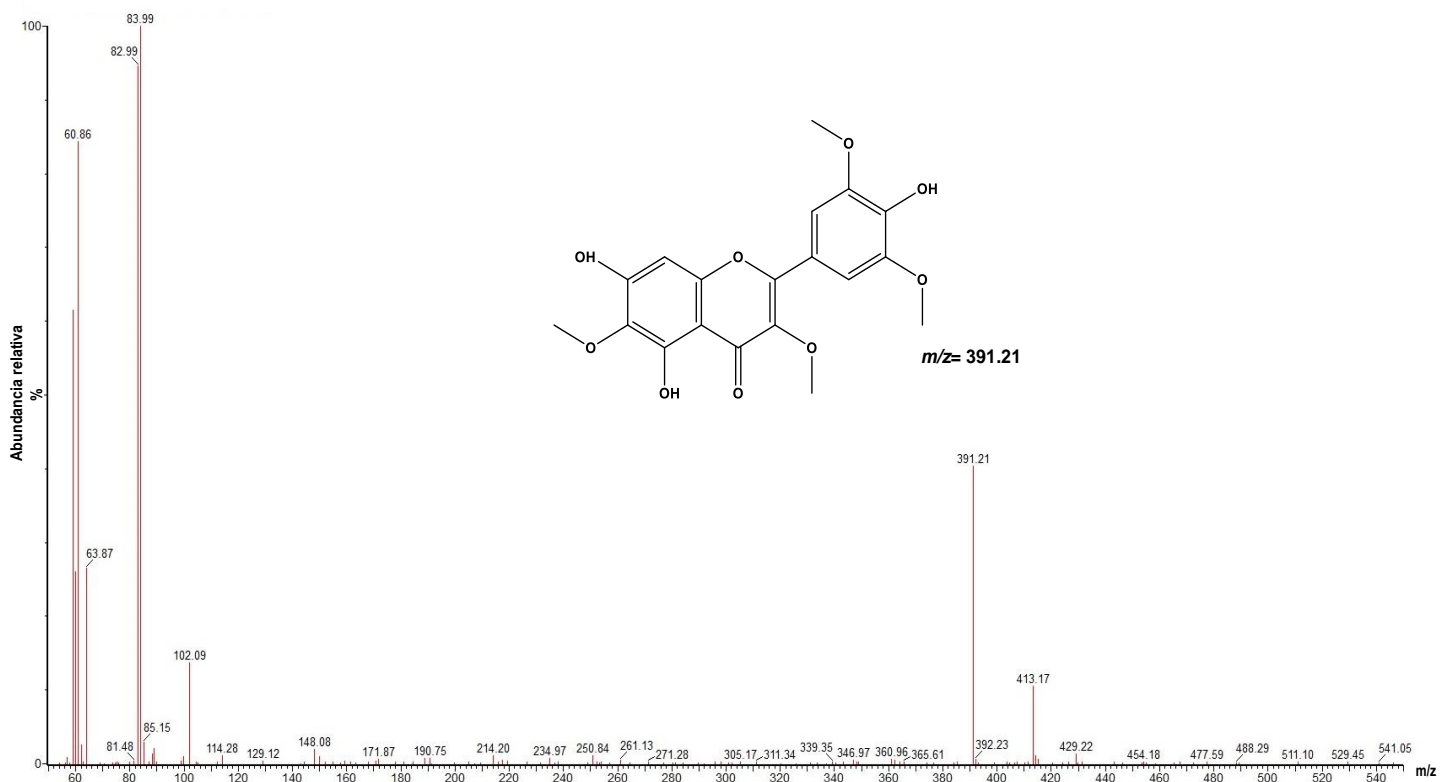
C)



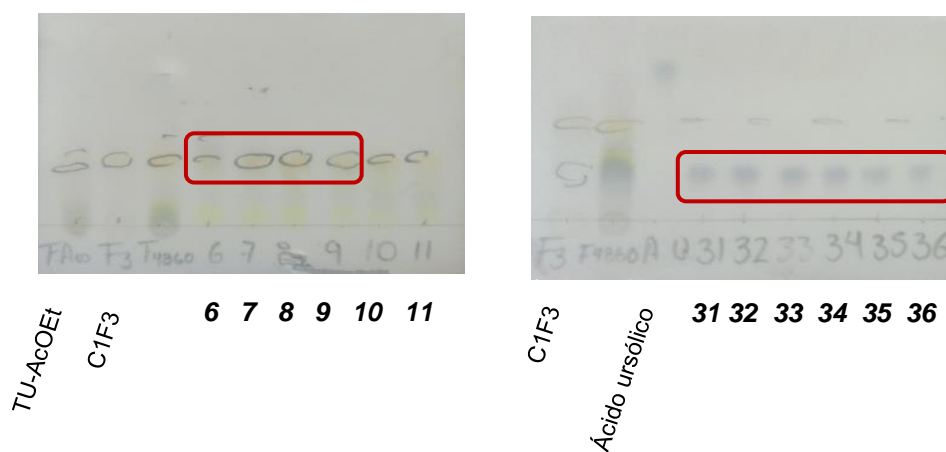


**Figura 13.** Análisis por HPLC de C1F3 y las fracciones C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44. A) C1F3 con RT de 9.033, 14.107 y 19.971 min detectados a  $\lambda=330$ ; B) C2F9-12 detectado a  $\lambda=330$ , pico máximo con RT de 8.968 min; C) C2F22-25 detectado a  $\lambda=330$ , pico máximo con RT de 14.143 min; D) C2F38-44 detectado a  $\lambda=330$ , pico máximo con RT de 19.953 min.

El análisis por MS para C3F38-44 resultó en una relación carga/masa ( $m/z$ ) de 391.21 (Figura 14). Sin embargo, la C2F38-41 se sometió a un fraccionamiento adicional por ser una de las fracciones más abundantes en C1F3. Su fraccionamiento generó 81 subfracciones que se agruparon por CCF de acuerdo con sus características químicas, resultando en dos fracciones que se nombraron C3F6-9 y C3F30-41. El análisis con el revelador de flavonoides mostró la presencia de flavonoides (Figura 15).



**Figura 14.** Espectro de MS y estructura química de Flav1.

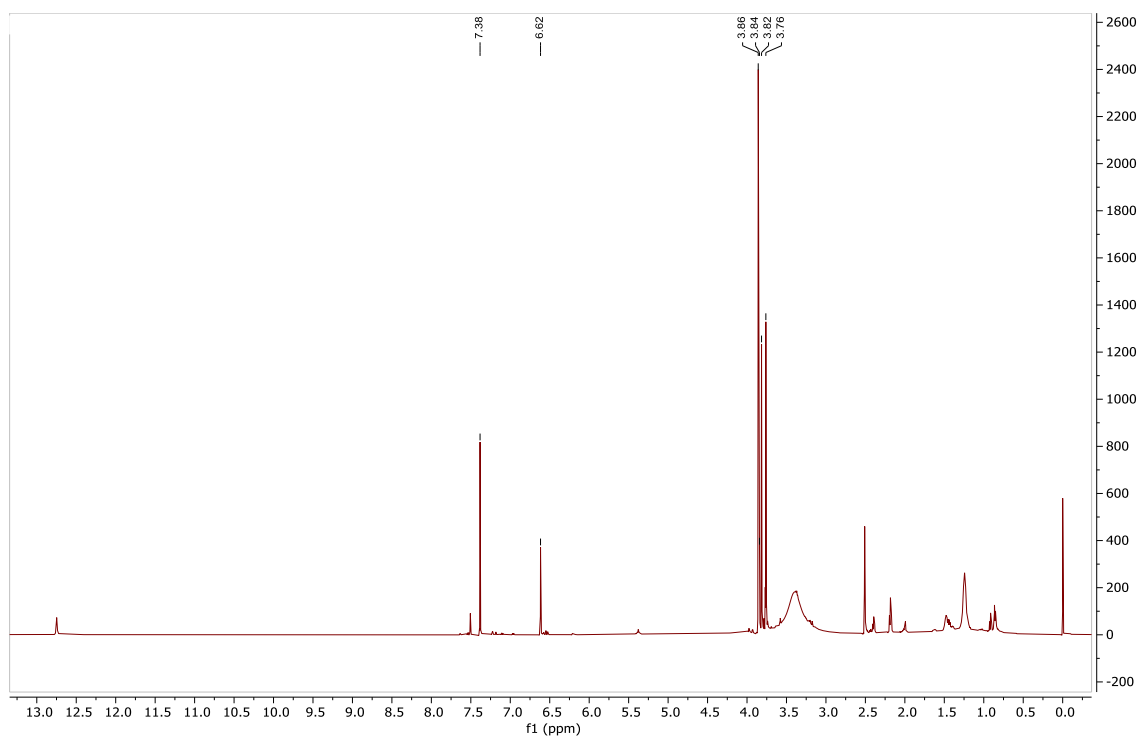


**Figura 15.** CCF de fase normal de la fracciones obtenidas de C2F38-44. La CCF fue desarrollada en un sistema de elución H<sub>2</sub>O (50%)/CH<sub>3</sub>CN (50%). Para la identificación de sus posibles componentes químicos se utilizó un revelador para flavonoides. Se obtuvieron dos grupos de compuestos que se nombraron por su

similitud química en: C3F6-9 y C2F30-41. Marcando en color rojo los posibles flavonoides.

Debido a su abundancia en C2F38-44, la identificación química del compuesto presente en la fracción C3F6-9 se analizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. Los desplazamientos químicos para los protones que constituyen a los grupos metilo, exhibieron picos con un valor de 3.76, 3.82, 3.84 y 3.86; los grupos hidroxilo exhibieron picos con un desplazamiento químico de 12.75 (Figura 16A). La  $^{13}\text{C}$ -RMN mostró desplazamientos químicos para los átomos de carbono que componen a los grupos metilo de 56,60, 60,16 y 60,39. También, los picos de 139.45, 155.02 y 155.77 corresponden a los desplazamientos químicos de los carbonos 5, 7 y 4' (Figura 16B). A partir de estos datos, junto con el análisis de HPLC y MS se determinó que el flavonoide Flav1 se encuentra presente en C3F6-9. La estructura química de Flav1 se observa en la Figura 17.

A)



B)

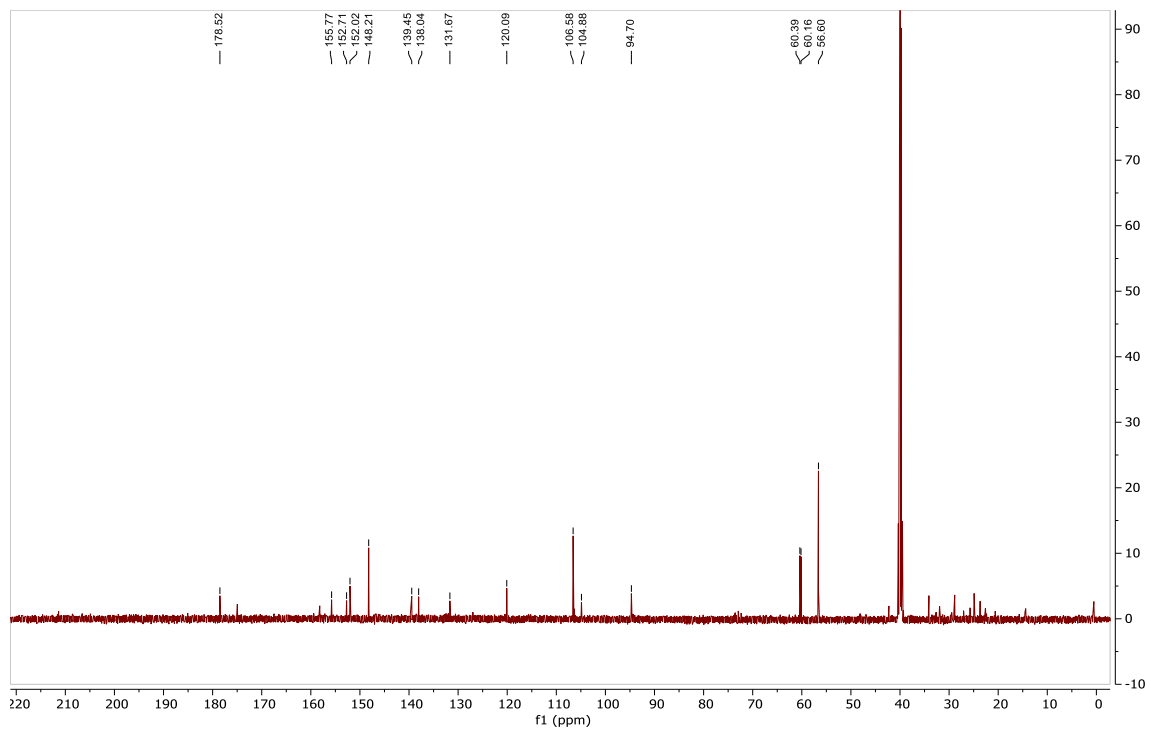
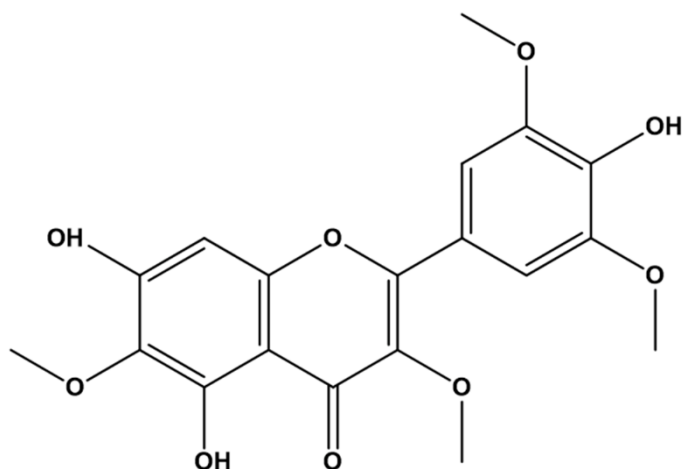


Figura 16. Análisis por RMN de la fracción C3F6-9. A) Compuesto de  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 600 MHz). B) Compuesto de  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO-D<sub>6</sub>, 600 MHz).





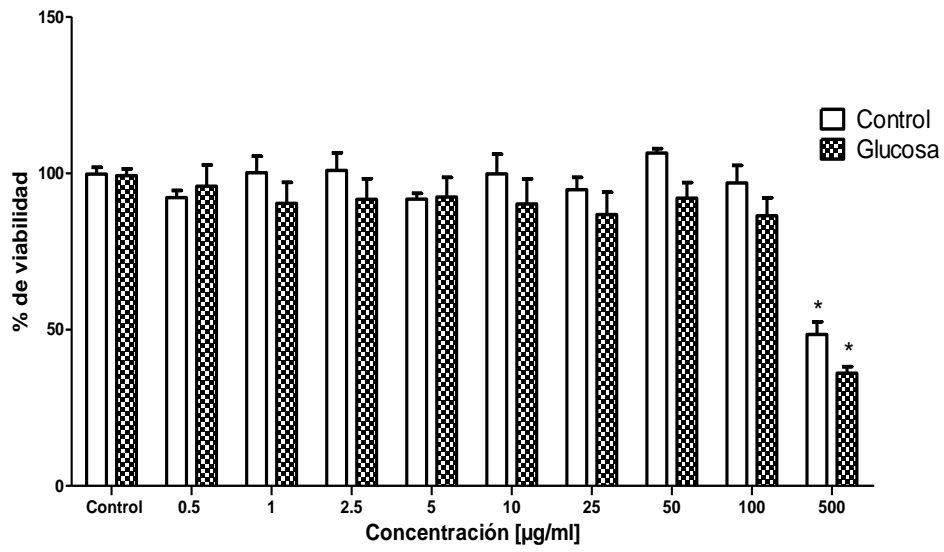
**Figura 17.** Estructura química de Flav1.

## **10.7. Prueba de viabilidad en modelos *in vitro* por rojo neutro**

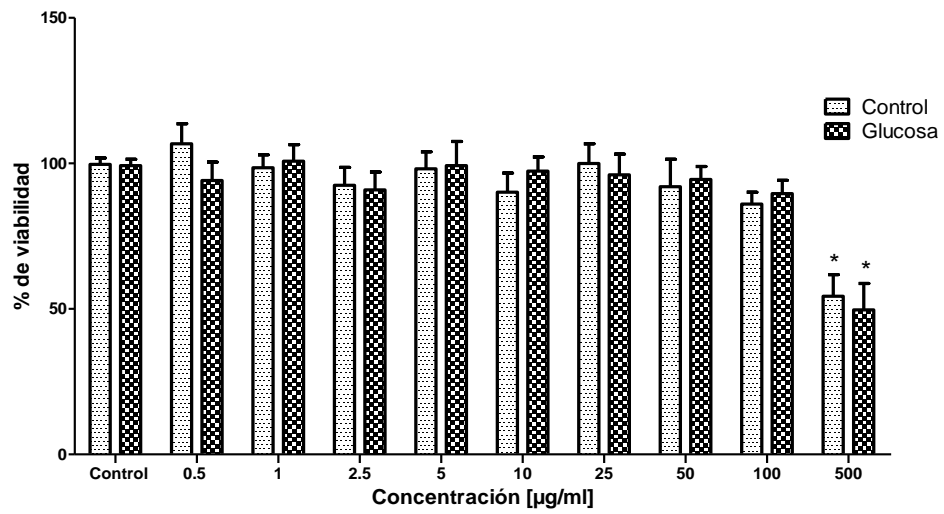
### **10.7.1. Mioblastos C2C12**

Con la finalidad de conocer las concentraciones adecuadas donde las fracciones no modifiquen la viabilidad celular, se realizó una prueba de rojo neutro. Las células C2C12 tratadas con las fracciones C2F9-12, C2F22-25 y C3F30-41 mostraron una disminución de la viabilidad con glucosa baja y alta a partir de 500  $\mu\text{g/ml}$ , estadísticamente significativa, respecto al grupo control (Figuras 18A, B y C). En el caso de la fracción C2F38-44, la viabilidad se afectó a partir de 100  $\mu\text{g/ml}$  con glucosa alta, mientras que el tratamiento con 500  $\mu\text{g/ml}$  con glucosa baja disminuyó la viabilidad celular, respecto al grupo control (Figura 18D). Finalmente, el tratamiento con Flav1 redujo la viabilidad después de 1278.8  $\mu\text{M}$  (500  $\mu\text{g/ml}$ ) con glucosa baja. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de Flav1 en condiciones de glucosa alta, la viabilidad celular disminuyó a partir de 127.9  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{g/ml}$ ), estadísticamente significativa respecto al grupo control (Figura 18E).

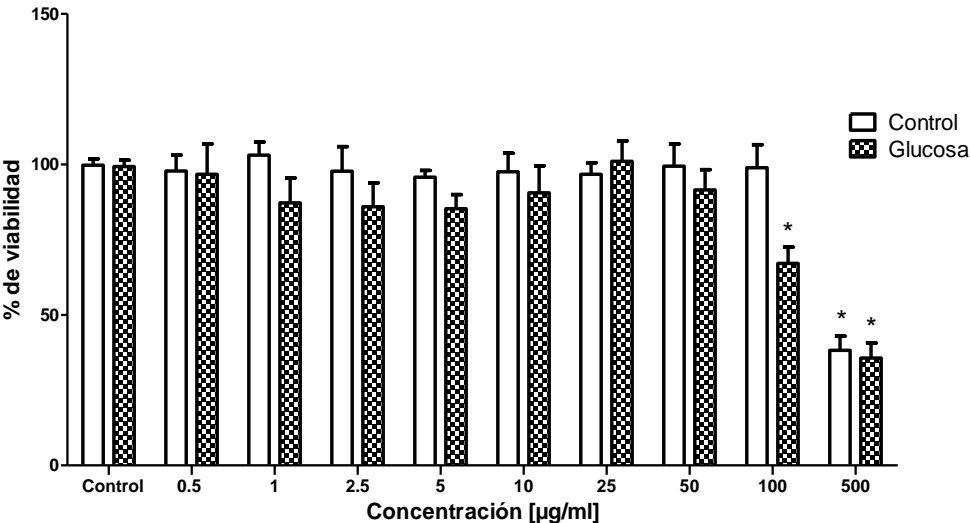
A)



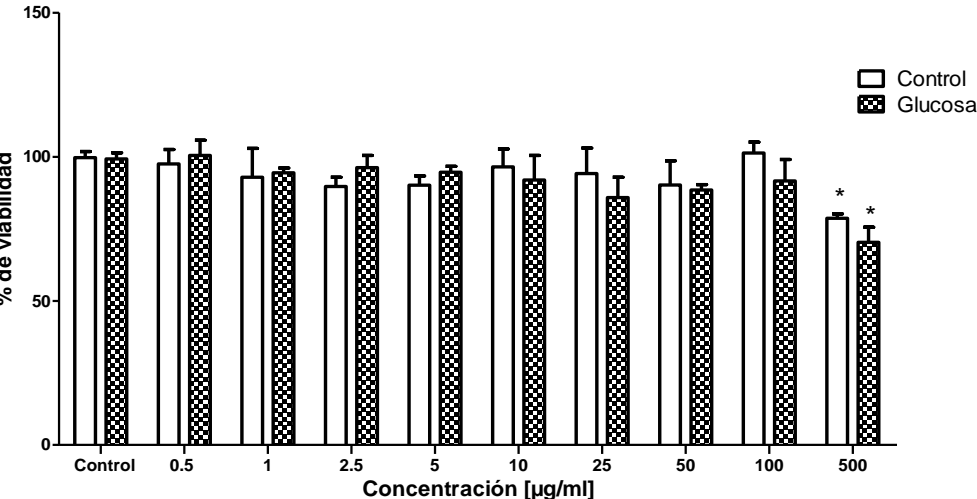
B)

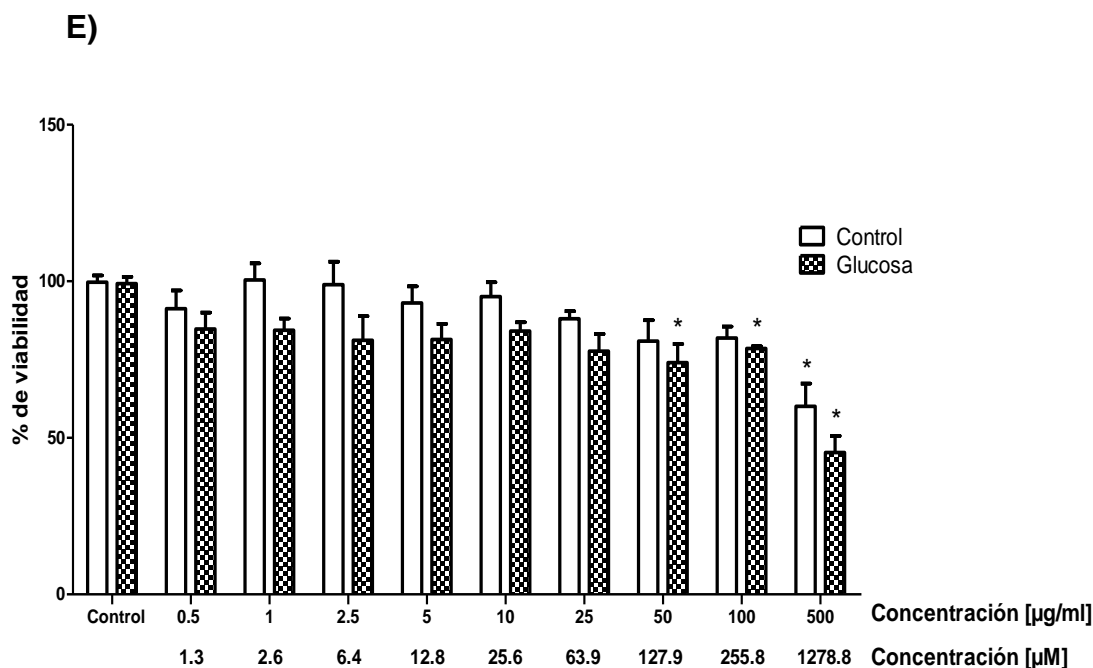


C)



D)





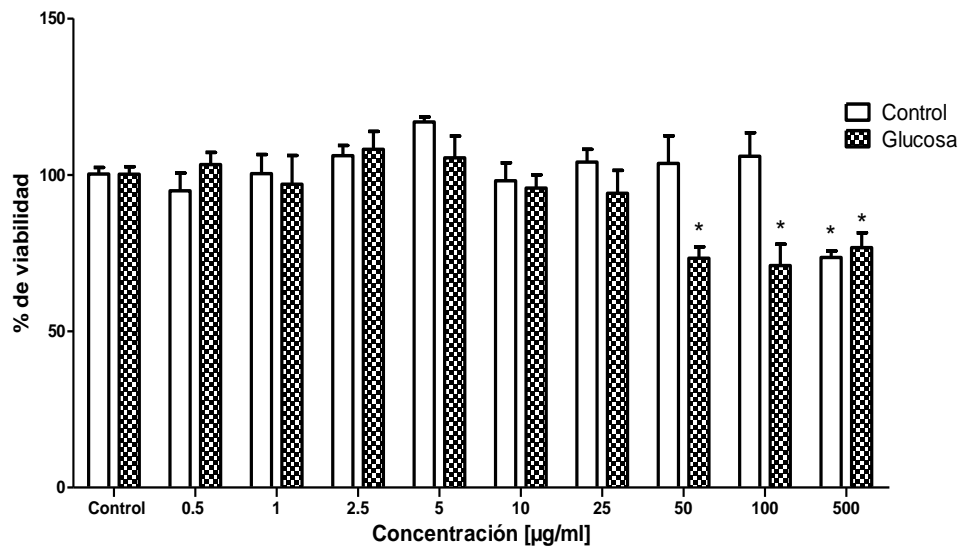
**Figura 18.** Efecto de las fracciones C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41 y Flav1 sobre la viabilidad celular en mioblastos C2C12. Las células se trataron con: A) C2F9-12, B) C2F22-25, C) C2F38-44, D) C3F30-41 a concentraciones de 0.5-500 µg/ml y E) Flav1 a concentraciones de 1.3-1278.8 µM (valores equivalentes a 0.5-500 µg/ml) con baja y alta glucosa durante 24 h. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por rojo neutro. \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n = 4).

### 10.7.2. Hepatocitos primarios

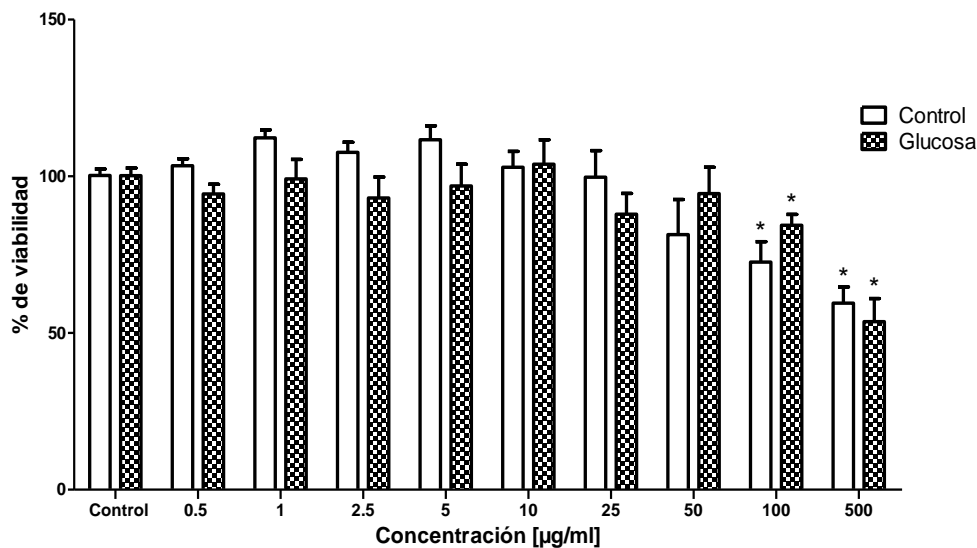
El tratamiento con las fracciones C2F9-12, C2F38-44 y C3F30-41 con glucosa baja, disminuyeron significativamente la viabilidad a 500 µg/ml en relación con el grupo control (Figura 19A, C y D); sin embargo, el tratamiento con C2F22-25 disminuyó la viabilidad a partir de 100 µg/ml, respecto al control (Figura 19B). Cuando las células se cultivaron con glucosa alta más las fracciones C2F22-25, C2F38-44 y C3F30-41, se observó una disminución de la viabilidad a una concentración de 100 µg/ml (Figura 19B, C y D), mientras que el tratamiento con C2F9-12 disminuyó la viabilidad a partir de 50 µg/ml (Figura 19A). Por otro lado, Flav1 redujo la viabilidad a partir de

255.8  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{g/ml}$ ) con glucosa baja. El incremento de glucosa redujo la viabilidad a partir de 127.9  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{g/ml}$ ) de una manera dependiente de la concentración, estadísticamente significativa, respecto al grupo control (Figura 19E). Por lo tanto, para los ensayos de inmunofluorescencia en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios se utilizó la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  para las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y C3F30-41) y 25.6  $\mu\text{M}$  para Flav1.

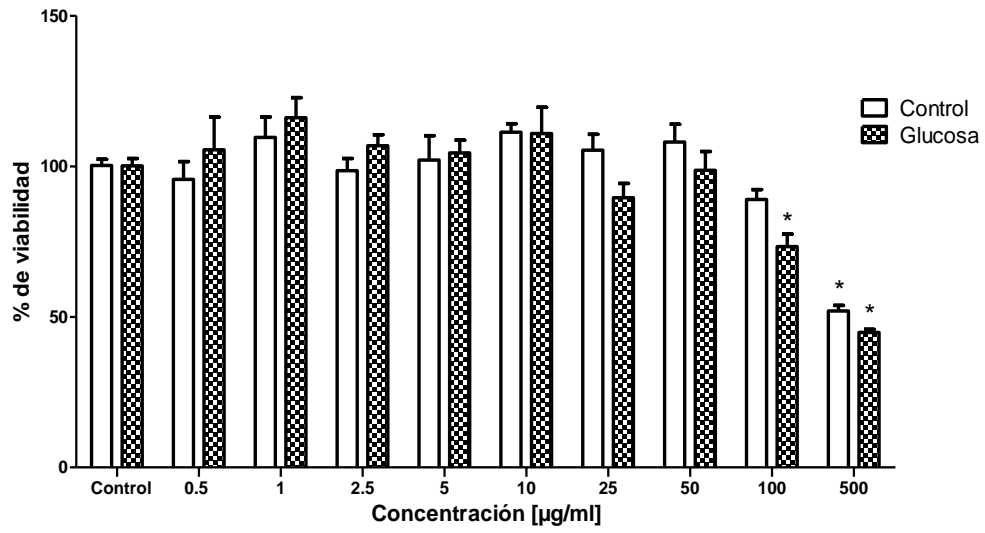
**A)**



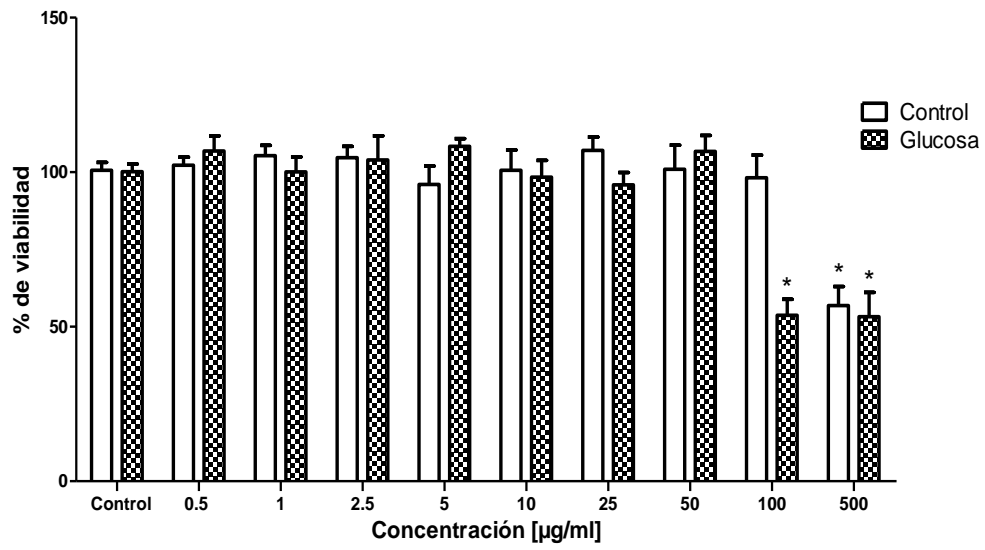
**B)**

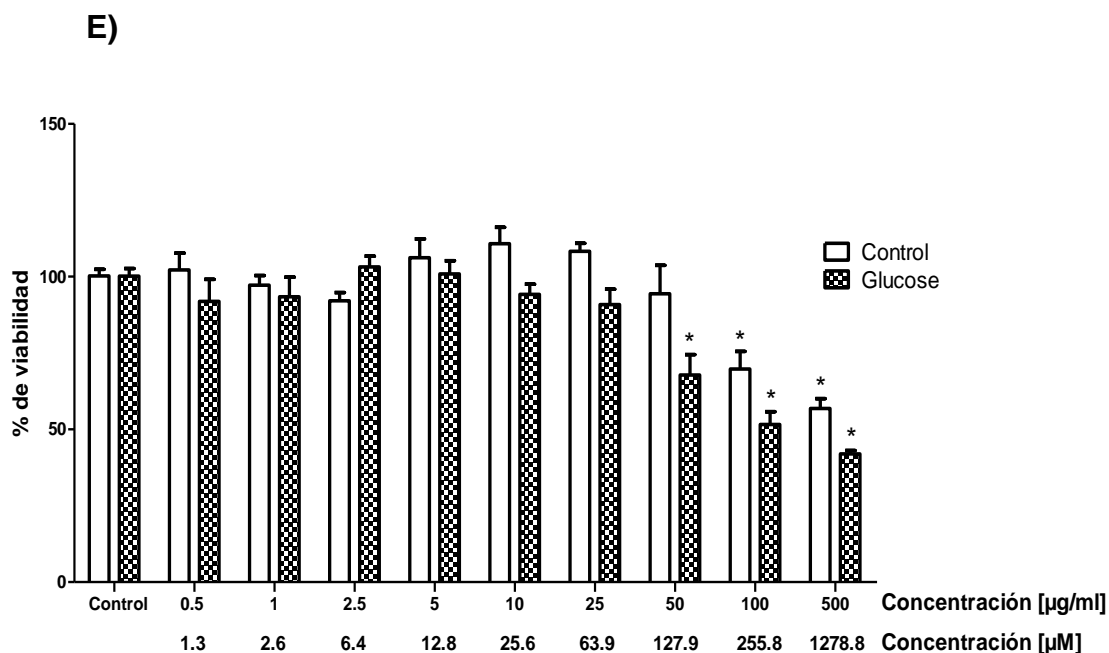


C)



D)



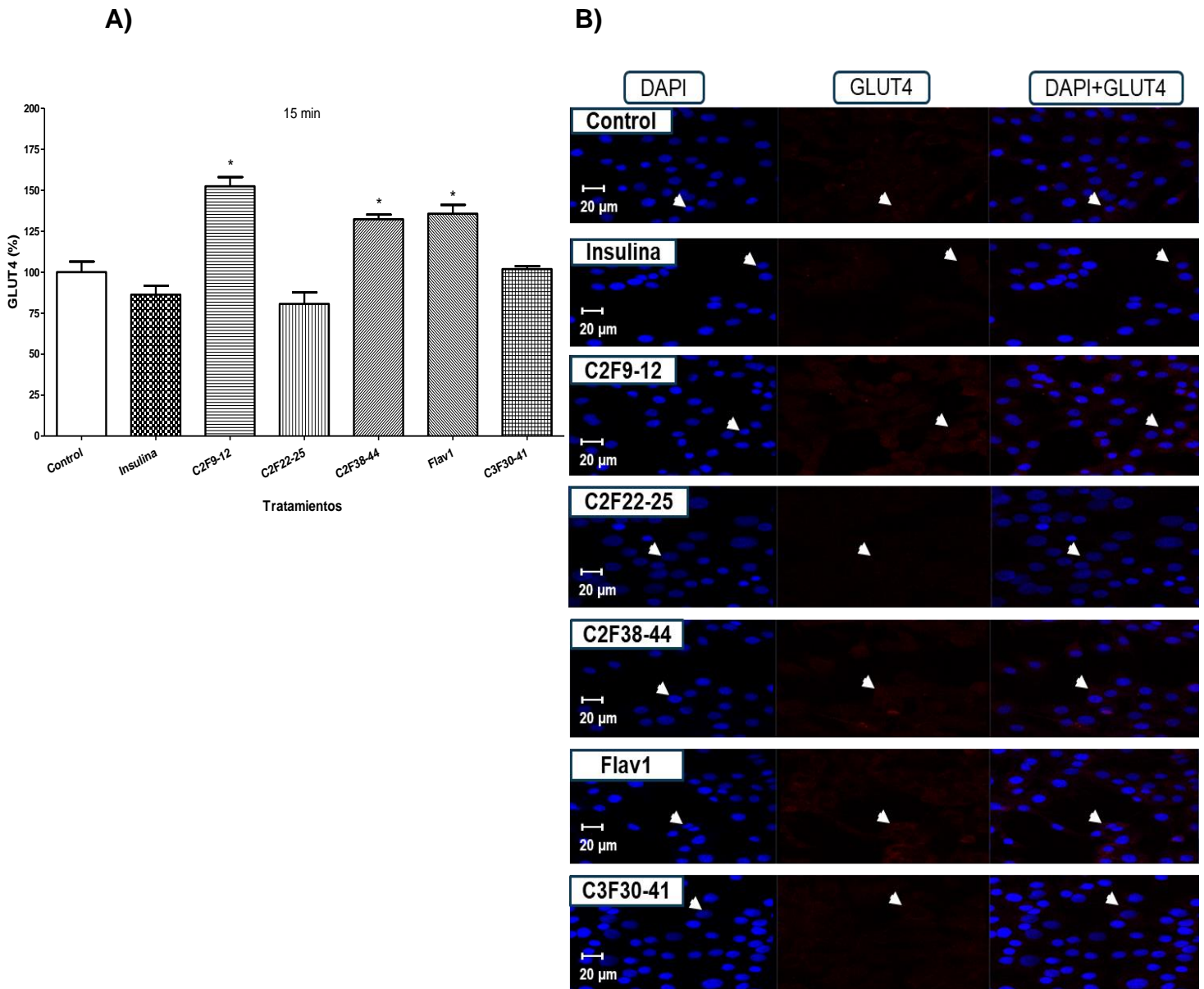


**Figura 19.** Efecto de las fracciones C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41 y Flav1 sobre la viabilidad celular en hepatocitos primarios. Las células se trataron con: A) C2F9-12, B) C2F22-25, C) C2F38-44, D) C3F30-41 a concentraciones de 0.5-500 µg/ml y E) Flav1 a concentraciones de 1.3-1278.8 µM (valores equivalentes a 0.5-500 µg/ml) con baja y alta glucosa durante 24 h. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por rojo neutro. \*Diferencia significativa en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n = 4).

## 10.8. Ensayos de inmunofluorescencia

### 10.8.1. Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 por microscopía confocal

Para evaluar el efecto de las fracciones y Flav1 sobre GLUT4 se realizó un ensayo por microscopia confocal. Durante los 15 min de tratamiento, C2F9-12, C2F38-44 y Flav1 incrementaron significativamente la translocación de GLUT4 (52, 32 y 36%, respectivamente), respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con C2F22-25, C3F30-41 e insulina no incrementaron GLUT4 (Figura 20).

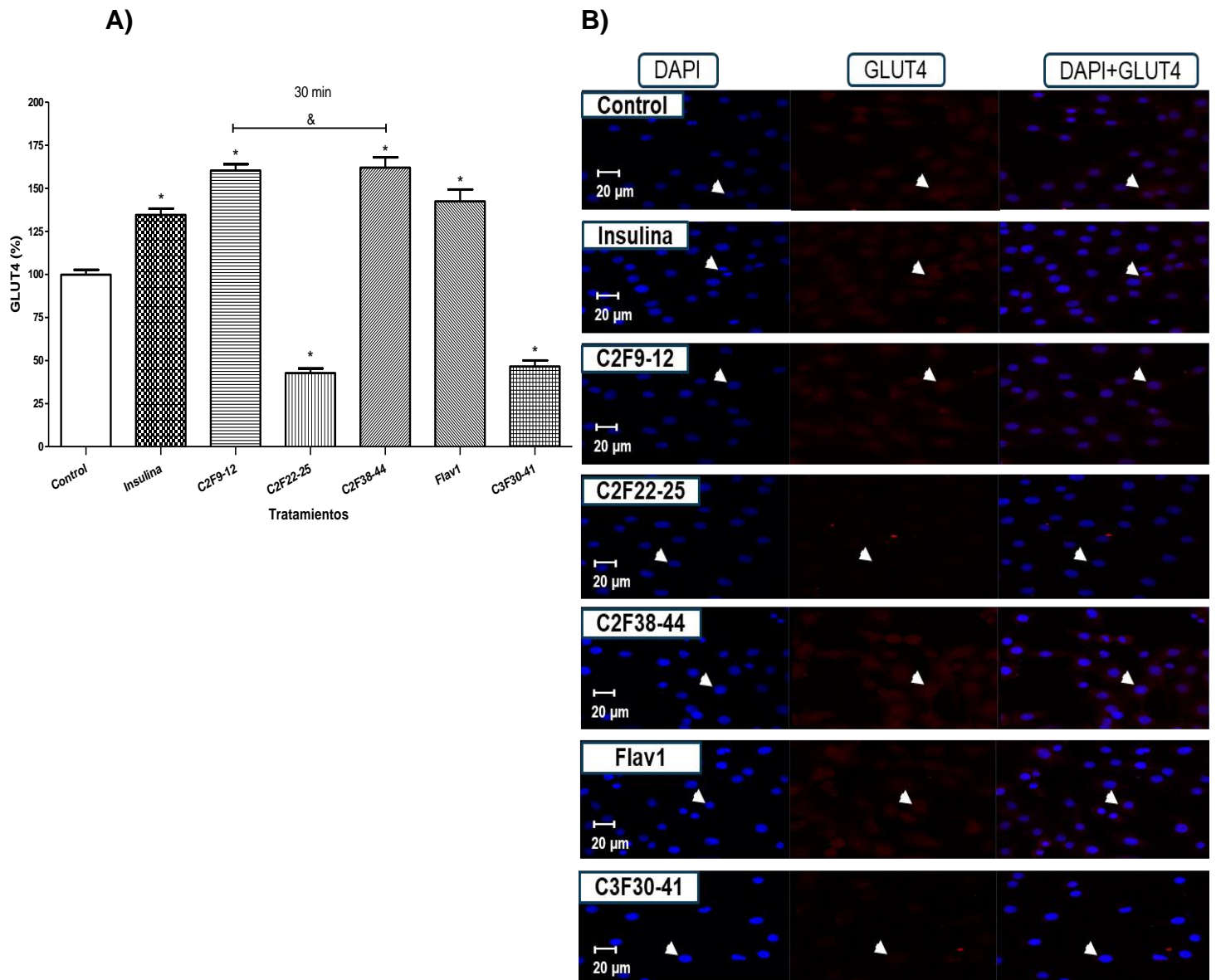


**Figura 20.** Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 a 15 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 15 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) (10  $\mu$ g/ml), Flav1 (25.6  $\mu$ M) e insulina (100 nM). B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 15 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 e insulina (40x). Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos



teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20  $\mu\text{m}$ ). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. ( $n=3$ ).

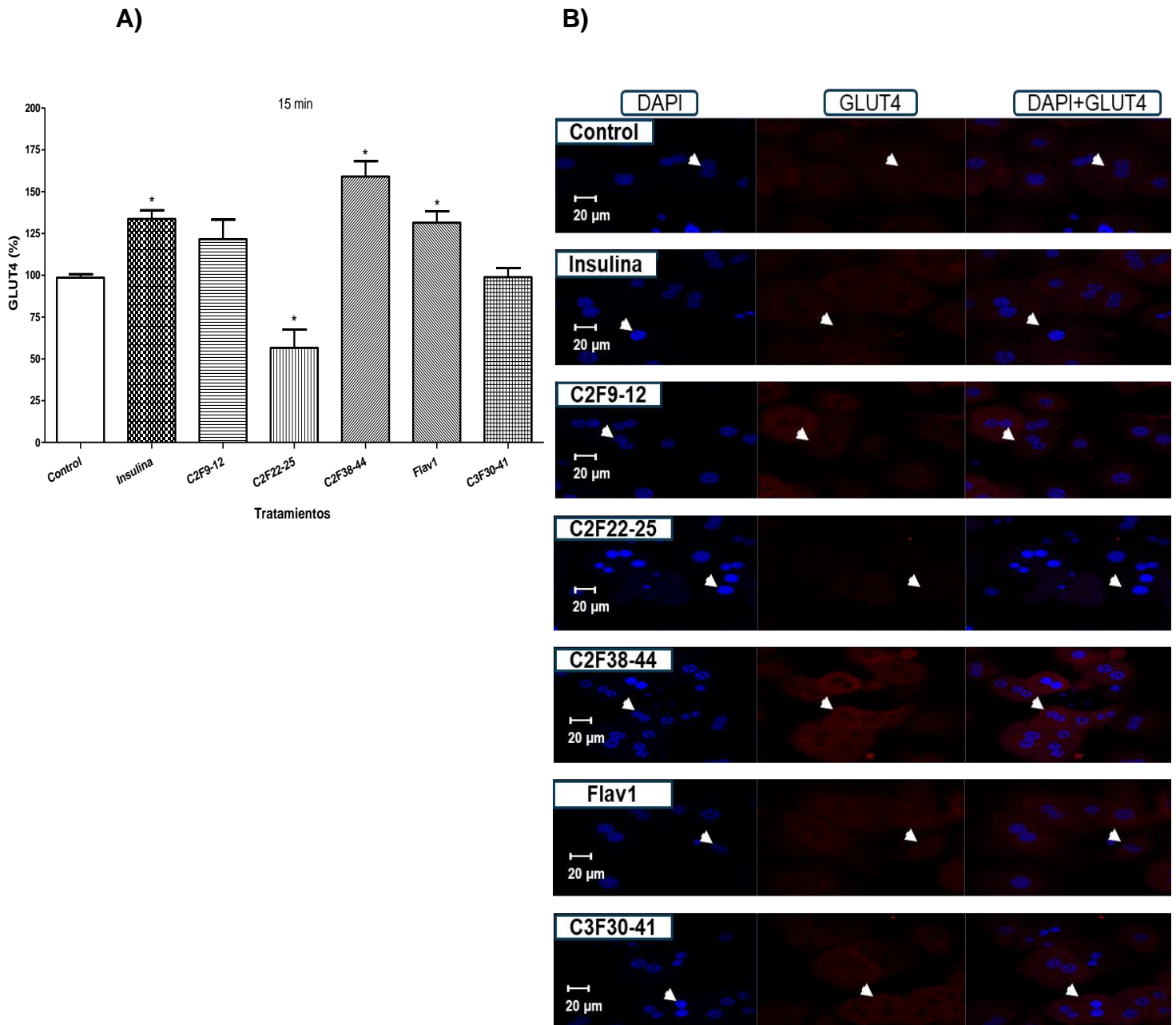
A los 30 min, la movilización de GLUT4 se incrementó de manera significativa con el tratamiento de C2F9-12, C2F38-44 y Flav1 en un 61, 62 y 43%, respectivamente, similar al tratamiento con insulina (43%). Por otro lado, las células tratadas con C2F22-25 y C3F30-41 mostraron una menor translocación de GLUT4, estadísticamente significativa, respecto al control (Figura 21). En las imágenes de inmunofluorescencia se observa en color rojo regiones intracelulares que corresponden a GLUT4 (Figura 21B).



**Figura 21.** Translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 a 30 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 30 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) (10 µg/ml), Flav1 (25.6 µM) e insulina (100 nM). B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 30 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 e insulina (40x). Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20 µm). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . &Diferencia significativa respecto al control positivo,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=3).

#### **10.8.2. Efecto de las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) y Flav1 sobre la translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios**

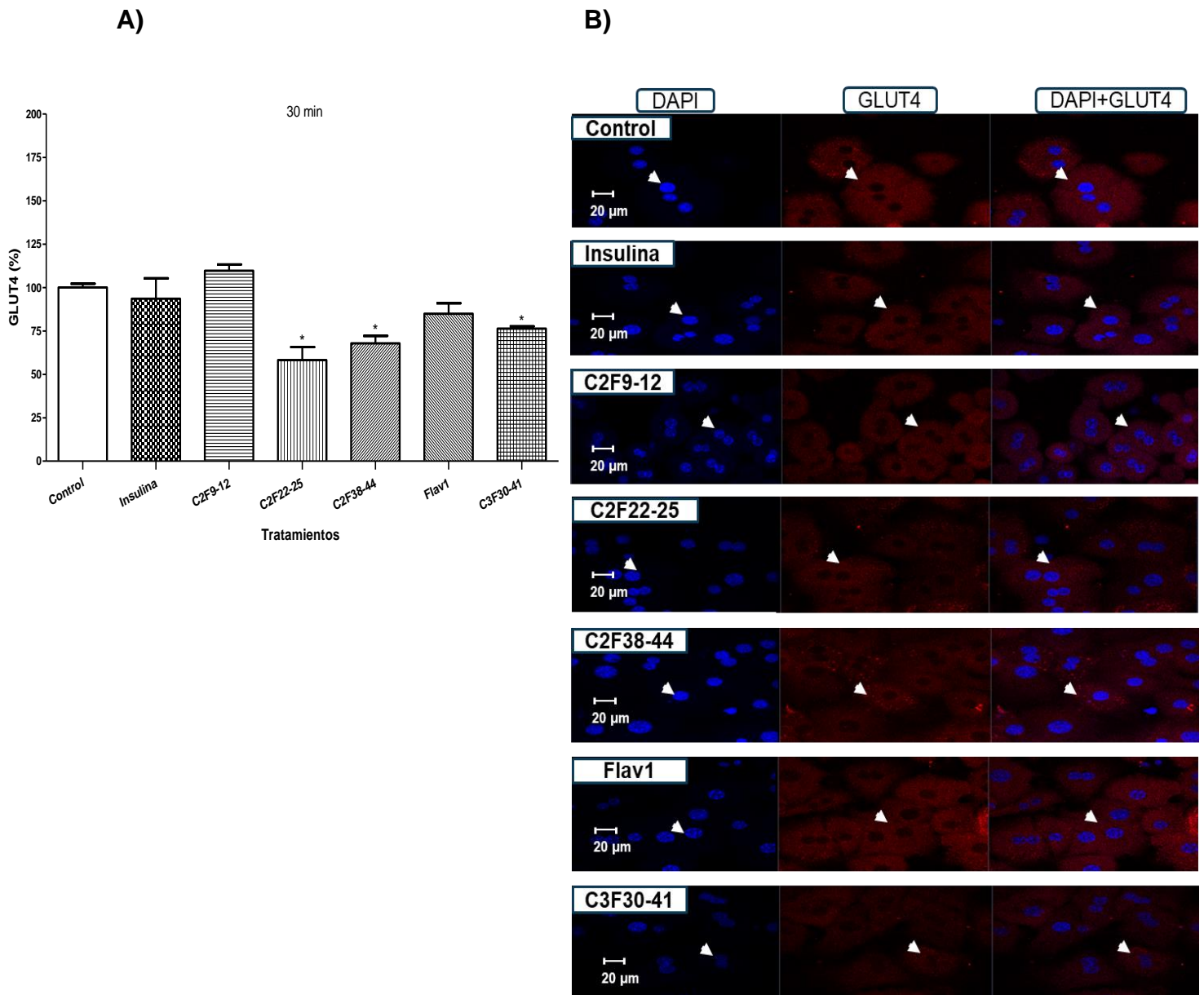
Los resultados mostraron un efecto similar sobre GLUT4 en hepatocitos primarios con el tratamiento de las fracciones y Flav1 durante los 15 min. Se observó un incremento significativo de GLUT4 en un 61 y 34% con el tratamiento de C2F38-44 y Flav1, respecto al grupo control, similar al tratamiento con insulina (36%). Por otro lado, la fracción C2F22-25 disminuyó la translocación de GLUT4, mientras que la fracción C2F9-12 incrementó GLUT4 (23%), pero no fue estadísticamente significativo, respecto al control (Figura 22).



**Figura 22.** Translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios a 15 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 15 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) (10  $\mu\text{g/ml}$ ), Flav1 (25.6  $\mu\text{M}$ ) e insulina (100 nM). B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 30 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 e insulina (40x). Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en

color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20  $\mu\text{m}$ ). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. ( $n=3$ ).

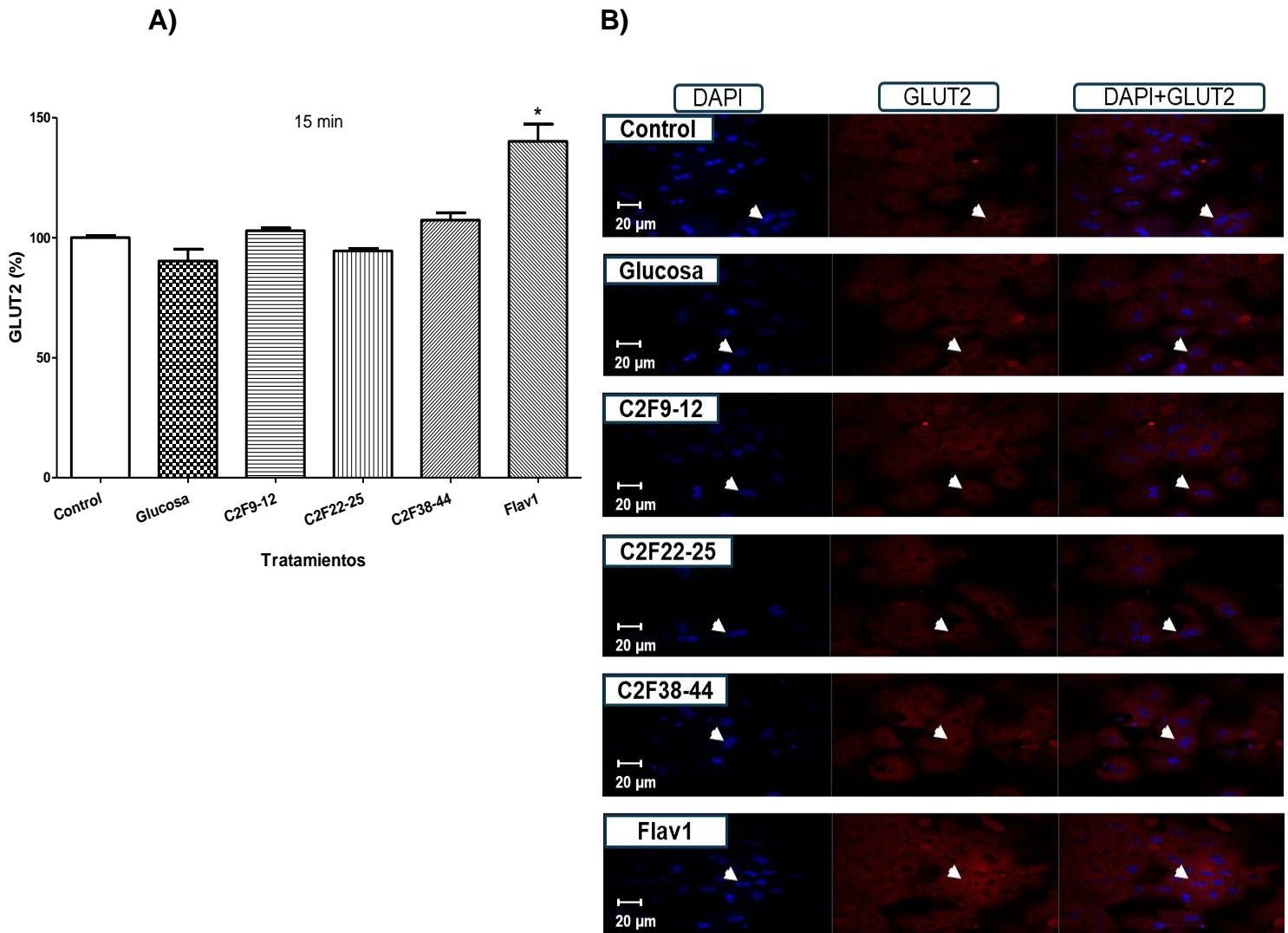
El tratamiento con C2F9-12, Flav1 e insulina no presentaron efecto sobre GLUT4 durante los 30 min. Sin embargo, C2F22-25, C2F38-44 y C3F30-41 disminuyeron significativamente la movilización de GLUT4 en 42, 32 y 33%, respectivamente (Figura 23).



**Figura 23.** Translocación de GLUT4 en hepatocitos primarios a 30 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 30 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41) (10 µg/ml), Flav1 (25.6 µM) e insulina (100 nM). B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 30 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 e insulina (40x). Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20 µm). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=3).

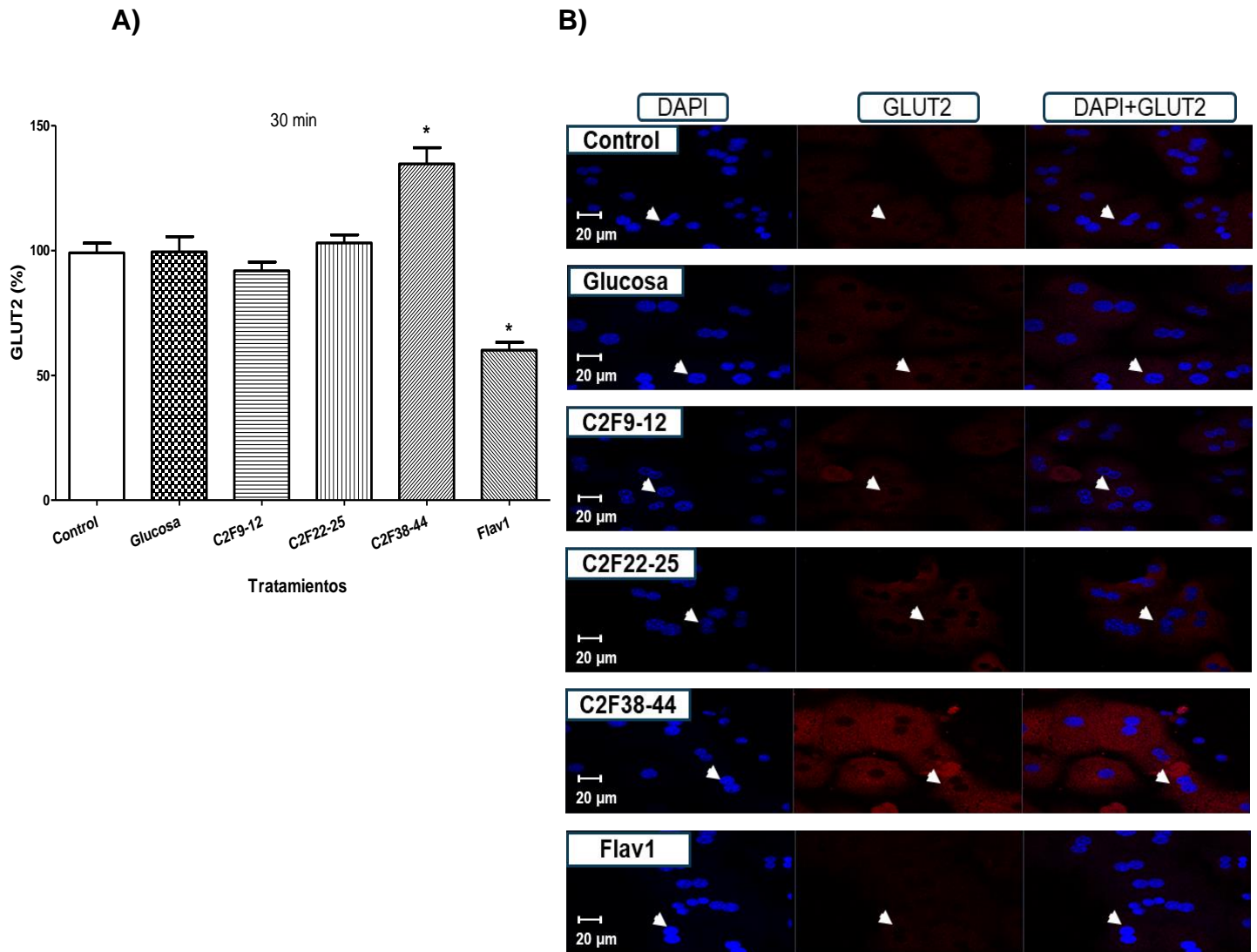
### **10.8.3. Inmunodetección de GLUT2 en hepatocitos primarios por microscopía confocal**

El ensayo de inmunofluorescencia para GLUT2, mostró que Flav1 durante los 15 min de tratamiento en hepatocitos primarios, incrementó la translocación de GLUT2 de manera significativa (40%), respecto al grupo control. Sin embargo, ninguna de las fracciones (C2F9-12, C2F22-25 y C2F38-44) mostró efecto sobre GLUT2 (Figura 24).



**Figura 24.** Translocación de GLUT2 en hepatocitos primarios cultivados con 25 mM de glucosa durante 15 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 15 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y Flav1) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y Flav1 ((25.6  $\mu\text{M}$ )). Todos los tratamientos se adicionaron en medio con alta concentración de glucosa. B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 15 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y Flav1 (40x). Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20  $\mu\text{m}$ ). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. ( $n=3$ ).

Por otro lado, el tratamiento con Flav1 a 30 min disminuyó hasta un 39% la translocación de GLUT2 de manera significativa, respecto al grupo control. Mientras que el tratamiento con C2F38-44 generó un incremento del 35% sobre GLUT2, mostrando diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 25).



**Figura 25.** Translocación de GLUT2 en hepatocitos primarios cultivados con 25 mM de glucosa durante 30 min. A) Representación gráfica de la fluorescencia de GLUT4 a los 30 min de tratamiento con las fracciones (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y Flav1) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y Flav1 (25.6  $\mu\text{M}$ ). Todos los tratamientos se adicionaron en medio con alta concentración de glucosa. B) Imágenes de inmunofluorescencia de GLUT4 durante los 30 min de tratamiento con C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y Flav1 (40x).

Las flechas color blanco indican la ubicación de GLUT4 en color rojo (Anticuerpo secundario Anti-GLUT4 acoplado a rodamina) y los núcleos teñidos con DAPI (Azul) (escala de 20  $\mu$ m). \*Diferencia significativa en comparación con el control,  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.M.E. (n=3).

## 11. DISCUSIÓN

*T. usneoides* es una planta que pertenece a la familia Bromeliaceae, ampliamente distribuida en México. Su actividad sobre la glucemia se ha documentado en diferentes modelos experimentales. La obtención y evaluación del extracto acuoso de *T. usneoides* ha mostrado efectos benéficos sobre el metabolismo de glucosa. La administración a diferentes dosis (100, 250 y 500 mg/kg) del extracto acuoso de esta planta disminuyó la glucemia en ratas durante las 4 y 8 h posteriores a su administración (Argueta and Gallardo-Vázquez, 1994; Keller et al., 1981). En otro estudio, se demostró su efecto hipoglucémico a dosis de 100 y 250 mg/kg en ratones con 12 h de ayuno (Espejel-Nava, 2014). Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que el extracto acuoso de *T. usneoides* a dosis de 250 mg/kg disminuye la glucosa en sangre en ratones sanos, tal y como se reportó anteriormente. Este efecto también se observó con la administración de las fracciones TU-AcOEt y TU-Acuoso, mostrando valores glucémicos similares a los observados con glibenclamida.

En la presente investigación también se determinó el efecto antihiper glucémico de las fracciones y el extracto acuoso de *T. usneoides*. Los resultados mostraron un efecto antihiper glucémico de la fracción TU-AcOEt (administración i.g.) y TU-Acuosa (administración i.p.) de *T. usneoides* a partir de los 30 min de tratamiento, similar al efecto generado por metformina. Se ha reportado que el extracto clorofórmico de *T. usneoides* disminuyó el pico hiper glucémico a los 30 min (Giacoman-Martínez, 2015), aunque no se observó efecto a los 60, 90 y 120 min. Se ha establecido que una disminución de glucosa durante el pico inicial podría mejorar los trastornos metabólicos característicos de la DT2 durante sus primeras etapas (Benedé-Ubieto et al., 2020). Los estudios fitoquímicos han contribuido al conocimiento de los componentes presentes en los extractos de plantas. En el caso



de los extractos con polaridad intermedia obtenidos de diferentes plantas, se han observado efectos benéficos sobre la glucemia en modelos murino (Arokiyaraj et al., 2011; Tan and Kim, 2013), similares a los resultados de este estudio, los cuales sugieren que la TU-AcOEt podría contener moléculas activas que pueden mejorar el desequilibrio metabólico generado por la DT2. Debido a que la TU-AcOEt presentó efecto hipoglucémico y antihiperoglucémico en los estudios *in vivo*, se seleccionó para su fraccionamiento químico.

El HMG fue propuesto como el principio activo de *T. usneoides* debido a que mostró disminución significativa de la glucemia a dosis de 125 y 250 mg/kg en ratones sanos (Witherup et al., 1995). En contraste, en el presente estudio el HMG incrementó la glucemia a dosis de 250 mg/kg. Se ha observado que la administración de diferentes moléculas puede producir incrementos de la glucemia en ratones sanos, atribuyendo este efecto al estrés producido en los animales, tal y como se ha mencionado por Witherup et al. (1995). Así, una dosis alta de HMG podría inducir irritación en los ratones y activar vías involucradas en la degradación del glucógeno a nivel hepático. De esto se puede deducir que la participación del HMG como única molécula responsable del efecto sobre la glucemia de *T. usneoides* es incierta. Algunos estudios han relacionado un incremento de HMG en la fisiopatología de la diabetes, ya que se ha encontrado que el contenido de HMG aumenta en orina de pacientes y ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. También, se ha observado que la administración de HMG a corto y largo plazo en ratas induce peroxidación lipídica, activación de caspasa-3, inhibición de la enzima glutatión peroxidasa y un incremento de especies reactivas de oxígeno, generando daño neurotóxico (da Rosa et al., 2020; Deana et al., 1982). Dado que el HMG se ha asociado con trastornos en el estado redox, es posible que *T. usneoides* contenga otros componentes que mejoren la glucemia sin los efectos adversos del HMG.

El fraccionamiento de TU-AcOEt resultó en cinco fracciones (C1F1-C1F5). Los resultados mostraron que C1F3 disminuyó significativamente la glucemia, similar al efecto de la metformina. La hiperglucemia en personas con DT2 se puede asociar

con un incremento de la gluconeogénesis hepática. Se ha encontrado que la activación de Akt inhibe la actividad de FoxO1 (factores de transcripción Forkhead), disminuyendo la transcripción de PEPCK y G6Pase, inhibiendo la gluconeogénesis hepática. Por lo tanto, una disminución en la actividad de FoxO1 durante la RI se considera un objetivo terapéutico de interés (Hatting et al., 2018). Algunos fármacos como la metformina inhiben la gluconeogénesis hepática a través de una disminución de las concentraciones de ATP y un incremento de los niveles de AMP. Niveles altos de AMP incrementan la actividad de AMPK y disminuyen la activación de la PKA (proteína cinasa A), mediante el bloqueo de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc. Se ha demostrado que el tratamiento con metformina inhibe la fosforilación de FoxO1 (Ser273) mediada por PKA a través de la activación de AMPK. Los problemas metabólicos durante la RI están asociados con hiperglucemia crónica (Guo et al., 2021; Huang et al., 2018). En este sentido, la fracción C1F3 podría contener compuestos que activan vías similares a metformina, incrementando la sensibilidad a la insulina e inhibiendo la gluconeogénesis hepática mediada por FoxO1, lo cual debe ser evaluado en estudios futuros.

Para determinar si la disminución de la glucemia en los ratones podría deberse a la actividad de enzimas intestinales, se realizó una prueba de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* e *in vivo*. Estas enzimas se encuentran en las microvellosidades de las células del intestino delgado y participan en la degradación de carbohidratos complejos a monosacáridos para su absorción, a través de la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos. En individuos sanos, estas enzimas controlan la digestión de carbohidratos. Sin embargo, en pacientes con DT2 se ha asociado con un incremento en la actividad de estas enzimas, lo que conduce a la hiperglucemia posprandial (Abbas et al., 2017; Mugaranja and Kulal, 2020). Nuestros resultados mostraron que C1F3 tiene efecto sobre la actividad de estas enzimas, similar al tratamiento con acarbosa. Debido a que el tratamiento con acarbosa se asocia con efectos adversos en pacientes con DT2, algunos estudios con extractos y fracciones de diferentes plantas, mostraron disminución de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasas (Ali et al., 2013; Mugaranja and Kulal, 2020). Otro estudio mostró que una de las fracciones con mayor actividad sobre la inhibición de

$\alpha$ -glucosidasas fue la fracción de acetato de etilo, ya que su contenido de compuestos fenólicos fue más alto en comparación con otras fracciones (Olaokun et al., 2016). Estos datos corroboran los resultados de nuestro estudio, ya que la fracción C1F3 proviene de la TU-AcOEt y, contiene compuestos de naturaleza fenólica, como se muestra en la CCF. Por lo tanto, la actividad de C1F3 sobre estas enzimas es un resultado prometedor que debe ser explorado en estudios posteriores.

El análisis fitoquímico de C1F3 mostró la presencia de Flav1, un flavonoide que se informó anteriormente para *T. usneoides* en estado libre y en su forma glicosilada (Williams, 1978; Witherup et al., 1995). La determinación estructural se evaluó por MS y NMR, donde la relación carga/masa de Flav1 exhibió un ion molecular de 391.21. Dentro de los picos más representativos en el espectro de RMN, se encuentran cuatro señales para protones (3.76, 3.82, 3.84 y 3.86) que corresponden a cuatro grupos metoxilo en C-3, C-6, C-3' y C-5', mientras que la posición de los grupos hidroxilo se asignaron en C-5, C-7 y C-4'. En este estudio, la m/z y los desplazamientos químicos de Flav1 tuvieron valores muy similares a los reportados previamente (Lewis and Mabry, 1976). Por lo tanto, los análisis espectrales apoyan la idea de que Flav1 está presente en C1F3. Sin embargo, debido a las propiedades farmacológicas que tiene esta planta sobre la glucemia, es necesario investigar si Flav1 puede ser una molécula clave que ayude a corregir el desequilibrio metabólico generado por la DT2, lo que se deberá explorar en futuros estudios.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de origen vegetal y son productos biológicamente activos del metabolismo secundario de las plantas. Su principal función es proporcionar una barrera contra la radiación ultravioleta y producir pigmentación que ayuda al color de las flores. Su estructura química está formada por dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo heterocíclico (C). Dependiendo del grado de oxidación de este anillo, se pueden clasificar en: flavonoles, flavan-3-oles, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y flavonas (Neri-Numa et al., 2020; Russo et al., 2019). Aunque estos compuestos se encuentran en frutas, cereales y vegetales, no se consideran nutrientes importantes para el

consumo humano, sin embargo, se les han atribuido diferentes propiedades bioactivas contra diferentes enfermedades crónicas, incluido el cáncer y la DT2. Muchos estudios han demostrado que la ingesta de flavonoides produce efectos benéficos sobre el metabolismo de glucosa, la actividad inhibidora de las  $\alpha$ -glucosidasas que previenen la absorción intestinal de carbohidratos, la hiperglucemia posprandial y la secreción de insulina (Aryaeian et al., 2017; Proença et al., 2017; Testa et al., 2016). También, el tratamiento con diferentes flavonoides mejora la captación y almacenamiento de glucosa en tejidos sensibles a la insulina (Saadeldeen et al., 2020).

En músculo esquelético, la insulina promueve la captación de glucosa en el estado posprandial. Aproximadamente el 80% de la glucosa disponible se absorbe en este tejido para su oxidación y su almacenamiento en glucógeno. En pacientes con RI la captación de glucosa disminuye notablemente en este tejido (DeFronzo and Tripathy, 2009). Por otro lado, el hígado es uno de los principales órganos susceptibles a la hiperglucemia producida durante la RI, su participación involucra el mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre. Los hepatocitos son las principales células que conforman al hígado, su estimulación con insulina suprime la glucogenólisis y la gluconeogénesis, a través de la activación de Akt. Sin embargo, durante la RI se produce un estado de hiperglucemia por el incremento de estas vías metabólicas (Hanhineva et al., 2010; Russo et al., 2019). Los estudios científicos se han centrado en la determinación de marcadores moleculares, a través del uso de diferentes modelos celulares, esto con la finalidad de establecer moléculas con actividad antidiabética. En este sentido, las células C2C12 y los hepatocitos primarios de ratón podrían aportar información importante del efecto de las fracciones y Flav1 sobre moléculas implicadas en el control de la glucemia.

La glucosa es un nutriente importante para la formación de energía en los diferentes tejidos. Sin embargo, un estado de hiperglucemia en pacientes con DT2 puede desencadenar complicaciones macro y microvasculares a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de mediadores inflamatorios, generando daño a macromoléculas importantes, incluidas proteínas,

lípidos y ADN (Tangvarasittichai, 2015). También, el exceso de glucosa en músculo esquelético e hígado produce RI. Sin embargo, en hígado puede desencadenar estados de fibrosis, cirrosis, hepatitis y un desorden en el almacenamiento de glucógeno, debido a la producción excesiva de ácidos grasos en este órgano. La inactivación de enzimas antioxidantes como SOD (superóxido dismutasa), GPX (glutación peroxidasa) y CAT (catalasa), producto de la hiperglucemia, conduce al estrés oxidante en la célula (Affourtit, 2016; Oguntibeju, 2019). Algunos estudios *in vitro* han documentado que el incremento de glucosa inhibe la proliferación, a través de la activación de proteínas apoptóticas (Buranasin et al., 2018). Se ha observado que el tratamiento con antioxidantes no enzimáticos de origen vegetal, como los flavonoides y compuestos fenólicos, incrementan la captación y eliminación de ROS en modelos *in vitro* e *in vivo* (Alkhalidy et al., 2018), lo que sugiere un importante papel de estos compuestos en la modulación de ROS durante la hiperglucemia.

Para estudiar el efecto de las fracciones y Flav1 sobre la viabilidad en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios, se realizó una prueba de rojo neutro. Con la finalidad de asemejar las condiciones que se presentan durante la DT2, un estado de alta glucosa (25 mM) se indujo en ambas líneas celulares. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con las fracciones (C2-F9-12, C2F22-25, C2F38-44 y C3-F30-41) y Flav1 a concentraciones bajas (0.5-50 µg/ml) no afectaron la viabilidad en células C2C12 y hepatocitos primarios con glucosa baja (5.5 mM). Con glucosa alta (25 mM), ambas líneas fueron más susceptibles a la hiperglucemia inducida con el tratamiento de las fracciones y Flav1, disminuyendo significativamente la viabilidad. Algunos flavonoides han mostrado mejores efectos sobre la viabilidad a dosis bajas en mioblastos C2C12 y cultivo primario de hepatocitos de rata en condiciones hiperglucémicas. Así mismo, el tratamiento con flavonoides incrementó la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y SOD, disminuyendo la concentración de ROS y la actividad de proteínas apoptóticas (Ahangarpour et al., 2018; Kapoor and Kakkar, 2012). De acuerdo con nuestros resultados y con lo reportado anteriormente, concentraciones bajas de las fracciones y Flav1 podrían disminuir el estrés oxidante producido por la alta glucosa, mejorando la viabilidad

celular e incrementando la actividad antioxidante. Por lo tanto, el estudio de los posibles efectos antioxidantes de Flav1 debe considerarse en futuros estudios.

La insulina promueve la activación de la vía PI3K/Akt, facilitando la captación de glucosa en músculo esquelético a través de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Se sabe que durante la RI se produce baja expresión y una translocación alterada de GLUT4, factor que contribuye al desarrollo de intolerancia a la glucosa y DT2 (Russo et al., 2019). Aunque la translocación de GLUT4 se produce principalmente en músculo esquelético, la participación de GLUT4 en hígado se ha asociado con efectos positivos en enfermedades hepáticas, atenuando los efectos producidos por la RI en este tejido (Kim et al., 2014; Tong et al., 2018). Por lo tanto, el estudio de las fracciones y Flav1 sobre los mecanismos moleculares que regulan a GLUT4 en estos tejidos puede contribuir al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas. Esto indica que GLUT4 puede ser considerado como un objetivo terapéutico importante para el control de la DT2.

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado el efecto de los flavonoides sobre la translocación de GLUT4 y su participación en la homeostasis de la glucosa. Se sabe que la translocación de GLUT4 en músculo esquelético puede depender de la activación de AMPK y la vía de la insulina. AMPK es un complejo proteínico compuesto por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), su activación promueve la translocación de GLUT4 a la membrana, tal y como se ha reportado con el tratamiento de quercetina y tangeretina en miotubos L6 y C2C12 (Jiang et al., 2019; Kim et al., 2012). Por otro lado, un estudio en ratas a las que se les indujo diabetes experimental mostró que el tratamiento con rutina incrementó la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa en músculo soleo, atribuyendo este efecto a la activación de la vía PI3K/Akt (Kappel et al., 2013). Nuestros resultados mostraron que C2F9-12, C2F38-44 y Flav1 aumentaron la translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 a 15 y 30 min, lo que indica que Flav1 y las fracciones podrían regular la activación de AMPK o la vía PI3K/Akt, incrementando el tráfico vesicular de GLUT4.

Por otra parte, el análisis de inmunofluorescencia en hepatocitos primarios mostró un incremento de GLUT4 con el tratamiento de C2F38-44 y Flav1. Aunque se sabe poco del mecanismo regulador de GLUT4 en esta línea, Kim *et al.* (2014) demostraron que la expresión y translocación de GLUT4 en hepatocitos disminuyó la esteatosis y fibrosis hepática en ratones ob/ob (Kim *et al.*, 2014). Una de las vías más estudiada es la vía IRS-1/Akt; su activación promueve la movilización de GLUT4 de compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática (Hanhineva *et al.*, 2010). Esto se relaciona con lo reportado por Tong *et al.* (2018), donde la fosforilación de IRS-1 (Ser307) y Akt (Ser473) provocó niveles elevados de GLUT4 en la membrana plasmática de células HepG2 (Tong *et al.*, 2018). También, un incremento en la translocación de GLUT4 y actividad de IRS en células HepG2 atenuó los efectos producidos por la RI (Li *et al.*, 2015). Un mecanismo adicional que contribuye a la RI es la disminución del glucógeno hepático. Se ha establecido que un mayor almacenamiento de glucógeno en hígado mejora la tolerancia a la glucosa (Irimia *et al.*, 2017). Algunos flavonoides ejercen sus efectos sobre el almacenamiento de glucógeno a través de la activación de PI3K, Akt y GS, mejorando la sensibilidad a la insulina (Cordero-Herrera *et al.*, 2013; Eid *et al.*, 2015).

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado anteriormente, ya que brindan información importante del papel regulador de las fracciones y Flav1 sobre el posible mecanismo de GLUT4, lo cual sugiere que Flav1 podría modular proteínas importantes que ayuden a mejorar el metabolismo de carbohidratos, aumentando la captación y almacenamiento de glucosa a través de la vía IRS-1/Akt o AMPK en ambas líneas celulares. Sin embargo, son necesarios más estudios que ayuden a dilucidar la participación de Flav1 sobre GLUT4 para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas contra la DT2.

Un mecanismo adicional que participa en la absorción de glucosa a nivel hepático involucra la actividad de GLUT2. Su expresión y translocación se produce en gran medida en hepatocitos, controlando el flujo bidireccional de glucosa en estas células (Chunodom *et al.*, 2020). Los resultados del presente estudio indican un aumento en

la translocación de GLUT2 durante los 15 min con el tratamiento de Flav1, mientras que a 30 min disminuyó el efecto sobre GLUT2. Aunque no se ha establecido un mecanismo regulador para GLUT2 en hepatocitos, se ha determinado en modelos diabéticos murinos un menor contenido de glucógeno hepático y una menor expresión de GLUT2. Se ha observado que el tratamiento con flavonoides favoreció el contenido de glucógeno en hígado y un incremento en la expresión de GLUT2, disminuyendo la gluconeogénesis a través de la inhibición de G6Pasa y PEPCK (Jayachandran et al., 2018; Mokashi et al., 2017). También, se ha demostrado que niveles altos de glucosa (33 mM) disminuyeron los niveles de proteína GLUT2 y Akt en células FL83B, mientras que el tratamiento con rutina y quercetina bajo estas condiciones promovieron niveles altos de proteína GLUT2, AMPK y Akt, lo cual favoreció la captación de glucosa (Lee et al., 2012).

Aunque no se evaluó la expresión ni los niveles de proteína GLUT2 en este estudio, es probable que la alta concentración de glucosa promueva una inhibición en la translocación de GLUT2 a la membrana de los hepatocitos, tal y como se observa con el tratamiento de glucosa (25 mM). De acuerdo con estos resultados y con lo reportado anteriormente, Flav1 podría modular el estrés metabólico producido por el incremento de glucosa, aumentando la translocación de GLUT2 y mejorando la captación de glucosa. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan a GLUT2 en hepatocitos deberían explorarse en futuros estudios.

Finalmente, la actividad antihiper glucémica en los estudios *in vivo* podría deberse al contenido de Flav1 (57.31 mg/g) en TU-AcOEt. Además, en nuevos estudios es necesario identificar los compuestos presentes en C2F9-12, debido a su actividad sobre GLUT4 en células C2C12. Actualmente, no se conoce evidencia del efecto de las fracciones y Flav1 sobre GLUT2 y GLUT4 en estas líneas celulares. Dichas propiedades podrían aportar nuevo conocimiento del mecanismo de acción de *T. usneoides*. Este trabajo representa una aproximación de la función reguladora de los flavonoides sobre el metabolismo de glucosa. Sin embargo, el estudio del efecto de las fracciones y Flav1 sobre las vías reguladoras de GLUT2 y GLUT4 en ambas



líneas celulares es obligatorio en futuras investigaciones, buscando proponer nuevas moléculas terapéuticas para el tratamiento de la DT2.

## 12. CONCLUSIONES

- Las fracciones (TU-AcOEt y TU-Acuoso) y el extracto acuoso de *T. usneoides* mostraron efecto hipoglucémico, mientras que la fracción TU-AcOEt y TU-Acuosa mostraron efecto antihiperoglucémico. El HMG no mostró efecto sobre la glucemia.
- La C1F1 y C1F3 presentaron efecto antihiperoglucémico, lo cual puede deberse al contenido de Flav1 en C1F3, lo cual podría explicar el efecto sobre la glucemia en los modelos *in vivo*.
- Las fracciones C2F9-12, C2F38-44 y Flav1 aumentaron la translocación de GLUT4 en mioblastos C2C12 y hepatocitos primarios de ratón. En este contexto, la actividad de Flav1 en la movilización de GLUT4 podría ofrecer ventajas terapéuticas para el control de la DT2.
- Flav1 incrementó la translocación de GLUT2 en hepatocitos primarios. Sin embargo, son necesarios más experimentos para fundamentar el efecto de Flav1 sobre GLUT2.
- Los resultados sustentan las propiedades antidiabéticas de *T. usneoides*. La continuidad en su estudio podría contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la DT2.

## 13. PERSPECTIVAS

- Identificar los compuestos presentes en C1F1 y C2F9-12 mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Estudiar el efecto de Flav1 en modelos diabéticos murinos para contribuir al desarrollo de nuevas moléculas bioactivas para el control de la DT2.
- Evaluar el efecto de Flav1 sobre el contenido de glucógeno en modelos *in vitro*.
- Evaluar el efecto de Flav1 sobre la movilización de GLUT2 a diferentes tiempos bajo condiciones hiperoglucémicas.

- Determinar si el efecto de Flav1 sobre la translocación de GLUT2 y GLUT4 está relacionado con la activación de la vía PI3K/Akt.
- Realizar un estudio de docking molecular para conocer las interacciones químicas de Flav1 sobre mediadores de la vía de la insulina.

#### 14. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, Q., Hassan, M., Raza, H., Kim, S.J., Chung, K.W., Kim, G.H., Seo, S.Y., 2017. *In vitro*, *in vivo* and *in silico* anti-hyperglycemic inhibition by sinigrin. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.019>
- Abdi, H., Azizi, F., Amouzegar, A., 2018. Insulin monotherapy versus insulin combined with other glucose-lowering agents in type 2 diabetes: A narrative review. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 16, e65600. <https://doi.org/10.5812/ijem.65600>
- ADA, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 37, S81–S90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Adeva-Andany, M.M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., Ameneiros-Rodríguez, E., 2016. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 5, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- Affourtit, C., 2016. Mitochondrial involvement in skeletal muscle insulin resistance : A case of imbalanced bioenergetics. *BBA-Bioenergetics.* 1857, 1678–1693. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.07.008>
- Ahangarpour, A., Oroojan, A.A., Khorsandi, L., Kouchak, M., Badavi, M., 2018. Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12 cell. *Cell Stress Chaperones.* 23, 773–781. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0888-z>
- Ainuddin, J., Karim, N., Hasan, A.A., Naqvi, S.A., 2015. Metformin versus insulin treatment in gestational diabetes in pregnancy in a developing country. A

randomized control trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 107, 290–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.10.001>

Ali, R.B., Atangwho, I.J., Kuar, N., Ahmad, M., Mahmud, R., Asmawi, M.Z., 2013. *In vitro* and *in vivo* effects of standardized extract and fractions of *Phaleria macrocarpa* fruits pericarp on lead carbohydrate digesting enzymes. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-39>

Alkhalidy, H., Wang, Y., Liu, D., 2018. Dietary flavonoids in the prevention of T2D: An overview. *Nutrients.* 10, 438. <https://doi.org/10.3390/nu10040438>

Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., Agaimy, A., Marienhagen, J., Weiss, T.S., Stoeltzing, O., Warnecke, C., Schölmerich, J., Oefner, P.J., Kreutz, M., Bosserhoff, A.K., Hellerbrand, C., 2009. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* 174, 1544–1552. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080596>

Apovian, C., 2011. Management of diabetes across the course of disease: minimizing obesity-associated complications. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 4, 353–369. <https://doi.org/10.2147/dmso.s24022>

Argueta, A., Gallardo-Vázquez, M.C., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, Ciudad de México, pp. 732–733.

Arokiyaraj, S., Balamurugan, R., Augustian, P., 2011. Antihyperglycemic effect of *Hypericum perforatum* ethyl acetate extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1, 386–390. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60085-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60085-3)

Aryaeian, N., Sedehi, S.K., Arablou, T., 2017. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 31, 886–892. <https://doi.org/10.14196/mjiri.31.134>

Baci, Y., Üstüner, I., Keskin, H.L., Ersoy, R., Avşar, A.F., 2013. Effect of maternal obesity and weight gain on gestational diabetes mellitus. *Gynecol. Endocrinol.*

29, 133–136. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.730571>

Bazotte, R.B., Silva, L.G., Schiavon, F.P.M., 2014. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle*. 13, 2494–2500.

<https://doi.org/10.4161/15384101.2014.947750>

Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., Canbay, A., 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol*. 56, 952–964.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>

Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F.J., Nevzorova, Y.A., 2020. Guidelines and considerations for metabolic tolerance tests in mice. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther*. 13, 439–450.

<https://doi.org/10.2147/DMSO.S234665>

Black, C., Donnelly, P., McIntyre, L., Royle, P.L., Shepherd, J.P., Thomas, S., 2007. Meglitinide analogues for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2, CD004654. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004654.pub2>

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett*. 24, 119–124.

[https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)

Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant Sates. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6, a009191.

Buranasin, P., Mizutani, K., Iwasaki, K., Mahasarakham, C.P.N., Kido, D., Takeda, K., Izumi, Y., 2018. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS ONE*. 13, e0201855.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201855>

Chadt, A., Al-Hasani, H., 2020. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch. Eur. J*.

Physiol. 472, 1273–1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>

Chandrashekar, V., Das, S., Seth, K.R., Dattaroy, D., Alhasson, F., Michelotti, G., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Diehl, M.A., Chatterjee, S., 2017. Purinergic receptor X7 mediates leptin induced GLUT4 function in stellate cells in nonalcoholic steatohepatitis. HHS Public Access. 1862, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.009>. Purinergic

Chavez, J.A., Roach, W.G., Keller, S.R., Lane, W.S., Lienhard, G.E., 2008. Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. 283, 9187–9195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708934200>

Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes Res. Clin. Pract. 138, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>

Chunudom, L., Thongsom, M., Karim, N., Rahman, M.A., Rana, M.N., Tangpong, J., 2020. *Tithonia diversifolia* aqueous fraction plays a protective role against alloxan-induced diabetic mice via modulating GLUT2 expression. South African J. Bot. 133, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.007>

Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., López-Reyes, A., Domínguez-Pérez, M., Nuño, N., Domínguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Gómez-Quiroz, L.E., 2013. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. Biochimie. 95, 1177–1184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.005>

Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2013. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via Akt and AMPK in HepG2 cells. Mol. Nutr. Food Res. 57, 974–985.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201200500>

da Rosa, M.S., da Rosa-Junior, N.T., Parmeggiani, B., Glänzel, N.M., de Moura Alvorcem, L., Ribeiro, R.T., Grings, M., Wajner, M., Leipnitz, G., 2020. 3-hydroxy-3-methylglutaric acid impairs redox and energy homeostasis, mitochondrial dynamics, and endoplasmic reticulum–mitochondria crosstalk in rat brain. *Neurotox. Res.* 37, 314–325. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00122-x>

da Silva Rosa, S.C., Nayak, N., Caymo, A.M., Gordon, J.W., 2020. Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiol. Rep.* 8, e14607. <https://doi.org/10.14814/phy2.14607>

Davidson, M.A., Mattison, D.R., Azoulay, L., Krewski, D., 2017. Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. *Crit. Rev. Toxicol.* 48, 52–108. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1351420>

Deana, R., Lippe, G., Galzigna, L., 1982. Urinary excretion of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid in the diabetic condition. *Clin. Biochem.* 15, 73–75. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(82\)90832-3](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(82)90832-3)

DeFronzo, R.A., Tripathy, D., 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care.* 32, S157–S163. <https://doi.org/10.2337/dc09-s302>

Deng, M., Xiao, X., Zhou, L., Wang, T., 2019. First case report of maturity-onset diabetes of the young type 4 pedigree in a Chinese family. *Front. Endocrinol.* 10, 406. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00406>

Derek, M.E., Gerald, I. S., 2010. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 16, 400–402. <https://doi.org/10.1038/nm0410-400>. Diacylglycerol-mediated

Devendra, D., Liu, E., Eisenbarth, G.S., 2004. Type 1 diabetes: Recent

developments. Br. Med. J. 328, 750–754.

<https://doi.org/10.1136/bmj.328.7442.750>

Eid, H.M., Nachar, A., Thong, F., Sweeney, G., Haddad, P.S., 2015. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. Pharmacogn. Mag. 11, 74–81. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149708>

Espejel-Nava, A.J., 2014. Efecto de *Tillandsia usneoides* Linneo sobre la síntesis y secreción de insulina en células RINm5F. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. <http://148.206.53.233/tesiuami/UAMI16671.pdf>.

Estrella-Parra, E., Flores-Cruz, M., Blancas-Flores, G., Koch, S.D., Alarcón-Aguilar, F.J., 2019. The *Tillandsia* genus: History, uses, chemistry, and biological activity. BLACPMA. 18, 239–264. <https://doi.org/10.37360/BLACPMA.19.18.3.16>

Fazakerley, D.J., Krycer, J.R., Kearney, A.L., Hocking, S.L., James, D.E., 2019. Muscle and adipose tissue insulin resistance: Malady without mechanism? J. Lipid Res. 60, 1720–1732. <https://doi.org/10.1194/jlr.R087510>

Filion, K.B., Douros, A., Azoulay, L., Yin, H., Yu, O.H., Suissa, S., 2019. Sulfonylureas as initial treatment for type 2 diabetes and the risk of adverse cardiovascular events: A population-based cohort study. Br. J. Clin. Pharmacol. 85, 2378–2389. <https://doi.org/10.1111/bcp.14056>

Foster, D.A., 2007. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? Cancer Res. 67, 1–4. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3016>

Garth, R.E., 1964. The ecology of spanish moss (*Tillandsia usneoides*): Its growth and distribution. Ecology. 45, 470–481. <https://doi.org/10.2307/1936100>

Giacoman-Martínez, A., 2015. Extractos de *Hibiscus sabdariffa* L., *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob and Brettell y *Tillandsia usneoides* L. como

posibles agonistas duales de PPARs. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.  
<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16871&docs=UAMI16871.pdf>.

Guo, X., Li, X., Yang, W., Liao, W., Shen, J.Z., Ai, W., Pan, Q., Sun, Y., Zhang, K., Zhang, R., Qiu, Y., Dai, Q., Zheng, H., Guo, S., 2021. Metformin targets foxo1 to control glucose homeostasis. *Biomolecules*. 11, 873.

<https://doi.org/10.3390/biom11060873>

Hameed, I., Masoodi, S.R., Mir, S.A., Nabi, M., Ghazanfar, K., Ganai, B.A., 2015. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J. Diabetes*. 6, 598–612. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i4.598>

Han, H.S., Kang, G., Kim, J.S., Choi, B.H., Koo, S.H., 2016. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp. Mol. Med*. 48, e218.

<https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci*. 11, 1365–1402.

<https://doi.org/10.3390/ijms11041365>

Hatting, M., Tavares, C.D.J., Sharabi, K., Rines, A.K., Puigserver, P., 2018. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1411, 21–35.

<https://doi.org/10.1111/nyas.13435>

Hernandez-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaria, L., Roman-Ramos, R., Chavez-Miranda, A.A., Garcia-Vega, L.M., Flores-Saenz, J.L., Alarcon-Aguilar, F.J., 2002. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 45, 118–124.

Hoimark, L., Laursen, T., Rungby, J., 2012. Potential role of linagliptin as an oral once-daily treatment for patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Metab. Syndr*.



Obes. Targets Ther. 5, 295–302. <https://doi.org/10.2147/dms0.s16288>

Hornung-Leoni, C.T., 2011. Avances sobre usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. BLACPMA. 10, 297–314.

Huang, X., Liu, G., Guo, J., Su, Z., 2018. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. Int. J. Biol. Sci. 14, 1483–1496.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>

Irimia, J.M., Meyer, C.M., Segvich, D.M., Surendran, S., Depaoli-Roach, A.A., Morral, N., Roach, P.J., 2017. Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice. J. Biol. Chem. 292, 10455–10464.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786525>

Jayachandran, M., Zhang, T., Ganesan, K., Xu, B., Chung, S.S.M., 2018. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. Eur. J. Pharmacol. 829, 112–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.015>

Jensen, J., Rustad, P.I., Kolnes, A.J., Lai, Y.C., 2011. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. Front. Physiol. 2, 112. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00112>

Jiang, H., Yamashita, Y., Nakamura, A., Croft, K., Ashida, H., 2019. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. Sci. Rep. 9, 1–15.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38711-7>

Kapoor, R., Kakkar, P., 2012. Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes. PLoS ONE. 7, e41663.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041663>

Kappel, V.D., Cazarolli, L.H., Pereira, D.F., Postal, B.G., Zamoner, A., Reginatto,

- F.H., Silva, F.R.M.B., 2013. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1179–1186. <https://doi.org/10.1111/jphp.12066>
- Karim, S., Adams, D.H., Lalor, P.F., 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J. Gastroenterol.* 18, 6771–6781. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i46.6771>
- Keller, W.J., Bourn, W.M., Bonfiglio, J.F., 1981. A folk medicine for diabetes mellitus. *Pharm. Biol.* 19, 49–51. <https://doi.org/10.3109/13880208109070574>
- Kelly, D.P., 2001. The pleiotropic nature of the vascular PPAR gene regulatory pathway. *Circ. Res.* 89, 935–937. <https://doi.org/10.1161/res.89.11.935>
- Kharroubi, A.T., Darwish, H.M., 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes.* 6, 850–867. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
- Kim, M.S., Hur, H.J., Kwon, D.Y., Hwang, J.T., 2012. Tangeretin stimulates glucose uptake via regulation of AMPK signaling pathways in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in high-fat diet-induced obese mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.013>
- Kim, S., Jung, J., Kim, H., Heo, R.W., Yi, C.O., Lee, J.E., Jeon, B.T., Kim, W.H., Hahm, J.R., Roh, G.S., 2014. Exendin-4 improves nonalcoholic fatty liver disease by regulating glucose transporter 4 expression in *ob/ob* mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18, 333–339. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.333>
- Lacombe, V.A., 2014. Expression and Regulation of Facilitative Glucose Transporters in Equine Insulin-Sensitive Tissue: From Physiology to Pathology. *ISRN Vet. Sci.* 2014, 409547. <https://doi.org/10.1155/2014/409547>
- Laguna-Hernández, G., Río-Zamorano, C.A., Meneses-Ochoa, I.G., Brechú-Franco, A.E., 2017. Histochemistry and immunolocalisation of glucokinin in

- antidiabetic plants used in traditional Mexican medicine. *Eur. J. Histochem.* 61, 125–134. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2782>
- Lee, C.C., Hsu, W.H., Shen, S.R., Cheng, Y.H., Wu, S.C., 2012. *Fagopyrum tataricum* (*Buckwheat*) improved high-glucose-induced insulin resistance in mouse hepatocytes and diabetes in fructose-rich diet-induced mice. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 375673. <https://doi.org/10.1155/2012/375673>
- Lee, J.H., Jo, J., Hardikar, A.A., Periwal, V., Rane, S.G., 2010. Cdk4 regulates recruitment of quiescent  $\beta$ -cells and ductal epithelial progenitors to reconstitute  $\beta$ -cell mass. *PLoS ONE.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008653>
- Lee, J.Y., Cho, Y., Lee, M., Lee, Y.H., Lee, B.W., Kang, E.S., Cha, B.S., 2017. Clinical efficacy of the novel thiazolidinedione lobeglitazone in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 44, 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.11.005>
- Leguisamo, N.M., Lehnen, A.M., Machado, U.F., Okamoto, M.M., Markoski, M.M., Pinto, G.H., Schaan, B.D., 2012. GLUT4 content decreases along with insulin resistance and high levels of inflammatory markers in rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc. Diabetol.* 11, 100. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-100>
- Leturque, A., Brot-Laroche, E., Le Gall, M., 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 296, E985–E992. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00004.2009>
- Lewis, D.S., Mabry, J.T., 1976. 3,6,3',5'-Tetramethoxy-5,7,4'-Trihydroxyflavone from *Tillandsia usneoides*. *Phytochemistry.* 16, 1115–1116. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86764-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86764-3)
- Li, M., Han, Z., Bei, W., Rong, X., Guo, J., Hu, X., 2015. Oleanolic acid attenuates insulin resistance via NF- $\kappa$ B to regulate the IRS1-GLUT4 pathway in HepG2

cells. eCAM. 2015, 643102. <https://doi.org/10.1155/2015/643102>

Loza-Rodríguez, H., Estrada-Soto, S., Alarcón-Aguilar, F.J., Huang, F., Aquino-Jarquín, G., Fortis-Barrera, A., Giacomani-Martínez, A., Almanza-Pérez, J.C., 2020. Oleanolic acid induces a dual agonist action on PPAR $\gamma$ / $\alpha$  and GLUT4 translocation: A pentacyclic triterpene for dyslipidemia and type 2 diabetes. Eur. J. Pharmacol. 883, 173252. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173252>

MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A., Woodgett, J.R., 2007. Glycogen Synthase Kinase 3 $\alpha$ -Specific Regulation of Murine Hepatic Glycogen Metabolism. Cell Metab. 6, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.013>

Marín-Peñalver, J.J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., Cañizo-Gómez, F.J. del, 2016. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. World J. Diabetes. 7, 354–395. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>

Maslak, E., Gregorius, A., Chlopicki, S., 2015. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. Pharmacol. Reports. 67, 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.010>

Miranda-Núñez, J.E., 2016. Regulación de GLUT2 y GLUT4 en células hepáticas tratadas con el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* Linneo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/asp/am/presentatesis.php?recno=17399&docs=UAMI17399.pdf>.

Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A.H., Zariyantey, A.H., Budin, S.B., 2016. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. Sultan Qaboos Univ. Med. J. 16, e132–e141. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>

Mokashi, P., Bhatt, L.K., Khanna, A., Pandita, N., 2017. Swertisin rich fraction from

Enicostema littorale ameliorates hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat fed diet and low dose streptozotacin induced type 2 diabetes mellitus in rats. Biomed. Pharmacother. 96, 1427–1437.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.153>

Mueckler, M., Thorens, B., 2013. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. Mol. Aspects Med. 34, 121–138.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted

Mugaranja, K.P., Kulal, A., 2020. Alpha glucosidase inhibition activity of phenolic fraction from *Simarouba glauca*: An *in-vitro*, *in-silico* and kinetic study. Heliyon. 6, e04392.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04392>

Nagle, C.A., Klett, E.L., Coleman, R.A., 2009. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. J. Lipid Res. 50, S74–S79.

<https://doi.org/10.1194/jlr.R800053-JLR200>

Narasimhan, A., Chinnaiyan, M., Karundevi, B., 2015. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. Eur. J. Pharmacol. 761, 391–397.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.043>

Neri-Numa, I.A., Cazarin, C.B.B., Ruiz, A.L.T.G., Paulino, B.N., Molina, G., Pastore, G.M., 2020. Targeting flavonoids on modulation of metabolic syndrome. J. Funct. Foods. 73, 104132.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104132>

Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., De Alvaro, C., Lorenzo, M., 2008. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. Diabetes. 57, 3211–3221.

<https://doi.org/10.2337/db07-1062>

Noble, J., Baerlocher, M.O., Silverberg, J., 2005. Management of type 2 diabetes mellitus. Can Fam Physician. 5, 683–687.

Oguntibeju, O.O., 2019. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and

inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 11, 45–63.

Olaokun, O.O., McGaw, L.J., Janse van Rensburg, I., Eloff, J.N., Naidoo, V., 2016. Antidiabetic activity of the ethyl acetate fraction of *Ficus lutea* (*Moraceae*) leaf extract: Comparison of an *in vitro* assay with an *in vivo* obese mouse model. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 110. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1087-z>

Olivares Reyes, J.A., Arellano Plancarte, A., 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev. Educ. bioquímica.* 27, 9–18. <https://doi.org/10.1145/1936254.1936257>

Padhi, S., Nayak, A.K., Behera, A., 2020. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomed. Pharmacother.* 131, 110708. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>

Palma-Tenango, M., Miguel-Chávez, R.S., Soto-Hernández, R.M., 2017. Aromatic and medicinal plants in México. *Aromat. Med. Plants - Back to Nat.* 7, 134–146. <https://doi.org/10.5772/66507>

Pancholia, A.K., 2018. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition for the reduction of cardiovascular events in high-risk patients with diabetes mellitus. *Indian Heart J.* 70, 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.08.022>

Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol. Rev.* 98, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

Pfeiffer, A.F.H., Klein, H.H., 2014. Therapie des diabetes mellitus typ 2. *Dtsch. Arztebl. Int.* 111, 69–82. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0069>

Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E.F.T., Sousa, J.L.C., Tomé, S.M., Ramos, M.J., Silva, A.M.S., Fernandes, P.A., Fernandes, E., 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure–activity

- relationship study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 1216–1228.  
<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503>
- Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., Zamilpa, A., 2012. *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *eCAM.* 2012, 701261. <https://doi.org/10.1155/2012/701261>
- Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., Ray, A., 2009. Glycogen synthase kinase 3: More than a namesake. *Br. J. Pharmacol.* 156, 885–898.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00085.x>
- Reyes-Sanamé, F.A., Pérez-Álvarez, M.L., Alfonso-Figueroa, E., Céspedes-Cuenca, Y., Ardevol-Proenza, E., 2015. Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Cubana Med.* 54, 151–166.
- Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Rui, L., 2014. Energy metabolism in the liver. *Physiol. Behav.* 4, 177–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Russo, B., Picconi, F., Malandrucchio, I., Frontoni, S., 2019. Flavonoids and insulin-resistance: From molecular evidences to clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms20092061>
- Saadeldien, F.S.A., Niu, Y., Wang, H., Zhou, L., Meng, L., Chen, S., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G.I.N., Liu, Z., Kang, W., 2020. Natural products: Regulating glucose metabolism and improving insulin resistance. *Food Sci. Hum. Wellness.* 9, 214–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.005>
- Sakamoto, K., Holman, G.D., 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E29–E37. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008>

- Santa-Cruz, N.M., Zacarías-Castillo, R., 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González* 5, 33–41.
- Satoh, T., 2014. Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 18677–18692.  
<https://doi.org/10.3390/ijms151018677>
- Seimandi, M., Lemaire, G., Pillon, A., Perrin, A., Carlavan, I., Voegel, J.J., Vignon, F., Nicolas, J.C., Balaguer, P., 2005. Differential responses of PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , and PPAR $\gamma$  reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal. Biochem.* 344, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.010>
- Singh, S., Usman, K., Banerjee, M., 2016. Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 7, 302–315.  
<https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i15.302>
- Soccio, R.E., Chen, E.R., Lazar, M.A., 2014. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab.* 20, 573–591.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.005>
- Sokolowska, E., Blachnio-Zabielska, A., 2019. The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10, 577.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00577>
- Swinnen, S.G., Hoekstra, J.B., DeVries, J.H., 2009. Insulin therapy for type 2 diabetes. *Diabetes care.* 32, S253–S259. <https://doi.org/10.2337/dc09-s318>
- Tan, K.K., Kim, K.H., 2013. *Alternanthera sessilis* red ethyl acetate fraction exhibits antidiabetic potential on obese type 2 diabetic rats. *eCAM.* 2013, 845172.  
<https://doi.org/10.1155/2013/845172>
- Tang, Y., Chen, A., 2010. Curcumin prevents leptin raising glucose levels in hepatic stellate cells by blocking translocation of glucose transporter-4 and increasing glucokinase. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1137–1149.



<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00956.x>

Tangvarasittichai, S., 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 6, 456–480.

<https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>

Testa, R., Bonfigli, A.R., Genovese, S., De Nigris, V., Ceriello, A., 2016. The possible role of flavonoids in the prevention of diabetic complications.

*Nutrients.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu8050310>

Tong, T., Ren, N., Soomi, P., Wu, J., Guo, N., Kang, H., Kim, E., Wu, Y., He, P., Tu, Y., Li, B., 2018. Theaflavins improve insulin sensitivity through regulating mitochondrial biosynthesis in palmitic acid-induced HepG2 cells. *Molecules.* 23, 3382. <https://doi.org/10.3390/molecules23123382>

Turcotte, L.P., Fisher, J.S., 2008. Skeletal muscle insulin resistance: Roles of fatty acid metabolism and exercise. *Phys. Ther.* 88, 1279–1296.

<https://doi.org/10.2522/ptj.20080018>

Williams, C.A., 1978. The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the Bromeliaceae. *Phytochemistry.* 17, 729–734.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94216-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94216-X)

Witherup, K.M., McLaughlin, J.L., Judd, R.L., Ziegler, M.H., Medon, P.J., Keller, W.J., 1995. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of spanish moss (*Tillandsia usneoides*). *J. Nat. Prod.* 58, 1285–1290. <https://doi.org/10.1021/np50122a023>

Yadav, H., Devalaraja, S., Chung, S.T., Rane, S.G., 2017. TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway targets PP2A-AMPK-FoxO1 signaling to regulate hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 292, 3420–3432.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764910>

Yang, Y., Chan, L., 2016. Monogenic diabetes: What it teaches us on the common forms of type 1 and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 37, 190–222.

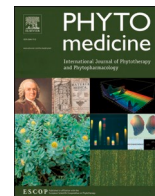
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1116>

Zhang, C., Klett, E.L., Coleman, R.A., 2013. Lipid signals and insulin resistance. *Clin. Lipidol.* 8, 659–667. <https://doi.org/10.2217/clp.13.67>

Zhao, F.-Q., Keating, A., 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics.* 8, 113–128. <https://doi.org/10.2174/138920207780368187>

Zheng, X., Cartee, G.D., 2016. Insulin-induced effects on the subcellular localization of AKT1, AKT2 and AS160 in rat skeletal muscle. *Sci. Rep.* 6, 39230. <https://doi.org/10.1038/srep39230>

Zheng, Y., Ley, S.H., Hu, F.B., 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>



## Original Article

## GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts and primary mouse hepatocytes by an antihyperglycemic flavone from *Tillandsia usneoides*

Jhovan Eduardo Miranda-Nuñez<sup>a</sup>, Alejandro Zamilpa-Alvarez<sup>b</sup>, Angeles Fortis-Barrera<sup>c</sup>, Francisco Javier Alarcon-Aguilar<sup>c</sup>, Hilda Loza-Rodriguez<sup>c</sup>, Luis E. Gomez-Quiroz<sup>d</sup>, Soraya Salas-Silva<sup>d</sup>, Maria Flores-Cruz<sup>e</sup>, Miguel Angel Zavala-Sanchez<sup>f</sup>, Gerardo Blancas-Flores<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México

<sup>b</sup> Departamento de Fitoquímica Farmacológica, Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, México

<sup>d</sup> Área de Medicina Experimental y Traslacional, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, México

<sup>e</sup> Departamento el Hombre y su Ambiente, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Ciudad de México, México

<sup>f</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Ciudad de México, México



## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Tillandsia usneoides*, Bromeliaceae  
Diabetes mellitus  
Flavonoids  
5,7,4-trihydroxy-3,6,3,5-tetramethoxyflavone  
GLUT4

## ABSTRACT

**Background:** Type 2 Diabetes (T2D) is characterized by deregulation in carbohydrate and lipid metabolism, with a very high mortality rate. Glucose Transporter type 4 (GLUT4) plays a crucial role in T2D and represents a therapeutic target of interest. *Tillandsia usneoides* (*T. usneoides*) is a plant used as a remedy for diabetes. *T. usneoides* decreased blood glucose in different experimental models. However, the involvement of GLUT4 in this effect has not yet been explored.

**Purpose:** This study aimed to investigate whether any component in *T. usneoides* might participate in the effect on blood glucose through a bioassay-guided fractionation, testing its potential antihyperglycemic effect in mice, as well as its influence on GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts and primary hepatocytes.

**Methods:** The aqueous extract and the Ethyl Acetate fraction (TU-AcOEt) of *T. usneoides* were evaluated in a hypoglycemic activity bioassay and in the glucose tolerance test in CD-1 mice. TU-AcOEt was fractionated, obtaining five fractions that were studied in an additional glucose tolerance test. C1F3 was fractionated again, and its fractions (C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44) were examined by HPLC. The C2F38-44 fraction was analyzed by Mass Spectrometry (MS) and subjected to additional fractionation. The fraction C3F6-9 was explored by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), resulting in 5,7,4-trihydroxy-3,6,3,5-tetramethoxyflavone (Flav1). Subsequently, a viability test was performed to evaluate the cytotoxic effect of Flav1 and fractions C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, and C3F30-41 in C2C12 myoblasts and primary mouse hepatocytes. Confocal microscopy was also performed to assess the effect of Flav1 and fractions on GLUT4 translocation.

**Results:** The TU-AcOEt fraction exhibited a hypoglycemic and antihyperglycemic effect in mice, and its fractionation resulted in five fractions, among which fraction C1F3 decreased blood glucose. MS and NMR analysis revealed the presence of Flav1. Finally, Flav1 significantly promoted the translocation of GLUT4 in C2C12 myoblasts and primary hepatocytes.

**Abbreviations:** Akt, Serine/threonine kinase; AUC, Area Under the Curve; DAPI, 4'; DMSO, Dimethyl Sulfoxide; FoXO1, Forkhead Transcription Factors; GLUT4, Glucose Transporter type 4; GS, Glycogen Synthase; G6Pase, Glucose 6 Phosphatase; HMG, 3-hydroxy-3-methylglutaric acid; HPLC, High-Performance Liquid Chromatography; MS, Mass Spectrometry; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; PEPCK, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase; ROS, Reactive Oxygen Species; TCL, Thin Layer Chromatography; TFA, Trifluoroacetic acid; *T. usneoides*, *Tillandsia usneoides* Linneo; TU-AcOEt, Ethyl Acetate fraction; TU-Aqueous, Aqueous fraction; T2D, Type 2 Diabetes; UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography.

\* Corresponding author.

E-mail address: [gera@xanum.uam.mx](mailto:gera@xanum.uam.mx) (G. Blancas-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153622>

Received 9 February 2021; Received in revised form 23 April 2021; Accepted 30 May 2021

Available online 2 June 2021

0944-7113/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Conclusion:** To date, Flav1 has not been reported to have activity in GLUT4; this study provides evidence that *T. usneoides* is a plant with the potential to develop novel therapeutic agents for the control of T2D.

## Introduction

Type 2 Diabetes (T2D) is a chronic degenerative disorder (Cho et al., 2018) that affects different organs, mainly skeletal muscle and liver (Perry et al., 2016), producing an imbalance in carbohydrate and lipid metabolism (Kharroubi and Darwish, 2015). Skeletal muscle plays a crucial role in the modulation of insulin-dependent blood glucose (DeFronzo and Tripathy, 2009), which regulates the mobilization to the plasma membrane of the Glucose Transporter type 4 (GLUT4) (Funaki et al., 2004). Conversely, the liver lacks a significant expression of GLUT4 (Karim et al., 2012); however, some studies reveal the importance of GLUT4 in metabolic liver disease (Kim et al., 2013, 2014).

Insulin resistance leads to an increase in the production of liver glucose, an imbalance in glucose uptake, and glucose storage in skeletal muscle mediated by GLUT4 (Bazotte et al., 2014; DeFronzo and Tripathy, 2009); therefore, the activation of GLUT4 is considered an attractive target for the control of T2D (Olson, 2012). T2D therapy includes lifestyle changes, drug delivery and, in many cases, traditional medicine resources, particularly medicinal plants (Laguna-Hernández et al., 2017).

*Tillandsia usneoides* L. (*T. usneoides*), a Bromeliaceae commonly known as Spanish moss, is widely distributed in Mexico and in the southern United States (Garth, 1964; Martínez-Carrillo et al., 2010). This plant is traditionally used for T2D control. The hypoglycemic effect of aqueous extract of this plant in rats has been reported (Argueta and Gallardo-Vázquez, 1994; Keller et al., 1981), and some components, as 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid (HMG) and the glycoside flavonoid 3, 6, 3', 5'-tetramethoxy-5, 7, 4'-trihydroxyflavone-7-O-glucoside were identified in the aqueous extract of this species. HMG was described as one of the main compounds in *T. usneoides*, and it was proposed as the hypoglycemic principle (Witherup et al., 1995). However, treatment with HMG induced lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in rats, and an increase in the activity of caspase-3, a marker of cell damage (da Rosa et al., 2020). Therefore, *T. usneoides* could contain compounds with effects on blood glucose without the adverse effects of HMG. This study aimed to investigate whether other components might also be participating in the blood glucose effect of *T. usneoides* through a bioassay-guided fractionation, evaluating the antihyperglycemic effect in mice and GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts and primary hepatocytes.

## Materials and methods

### Plant material of *T. usneoides*

*T. usneoides* was collected in March 2017 in the municipality of Amecameca, State of Mexico (N 19° 07' 0.700", or 98° 46' 0.476", altitude 2,450 meters above sea level). The material was taxonomically identified by M.Sc. Santiago Xolalpa Molina of the Medicinal Plant Herbarium of the Mexican Institute of Social Security (IMSS-M-Herbarium) in Mexico City with specimen number 16409.

### Extraction and isolation of bioactive fractions from *T. usneoides*

The fresh plant material (21 kg) was cleaned and ground (leaves, stems, and flowers) in a manual crank grain mill. The resulting product was dehydrated at room temperature and macerated in 20 l of Milli-Q water for 24 h. The aqueous extract (yield, 2.6%) was filtered and subjected to bipartition with Ethyl Acetate (AcOEt) (Merck, MA, USA). Both fractions, the aqueous (TU-Aqueous, yield 73.1%) and the AcOEt

(TU-AcOEt, yield 1.2%), were stored at 4°C for later pharmacological evaluation and chemical fractionation.

### Obtention of fractions of the TU-AcOEt fraction

TU-AcOEt (7 g) was subjected to open chromatographic column fractionation (500 × 50 mm) using normal phase silica gel (particle size, 0.063-0.200 mm; Merck, MA, USA) in a ratio of 10 g of silica/g of TU-AcOEt. A moving gradient phase system was used (n-Hexane (Hx)/AcOEt (Merck, MA, USA)), starting with Hx (100%) and gradually diluting with AcOEt (5%) up to 100% of the latter solvent (the volume of each sample was 100 ml). Fractions were combined by chemical similarity by means of reverse-phase Thin Layer Chromatography (TLC) (60 F<sub>254S</sub> silica gel; Merck, MA, USA). For biological trials, the five majority fractions of TU-AcOEt were collected as follows: C1F1 (yield, 3.5%); C1F2 (yield, 9.5%); C1F3 (yield, 7.3%); C1F4 (yield, 8.3%), and C1F5 (yield, 5.7%).

### Purification and chemical characterization of compounds in the C1F3 fraction by HPLC, MS, and NMR

The bioactive fraction (C1F3) was fractionated by reverse-phase open column chromatography (400 × 25 mm) (particle size, 40-63 μm; Merck, MA, USA). The mobile phase began with H<sub>2</sub>O (100%) and was gradually diluted with acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) (10%), obtaining 77 fractions, which were grouped by their similar chemical profiles exhibited through TLC. The three most abundant fractions (C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44) were analyzed by HPLC, along with C1F3 (Supplementary Fig. 1). HPLC was performed by injecting 10 μl of the sample into a C18 column (25 cm in length × 4.6 mm of SUPELCO, Separation module Waters 2690 with UV Waters index 2996 detector), gradient with water acidified with Trifluoroacetic acid (TFA) 0.5%/CH<sub>3</sub>CN 0.5% (v/v) (Merck, MA, USA), with a moving phase flow of 1 ml/min for 30 min.

The fraction C2F38-44 resulted as the most abundant (yield, 42.8%), and UPLC was employed for its analysis. The analysis was carried out using the UPLC Acquity system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a quaternary pump with an autosampler column oven. The sample was dissolved in MeOH/formic acid (0.01%) and injected into an Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm column (2.1 × 50 mm) at a flow rate of 0.3 ml/min. The mobile phase began with an aqueous solution of TFA (0.05%)/CH<sub>3</sub>CN. The column was maintained at a temperature of 40 °C, and the injection volume was 5 μl; absorption was measured within a wavelength range of 190-600 nm. The mass spectrometric (MS) analysis was performed and analyzed on a Triple Quadrupole (TQD) mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) through a combined source of electrospray-APCI Z-spray ionization. The conditions of desolvation were 220 and 500 °C, respectively. Nitrogen was utilized as a desolvation gas and argon was employed as a collision gas (flow rate, 0.1 ml/min). Fraction C2F38-44 was subjected to a new stage of purification using normal phase open column chromatography (300 × 20 mm) (silica gel, 0.063-0.200 mm, Merck, MA, USA), the moving phase began with Hx and was gradually diluted with AcOEt at a ratio of 1:1, and TLC (60 F<sub>254</sub> silica gel plates) was developed with the Hx/AcOEt (1:1) system. TLC was revealed with a flavonoid reagent (5 ml of polyethylene glycol in 35 ml of ethanol and 200 mg of diphenylboryloxyethylamine), resulting in two fractions (C3F6-9 and C3F30-41).

Fraction C3F6-9 (yield, 11.3%) was analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR (Supplementary Figs. 2 and 3), resulting in 5,7,4-trihydroxy-3,6,3,5-tetramethoxyflavone (Flav1), which was quantified in the TU-AcOEt fraction by HPLC. The chemical structure of Flav1 is shown in Figure 1. Quantification was performed by injecting 10 μl of TU-AcOEt

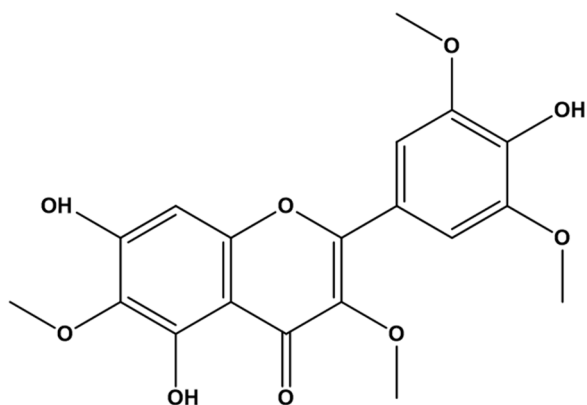


Fig. 1. Chemical structure of 5,7,4'-trihydroxy-3,6,3',5'-tetramethoxyflavone (Flav1).

fraction (2 mg/ml) and different concentrations of Flav1 (0.125, 0.250, 0.500, 1, and 2 mg/ml) into a C18 column (25 cm in length  $\times$  4.6 mm of the SUPELCO, Waters 2690 separation module with a Waters index 2996 UV detector); a gradient with water plus TFA 0.5%/CH<sub>3</sub>CN (v/v) was used (Merck, MA, USA), with a mobile phase flow rate of 1 ml/min for 30 min. The detection of Flav1 was performed at a UV wavelength of  $\lambda$ : 360 nm, resulting in a standard linear curve ( $R^2 = 0.9985$ ). The content of Flav1 in the TU-AcOEt fraction resulted in 57.31 mg/g, with a purity of 94% by HPLC under the same conditions.

#### Studies in vivo

Male CD-1 mice eight weeks of age (weighing 30-35 g each) were used; the animals were provided by the Metropolitan Autonomous University's Animal Center, were maintained with an essential rodent diet, and 12 h of light/dark cycles, with a regulated temperature (25 °C). After 12 h of fasting, experimental studies were carried out following the national and international standards of the Mexican Official Standard (NOM-062-ZOO-1991, revised 2001, Mexico). The Ethics Committee of the Metropolitan Autonomous University approved this protocol on January 31, 2019 (DCBS.1857.2019).

#### Hypoglycemic activity bioassay of the fractions (TU-AcOEt and TU-Aqueous) and the aqueous extract of *T. usneoides*

Five groups of five animals each were randomly formed. Subsequently, the mice with 12 h of fasting were measured for blood glucose ( $T = 0$ ), and the following treatments were administered intraperitoneally (i.p.) as follows: Group 1, control treated with a Tween 20 solution (5%) (4 mg/kg); Group 2, positive control treated with Glibenclamide (10 mg/kg); Group 3, treated with TU-AcOEt (250 mg/kg); Group 4, treated with TU-Aqueous (250 mg/kg), and Group 5, treated with the aqueous extract (250 mg/kg). The dose of 250 mg/kg of the extracts was chosen according to previous studies with *T. usneoides* extracts in murine models (Espejel-Nava, 2014; Keller et al., 1981). Blood samples were obtained by puncture of the caudal vein, and the blood glucose was measured at 120, 240, and 360 min, employing the dehydrogenase method (Accu-Chek Performa, Roche, Mannheim, Germany).

#### Evaluation of the effect of *T. usneoides* fractions in the glucose tolerance test

The mice were randomly grouped into four groups of five animals each. Mice aged eight weeks were fasted (12 h) and the blood glucose was measured ( $T = 0$ ). The treatments were then administered intragastrically (i.g.) as follows: Group 1, control treated with Tween 20 (5%) solution (4 ml/kg); Group 2, (positive control) Metformin (150 mg/kg); Group 3, TU-AcOEt (250 mg/kg), and Group 4, TU-Aqueous (250 mg/kg).

kg). Tween-20 (5%) was used as a vehicle. Five min after the treatments, it was administered a dextrose solution (50%) was administered i.g. (2 g/kg). Finally, the blood was obtained by puncture of the caudal vein, and the blood glucose was quantified at 30, 60, 90, and 120 min, using the dehydrogenase method (Accu-Chek Performa, Roche, Mannheim, Germany).

#### Evaluation of the effect of TU-AcOEt fractions of *T. usneoides* on the glucose tolerance test

Another oral glucose tolerance test was performed with the fractions from TU-AcOEt. The 8-week-old mice were grouped into seven groups of four animals each. Blood glucose was measured in fasting mice (12 h), and the treatments were administered as follows: Group 1, received 4 ml/kg of 30% Tween-20 solution (Control Group); Group 2, 150 mg/kg Metformin (positive control), and Groups 3, 4, 5, 6, and 7 received 250 mg/kg of each TU-AcOEt fraction (C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, and C1F5, respectively). Tween-20 (30%) was used as a vehicle. All treatments were administered i.g. Five minutes after treatment, a dextrose solution (50%) was administered i.g. (2 g/kg). Finally, blood was obtained by puncture of the caudal vein, and the blood glucose was quantified at 30, 60, 90, and 120 min, using the dehydrogenase method (Accu-Chek Performa, Roche, Mannheim, Germany).

#### C2C12 myoblast culture

Mouse myoblast cells (C2C12, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) were purchased and grown in culture bottles (Nunc™) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 5.5 mM of glucose (Gibco, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) (v/v), 1 mM sodium pyruvate (Sigma Aldrich, MO, USA), 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich, MO, USA), 0.1 mM non-essential amino acids (Sigma Aldrich, MO, USA), and 1% gentamicin (Sigma Aldrich, MO, USA) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and at 95% humidity. Once the cells reached confluence, they were seeded in plates of in 96-well ( $5 \times 10^3$ ) for incubation with the different treatments for 24 h.

#### Isolation and primary culture of mouse liver cells

Hepatocytes were isolated by means of a two-step collagenase perfusion utilizing 8-to 12-week-old CD-1 mice, as described above (Clavijo-Cornejo et al., 2013). Percentage of viability was determined with Trypan Blue (1:1 dilution), and the viable hepatocytes were cultivated in 96-well plates ( $5 \times 10^3$ ) in William's E medium containing 11 mM of glucose (Sigma Aldrich, MO, USA), supplemented with 10% FBS (v/v) 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 95% humidity during 4 h. Once the cells adhered, the medium was replaced, and the following day, the cells were employed for the different treatments.

#### Neutral red viability test in C2C12 myoblasts and primary hepatocytes

The amino-7-dimethyl-2 methylphenazine hydrochloride (NR) (Sigma-Aldrich, MO, USA) test was used to determine cellular viability. Minimal concentrations of the inhibition of cellular viability due to the fractions and compound were determined as follows: C2C12 cells and primary hepatocytes were treated with different concentrations of the fractions of C1F3 (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, and C3F30-41): 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, and 500  $\mu$ g/ml; and Flav1: 1.3, 2.6, 6.4, 12.8, 25.6, 63.9, 127.9, 255.8, and 1278.8  $\mu$ M (values equivalent to 0.5-500  $\mu$ g/ml of Flav1) in serumless DMEM and Williams's E medium. The same treatments were performed in the presence of high glucose (25 mM), both experiments for 24 h. The concentration of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (0.01%) (Sigma-Aldrich, MO, USA) was used as a vehicle for fractions and as a control. Later, a NR solution was added in DMEM (50  $\mu$ g/ml) and serum-free William's E medium for 3 h at 37 °C and 95% humidity. The change in absorbance was read at 540 nm in an ELISA reader. Viability was determined by the percentage of living cells/dead

cells compared to the control group, using the previously reported process (Borenfreund and Puerner, 1985). For further experiments, concentrations of 10 µg/ml for fractions and of 25.6 µM for the compound were selected.

#### Experimental conditions

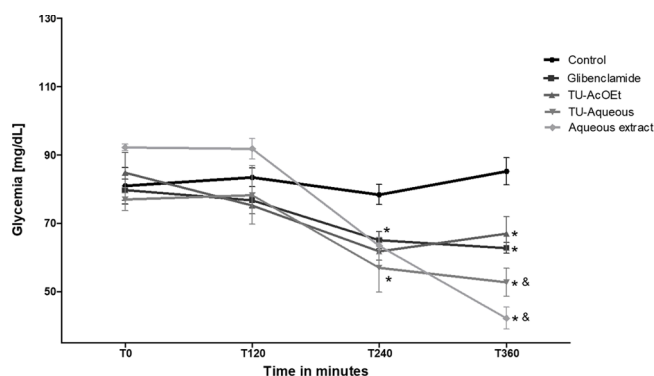
C2C12 cells and primary hepatocytes were cultured in 8-well plates (Lab-Tek II Chambers Slide System, Thermo-Fisher, MA, USA) for 24 h. Adherence of the primary hepatocytes was performed with a collagen solution (0.02%) (Sigma-Aldrich, MO, USA). One hour prior to treatment with the fractions, the cells received pretreatment with a serum-free medium. The cells were incubated for 15 and 30 min with the fractions (C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, and C3F30-41) and Flav1 (10 µg/ml for fractions and 25.6 µM for the compound), in addition to the serum-free William's E medium (11 mM glucose) in primary hepatocytes. In the case of C2C12 cells, a serum-free DMEM medium (5.5 mM glucose) was utilized. For both experiments, insulin (100 nM) was used as a positive control (Sigma-Aldrich, MO, USA). The William's E medium and the DMEM medium with 0.01% DMSO were employed as a control.

#### GLUT4 immunofluorescence in C2C12 cells and primary hepatocytes

After treatment, cells were incubated with a primary antibody for GLUT4 (Santa-Cruz-Biotechnology, TX, USA) overnight at 4 °C. Then, the cells were incubated with the secondary antibody (anti-rabbit-rhodamine) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) for 2 h at room temperature. After each incubation, the cells were washed with PBS-Tween 0.5%. Subsequently, a mixture of PBS/glycerol/DAPI (Inorganic Polyphosphate Storage by 4', 6-diamidino-2-phenylindole) was added for 5 min to stain the nuclei; the samples were placed in a confocal microscope (Zen-Sp1; ZEISS) with laser scanning. The images were analyzed using NIH ImageJ imaging software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Intensity regions were selected in the cytoplasm, and the average intensity of the pixels was measured (Loza-Rodríguez et al., 2020).

#### Statistical analysis

In the *in vivo* experiments, the Area Under the glucose tolerance test Curve (AUC) was calculated using a geometric method, and the mean glucose concentration was determined. In all cases, the data were expressed as the Mean ± Standard Error of the Mean (S.E.M.). The statistical analysis was conducted with a multiple comparison Analysis of Variance (ANOVA) test and a Tukey-Kramer test ( $p < 0.05$ ). The analysis was performed with the NCSS statistical software and GraphPad Prism5 package.



**Fig. 2.** Effect of the aqueous extract and the fractions TU-AcOEt and TU-Aqueous on blood glucose levels in CD-1 mice. Control Tween 20 (5%), TU-Aqueous (250 mg/kg), TU-AcOEt (250 mg/kg), Aqueous extract (250 mg/kg), and Glibenclamide (10 mg/kg). \*Significant difference compared to control,  $p < 0.05$ . Mean ± S.E.M. (n = 5). & Significant difference compared to positive control,  $p < 0.05$ . Mean ± S.E.M. (n = 5).

## Results

### Hypoglycemic effect of the aqueous extract and the fractions of *T. usneoides*

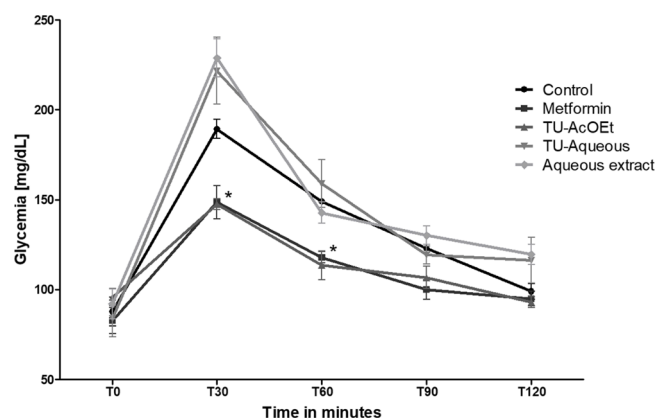
Figure 2 shows the hypoglycemic effect of the aqueous extract and the fractions (TU-AcOEt and TU-Aqueous) of *T. usneoides*. Administration of the aqueous extract of *T. usneoides* decreased blood glucose in 17 and 47% at 240 and 360 min, respectively. TU-AcOEt and TU-Aqueous significantly decreased glycemia at 240 (21 and 27%, respectively) and 360 min (21 and 38%, respectively), compared to the control group, a similar effect to that of Glibenclamide (17 and 26%, respectively).

### Antihyperglycemic effect of TU-AcOEt fraction of *T. usneoides*

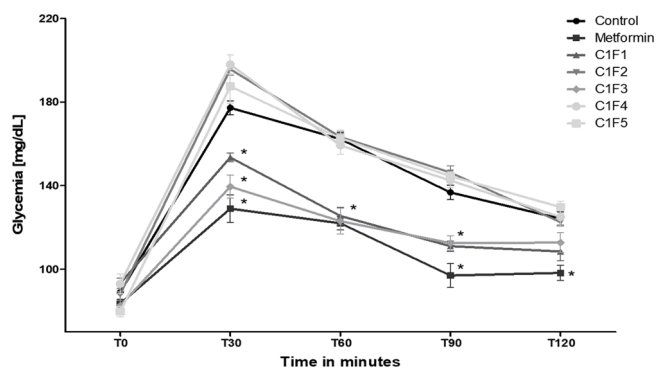
The aqueous extract and TU-Aqueous fraction did not demonstrate an antihyperglycemic effect (Fig. 3). The TU-AcOEt fraction revealed a remarkable antihyperglycemic effect. The mean glucose concentration during the AUC decreased significantly, by 17% compared to the control group ( $p < 0.05$ ), similar to Metformin (18%) (Fig. 3). In that the TU-AcOEt fraction exhibited hypoglycemic and antihyperglycemic effects, this fraction was chosen for a primary fractionation, resulting in 5 sub-fractions. C1F1 and C1F3 decreased the mean glucose concentration during AUC by 16 and 19%, respectively, compared to the control ( $p < 0.05$ ), lesser values than those of Metformin (24%) (Fig. 4). C1F2, C1F4, and C1F5 did not decrease blood glucose (Fig. 4). C1F3 was selected for continuing its purification.

### Fractionation and chemical characterization of the C1F3 fraction by HPLC, MS, and NMR

The phytochemical analysis of C1F3 by TLC showed that it contains flavonoids. From C1F3 by open column chromatography, 77 fractions were obtained and grouped by TLC. Three fractions were selected and were again analyzed by HPLC (C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44), along with C1F3 (Fig. 5). C2F9-12, C2F22-25, and C2F38-44 had retention times of 8.968, 14.107, and 19.971 min, respectively (Supplementary Fig. 1). The most abundant fraction was analyzed by MS (C2F38-44), resulting in an  $m/z$  of 391.21, corresponding to flavonoid Flav1 (Fig. 6). The fractionation of C2F38-44 by open column chromatography yielded two fractions (C3F6-9 and C3F30-41). The fraction C3F6-9 was analyzed by  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ .  $^1\text{H-NMR}$  exhibited peaks with a chemical shift of 3.76, 3.82, 3.84, 3.86, 6.62, and 7.38;  $^{13}\text{C-NMR}$  showed peaks with a chemical shift of 56.60, 60.16, and 60.39. These data corroborated the chemical structure of Flav1 (Supplementary Figs. 2 and 3).



**Fig. 3.** Effect of the fractions TU-Aqueous and TU-AcOEt in the glucose tolerance test in mice. Control Tween 20 (5%), TU-Aqueous (250 mg/kg), TU-AcOEt (250 mg/kg), Aqueous extract (250 mg/kg), and Metformin (150 mg/kg). \* Significant difference compared to control,  $p < 0.05$ . Mean ± S.E.M. (n = 5).



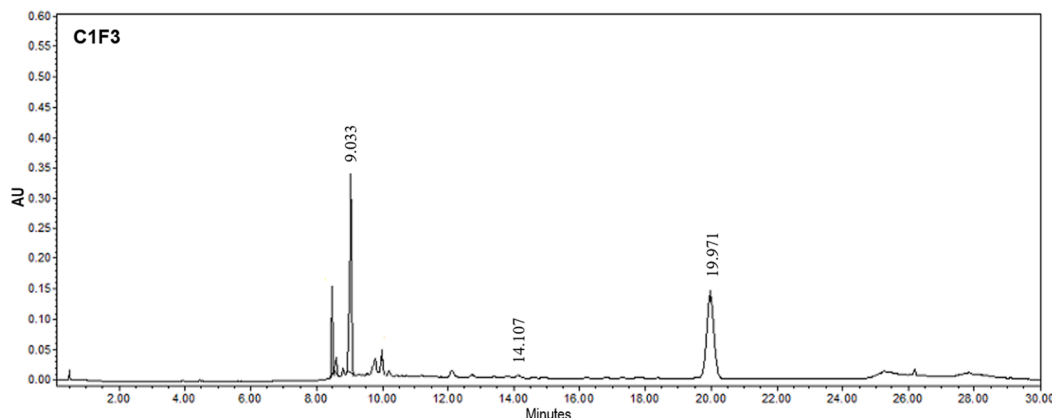
**Fig. 4.** Effect of the fractions from TU-AcOEt in the oral glucose tolerance test in mice. Control Tween 20 (30%), C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C1F5 (250 mg/kg), and Metformin (150 mg/kg). \* Significant difference compared to control,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

*Effect of C1F3 fractions on the viability of C2C12 myoblasts and primary hepatocytes*

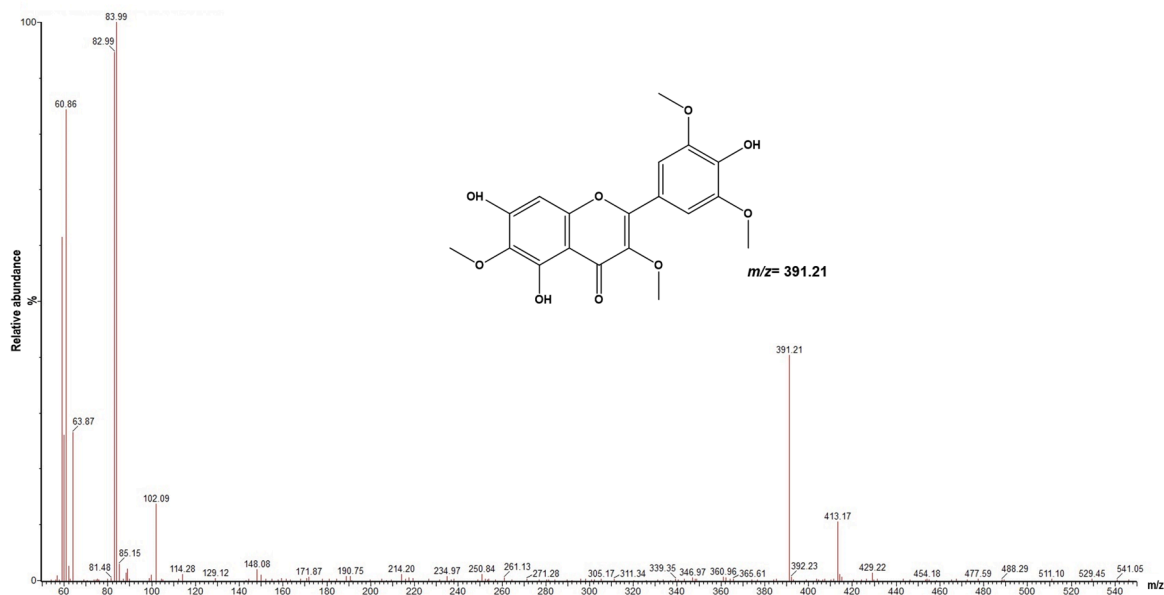
In C2C12 myoblasts, the fractions C2F9-12, C2F22-25, and C3F30-

41, reduced viability with low and high glucose to 500  $\mu$ g/ml (Figs. 7A, 7B, and 7D). The C2F38-44 fraction decreased viability to 100  $\mu$ g/ml only with high glucose and to 500  $\mu$ g/ml with low and high glucose (Fig. 7C). Flav1 reduced viability with low glucose solely at the 127.8  $\mu$ M concentration (500  $\mu$ g/ml), whereas with high glucose, the reduction was in a concentration-dependent manner from 127.9  $\mu$ M (50  $\mu$ g/ml) concentration (Fig. 7E).

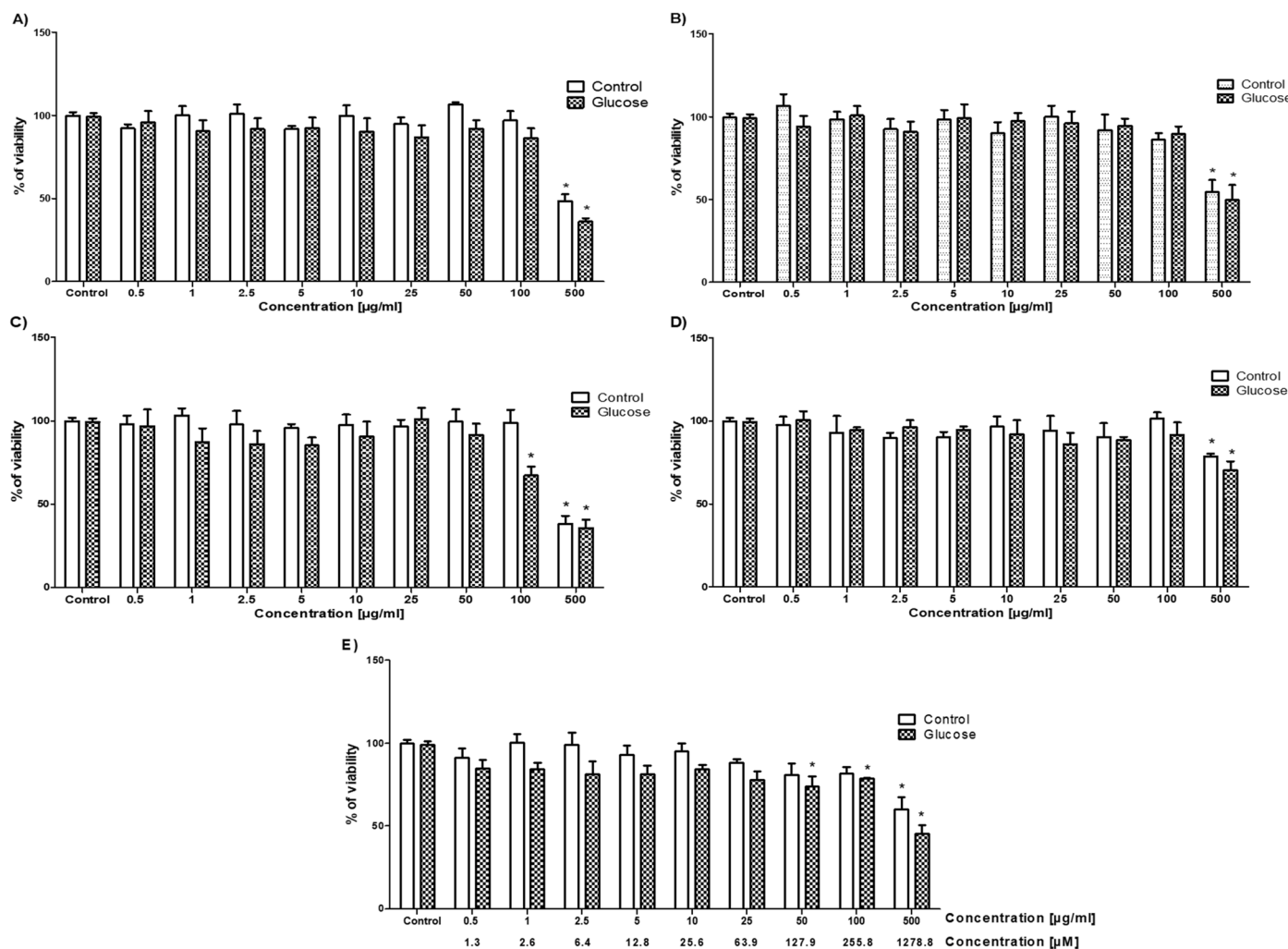
In primary hepatocytes with low glucose, C2F9-12, C2F38-44, and C3F30-41 reduced viability only at the highest dose (500  $\mu$ g/ml) (Figs. 8A, 8C, and 8D), whereas C2F22-25 caused significant reductions from 100  $\mu$ g/ml (Fig. 8B). With high glucose, C2F9-12 decreased viability from the concentration of 50  $\mu$ g/ml (Fig. 8A), whereas C2F22-25, C2F38-44, and C3F30-41 gave rise to a reduction of viability from the concentration of 100  $\mu$ g/ml (Figs. 8B, 8C, and 8D). Flav1 reduced viability with low glucose from 255.8  $\mu$ M (100  $\mu$ g/ml) concentration, whereas with high glucose, the reduction was in a concentration-dependent manner from 127.9  $\mu$ M (50  $\mu$ g/ml) (Fig. 8E). Overall, an increased glucose concentration is associated with reduced viability in a dose-dependent manner.



**Fig. 5.** HPLC analysis of C1F3. Chromatogram of C1F3 (Retentions times: 9.033, 14.107, and 19.971 min detected at  $\lambda = 330$ ).



**Fig. 6.** MS spectrum and chemical structure of Flav1.



**Fig. 7.** Cellular viability of C2C12 myoblasts. A) C2F9-12, B) C2F22-25, C) C2F38-44, D) C3F30-41 (0.5- 500 µg/ml), and E) Flav1 at concentrations of 1.3, 2.6, 6.4, 12.8, 25.6, 63.9, 127.9, 255.8, and 1278.8 µM with low (5.5 mM) and high glucose (25 mM) for 24 h. The viability (%) was analyzed by the neutral red test. \* Significant difference compared to control,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

*Immunofluorescence of GLUT4 in C2C12 cells by confocal microscopy*

Concerning GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts at the 15 min, C2F9-12, C2F38-44, and Flav1 increased translocation relative to the control in 52, 32, and 36%, respectively; insulin, C2F22-25, and C3F30-41 did not increase the mobilization of GLUT4 at this time (Fig. 9A). At 30 min, C2F9-12, C2F38-44, and Flav1 showed a higher mobilization of GLUT4 (61, 62, and 43%, respectively), as did insulin (43%). Conversely, C2F22-25 and C3F30-41 decreased the translocation of GLUT4 compared to the control (Fig. 9C). Under immunofluorescence (Figs. 9B and 9D), small structures were observed in intracellular regions, representing GLUT4. Rhodamine isothiocyanate staining showed revealed GLUT4 fluorescence in red and DAPI-dyed nucleus in blue.

*Immunofluorescence of GLUT4 in primary hepatocytes culture by confocal microscopy*

In hepatocytes, similar results were observed. At 15 min, C2F38-44 and Flav1 increased the mobilization of GLUT4 (61 and 34%, respectively), an insulin-like effect (36%) (Figs. 10A and 10B); fraction C2F9-12 increased in a non-significant manner (23.35%) compared to the control, whereas the C2F22-25 fraction decreased the translocation of GLUT4 against control. At 30 min, fractions C2F22-25, C2F38-44, and C3F30-41 significantly decreased GLUT4 translocation in 42, 32, and 33%, respectively (Figs. 10C and 10D); the insulin, C2F9-12, and Flav1

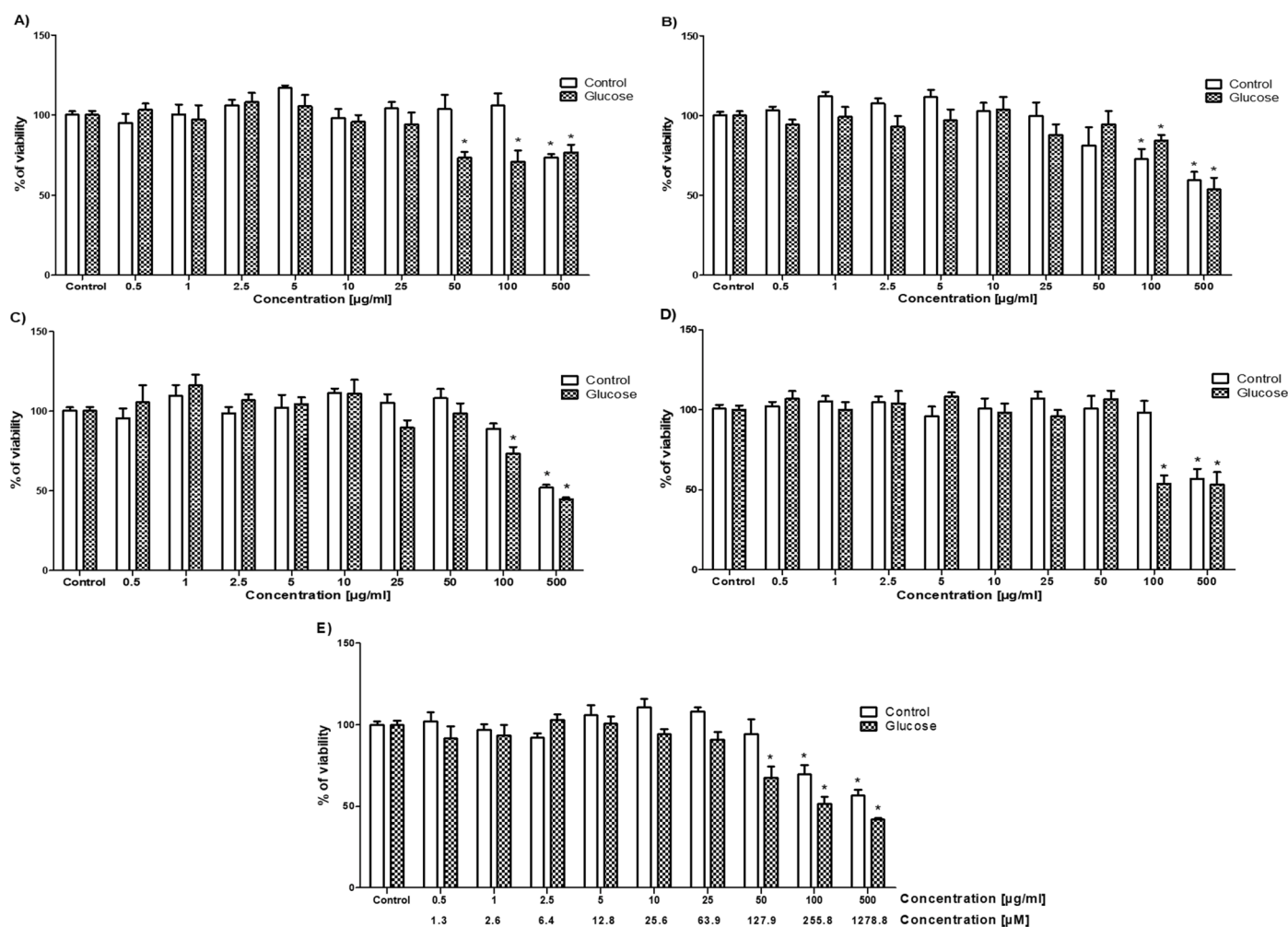
did not affect GLUT4 translocation in primary hepatocytes at 30 min.

**Discussion**

*T. usneoides* is a plant used to treat T2D. Previous studies support that a dose of 250 mg/kg exhibits a hypoglycemic effect in murine models (Espejel-Nava, 2014; Keller et al., 1981; Witherup et al., 1995). In this investigation, we confirmed that the dose of 250 mg/kg of the aqueous extract of *T. usneoides* decreases blood glucose in normal mice, as previously reported. The TU-AcOEt and TU-Aqueous fractions also showed a hypoglycemic effect, similar to that of Glibenclamide (Fig. 2). In previous studies, the HMG was described as the agent responsible for the hypoglycemic effect (Witherup et al., 1995); however, this compound also demonstrated adverse effects (da Rosa et al., 2020). Therefore, in the present investigation, the results of chemical fractionation guided by bioassay permitted the identification of another component of *T. usneoides* (Flav1), which might also be participating in this effect on blood glucose without the adverse effects of HMG.

Metabolic problems of insulin resistance are associated with chronic hyperglycemia (Huang et al., 2018). Therefore, a reduction in glucose might increase insulin sensitivity, similar to the insulin-sensitizer action associated with Metformin. Metformin activates AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) by inhibiting hepatic gluconeogenesis. AMPK negatively regulates Forkhead Transcription Factors (FoxO1) and inhibits the





**Fig. 8.** Cellular viability in primary hepatocytes. A) C2F9-12, B) C2F22-25, C) C2F38-44, D) C3F30-41 (0.5-500  $\mu\text{g/ml}$ ), and E) Flav1 at concentrations of 1.3, 2.6, 6.4, 12.8, 25.6, 63.9, 127.9, 255.8, and 1278.8  $\mu\text{M}$  with low (11 mM) and high glucose (25 mM) for 24 h. The viability (%) was analyzed by the neutral red test. \* Significant difference compared to control,  $p < 0.05$ . Mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ).

transcription of genes involved in hepatic gluconeogenesis, such as Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) and Glucose 6 Phosphatase (G6Pase) (Yadav et al., 2017). Therefore, the fractions of TU-AcOEt and the compounds obtained, including Flav1, might be activating these pathways, which should be explored in further studies.

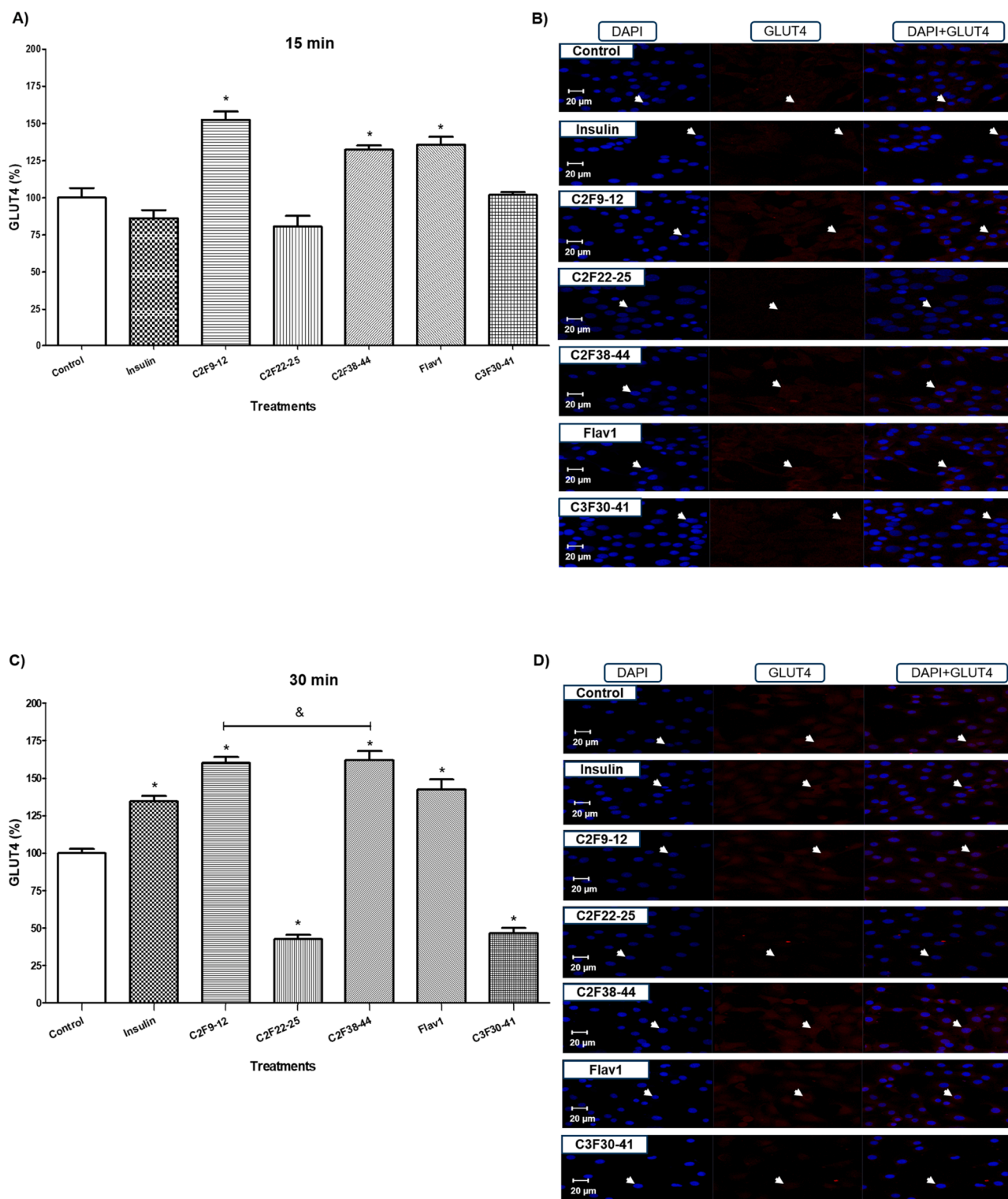
The structure of Flav1, isolated from the C1F3 fraction, was confirmed by MS and NMR Flav1. Four protons' signals (3.76, 3.82, 3.84, and 3.86) were observed for methoxy groups (Supplementary Fig. 2). These values were very similar to those previously reported (Lewis and Mabry, 1976). Flav1 is a flavonoid previously reported for *T. usneoides* in a free state and glycosylated (Williams, 1978; Witherup et al., 1995). However, the properties of Flav1 on glycemia had not yet, to our knowledge, been investigated.

Flavonoids represent a class of approximately 9,000 phenolic compounds, whose consumption has been associated with the amelioration of many diseases, such as cancer, cardiovascular disease, and diabetes (Testa et al., 2016; Wang et al., 2018). Foods rich in polyphenols exert beneficial effects on glucose metabolism and diabetes, modulating postprandial hyperglycemia and insulin sensitivity (Aryaeian et al., 2017; Proença et al., 2017) in insulin-sensitive tissues such as skeletal muscle and liver, two tissues that play a crucial role in regulating glucose metabolism (Hanhineva et al., 2010; Russo et al., 2019).

The skeletal muscle and liver participate in different metabolic processes, including glucose metabolism. Insulin resistance in both tissues is the most visible metabolic defect during T2D (Cordero-Herrera

et al., 2013; Honardoost et al., 2016). In this research, a state of hyperglycemia (Chandrasekaran et al., 2010) was induced *in vitro*, seeking to study the effect of fractions and Flav1 on the viability of C2C12 myoblasts and primary hepatocytes under high-glucose conditions. Results showed that both C2C12 cells and primary hepatocytes incubated with high glucose (25 mM) did not decrease their viability with the treatment of the fractions and Flav1 at low concentrations (0.5-25  $\mu\text{g/ml}$ ). Studies on C2C12 cells and primary rat hepatocytes support the idea that treatment with flavonoids at low concentrations reduces the metabolic effects of hyperglycemia (Ahangarpour et al., 2018; Kapoor and Kakkar, 2012). These data support the idea that Flav1 at low concentrations could mitigate the cytotoxic effects generated by a high-glucose concentration. In this context, during diabetes, the high-glucose concentrations increase Reactive Oxygen Species (ROS), damaging muscle and liver (Bonfont-Rousselot, 2002; Shokrzadeh et al., 2015). The antioxidant activity of flavonoids is considered a therapeutic target for correcting metabolic disorders under hyperglycemic conditions (Shokrzadeh et al., 2015). Therefore, the study of the possible antioxidant effects of Flav1 is mandatory.

GLUT4 is mainly found in skeletal muscle, where its translocation to the membrane depends on insulin. Insulin that, in turn, activates the Phosphatidylinositol 3-kinase/Serine/threonine kinase (PI3K/Akt) pathway to regulate the GLUT4-mediated glucose uptake (Aravinthan et al., 2014). However, changes in the dynamic of GLUT4 are associated with insulin resistance and T2D (Olson, 2012). In this regard, the high

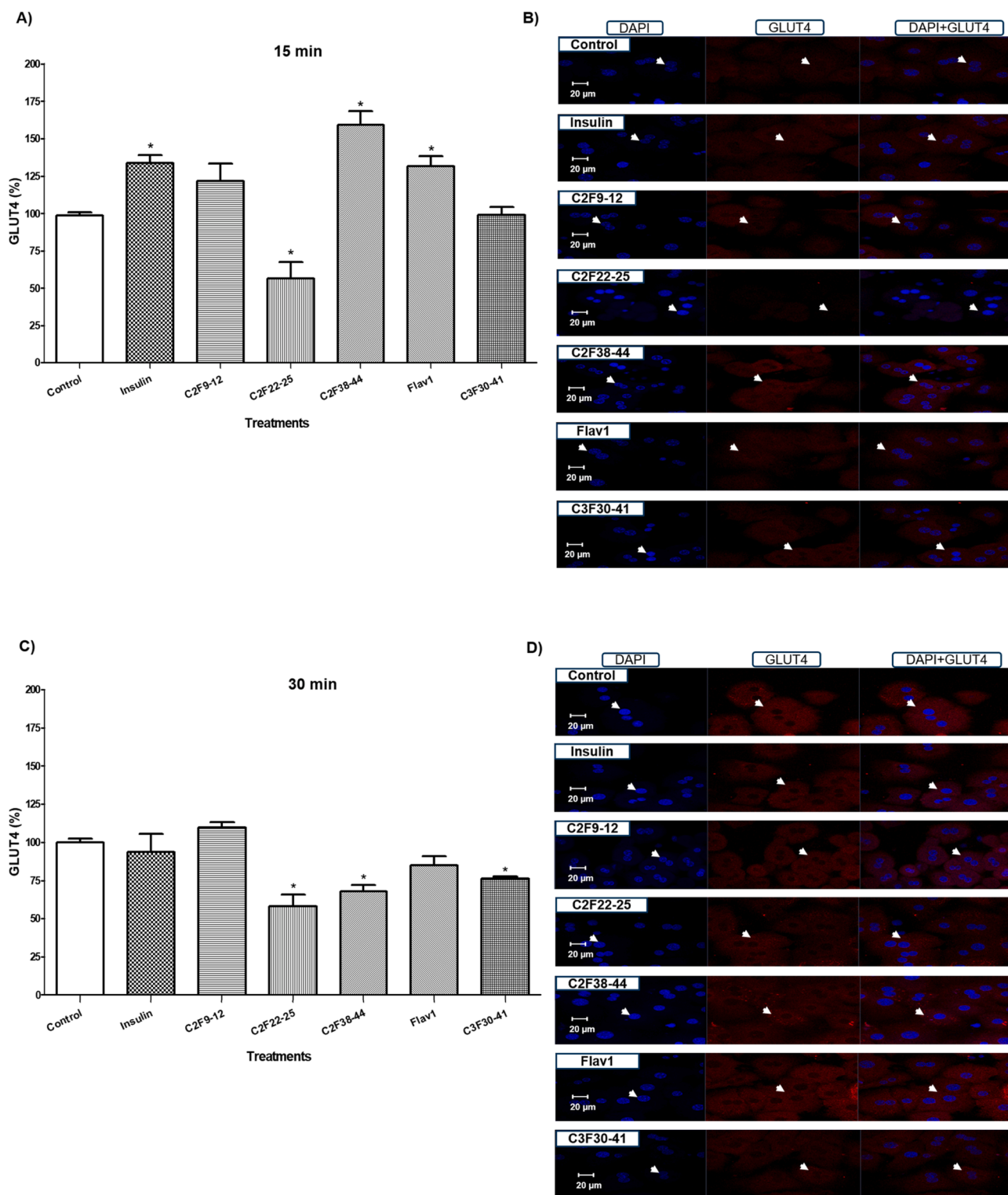


**Fig. 9.** Effect of fractions C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, and Flav1 on mobilization of GLUT4 in C2C12 myoblasts at 15 and 30 min. A) and C) Graphical representation of the GLUT4 fluorescence percentage with treatments: 10 µg/ml for C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 (25.6 µM), and 100 nM insulin at 15 min and 30 min, respectively. B) and D) Immunofluorescence images of GLUT4 in C2C12 cells at 15 and 30 min, respectively. The white arrows indicate GLUT4 (20 µm scale) in red (magnification, 40 ×). \* Significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ . & Significant difference compared to the positive control,  $p < 0.05$ . Mean ± S.E.M. (n = 3).

metabolic activity of C2C12 cells (mouse myoblasts) could aid in understanding the effect of the fractions and Flav1 on GLUT4 (Li et al., 2017). In the liver, little is known about the regulatory mechanism of GLUT4. Some studies support certain beneficial effects of GLUT4 on metabolic diseases of the liver, including insulin resistance (Kim et al.,

2013, 2014; Tong et al., 2018). However, the involvement of GLUT4 in hepatocytes has been poorly explored. Therefore, the study of GLUT4 translocation in these cells could explain, at least in part, the anti-hyperglycemic mechanism of *T. usneoides*.

Results revealed that C2F9-12, C2F38-44, and Flav1 increased



**Fig. 10.** Effect of fractions C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, and Flav1 on the mobilization of GLUT4 in primary hepatocytes at 15 and 30 min. A) and C) Graphical representation of the GLUT4 fluorescence percentage with treatments: 10 μg/ml for C2F9-12, C2F22-25, C2F38-44, C3F30-41, Flav1 (25.6 μM), and 100 nM insulin at 15 min and 30 min, respectively. B) and D) Immunofluorescence images of GLUT4 at 15 and 30 min, respectively. The white arrows indicate GLUT4 (20 μm scale) in red (magnification, 40 ×). \* Significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ . Mean ± S.E.M. (n = 3).

GLUT4 translocation in C2C12 cells (Figs. 9A and 9C). This effect has been observed with the treatment of different flavonoids, such as tangeretin (Kim et al., 2012), kaempferitrin, quercetin, rutin (Cazarolli et al., 2013; Jiang et al., 2019; Kappel et al., 2013), and apigenin (Hossain et al., 2014) in muscle cells, probably with the involvement of

the insulin pathway or the activation of AMPK. On the other hand, Flav1 increased GLUT4 translocation in primary hepatocytes, exhibiting an insulin-like effect (Figs. 10A and 10B). In HepG2 cells, the increase in GLUT4 was associated with the activation of Akt, attenuating insulin resistance (Tong et al., 2018). Some flavonoids increased insulin

sensitivity by activating Akt, PI3K, and Glycogen Synthase (GS), an essential enzyme in glycogen production (Cordero-Herrera et al., 2013; Eid et al., 2015). These data support the regulatory role of these flavonoids in glucose homeostasis, similarly to Flav1. Therefore, Flav1 might be regulating critical pathways in glucose metabolism in both lines, modulating the activity of Akt, PI3K, and AMPK, increasing GLUT4 translocation and improving insulin sensitivity. However, more studies are needed to confirm the signaling pathways associated with GLUT4 mobilization due to Flav1 in these cell lines.

The Flav1 content in TU-AcOEt was 57.31 mg/g, explaining the effects observed with this fraction. Flav1 could be a critical molecule that helps correct the metabolic imbalance generated by T2D. In addition, C2F9-12 also increased the GLUT4 translocation in C2C12 cells; however, the fractions compounds must be identified in subsequent studies.

## Conclusions

Flav1 exhibited an antihyperglycemic effect mediated by GLUT4 translocation in muscle and hepatocytes. This activity could offer therapeutic advantages for the control of T2D, contributing to the development of novel bioactive molecules for this and other metabolic diseases. The study of the mechanisms of action of Flav1 on the insulin signaling pathway, the principal route for GLUT4 mobilization, is mandatory.

## Author contributions

Miranda-Núñez Jhovan Eduardo: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing-original-draft. Zamilpa-Alvarez Alejandro: Resources, Chemical methodology. Fortis-Barrera Angeles: Bioassays, Formal analysis. Alarcon-Aguilar Francisco Javier: Resources, Writing-review & editing. Loza-Rodríguez Hilda: *In vitro* bioassays. Gomez-Quiroz Luis E: Resources, Visualization. Salas-Silva Soraya: Technical support. Flores-Cruz Maria: Resources. Zavala-Sanchez Miguel Angel: Technical support. Blancas-Flores Gerardo: Resources, Conceptualization, Formal analysis, Supervision. Writing-original-draft. All authors reviewed the manuscript.

All authors agree to be accountable for all aspects of work, ensuring integrity and accuracy.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

CONACyT supported this work (with scholarship registration number 570377/CVU: 635513) granted to Jhovan Eduardo Miranda Nuñez as part of his Ph. D. studies in Experimental Biology at the Autonomous Metropolitan University Iztapalapa. We are grateful for the support of the Central Confocal Microscopy Unit and Experimental Animal Center of the DCBS at Autonomous Metropolitan University Iztapalapa and of the Ignacio Chavez Institute of Cardiology. Additionally, we thank the Sacromonte Chalchicomozco Civil Association. This research was partially supported by PRODEP-SEP (UAM-PTC-559 and UAM-PTC-600) and the Special Program Support to the Investigation, UAM-2019.

## References

Ahangarpour, A., Oroojan, A.A., Khorsandi, L., Kouchak, M., Badavi, M., 2018. Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12 cell. *Cell Stress Chaperones* 23, 773–781. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0888-z>.

Aravintan, A., Challis, B., Shannon, N., Hoare, M., Heaney, J., Alexander, G.J.M., 2014. Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Exp. Cell Res.* 331, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.025>.

Argueta, A., Gallardo-Vázquez, M.C., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, Ciudad de México, pp. 732–733.

Aryaeian, N., Sedehi, S.K., Arablou, T., 2017. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. *Med. J. Islam. Repub. Iran* 31, 886–892. <https://doi.org/10.14196/mjiri.31.134>.

Bazotte, R.B., Silva, L.G., Schiavon, F.P.M., 2014. Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle* 13, 2494–2500. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.947750>.

Bonnefont-Rousselot, D., 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 561–568. <https://doi.org/10.1097/00075197-200209000-00016>.

Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3).

Cazarolli, L.H., Pereira, D.F., Kappel, V.D., Folador, P., Figueiredo, M.D.S.R.B., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B., 2013. Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 712, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.029>.

Chandrasekaran, K., Swaminathan, K., Chatterjee, S., Dey, A., 2010. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicol. Vitro* 24, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.10.020>.

Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A. W., Malanda, B., 2018. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.

Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., López-Reyes, A., Domínguez-Pérez, M., Nuño, N., Domínguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V.M., Thorgerisson, S. S., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Gómez-Quiroz, L.E., 2013. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie* 95, 1177–1184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.005>.

Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2013. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via Akt and AMPK in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 974–985. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200500>.

da Rosa, M.S., da Rosa-Junior, N.T., Parmeggiani, B., Glänzel, N.M., de Moura Alvorcem, L., Ribeiro, R.T., Grings, M., Wajner, M., Leipnitz, G., 2020. 3-hydroxy-3-methylglutaric acid impairs redox and energy homeostasis, mitochondrial dynamics, and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in rat brain. *Neurotox. Res.* 37, 314–325. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00122-x>.

DeFronzo, R.A., Tripathy, D., 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, S157–S163. <https://doi.org/10.2337/dc09-s302>.

Eid, H.M., Nachar, A., Thong, F., Sweeney, G., Haddad, P.S., 2015. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn. Mag.* 11, 74–81. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149708>.

Espejel-Nava, A.J., 2014. Efecto de Tillandsia usneoides Linneo sobre la síntesis y secreción de insulina en células RINm5F. Master's thesis. Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico. <http://148.206.53.233/tesiumi/UAM16671.pdf>.

Funaki, M., Randhawa, P., Janmey, P.A., 2004. Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7567–7577. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7567-7577.2004>.

Garth, R.E., 1964. The ecology of spanish moss (Tillandsia usneoides): Its growth and distribution. *Ecology* 45, 470–481. <https://doi.org/10.2307/1936100>.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1365–1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>.

Honardoost, M., Arefan, E., Soleimani, M., Soudi, S., Sarookhani, M.R., 2016. Development of insulin resistance through induction of miRNA-135 in C2C12 cells. *Cell J* 18, 353–361. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4563>.

Hossain, C.M., Ghosh, M.K., Satapathy, B.S., Dey, N.S., Mukherjee, B., 2014. Apigenin causes biochemical modulation, GLUT4 and CD38 alterations to improve diabetes and to protect damages of some vital organs in experimental diabetes. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 9, 39–52. <https://doi.org/10.3844/ajtpsp.2014.39.52>.

Huang, X., Liu, G., Guo, J., Su, Z.Q., 2018. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>.

Jiang, H., Yamashita, Y., Nakamura, A., Croft, K., Ashida, H., 2019. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. *Sci. Rep.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38711-7>.

Kapoor, R., Kakkur, P., 2012. Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041663>.

Kappel, V.D., Cazarolli, L.H., Pereira, D.F., Postal, B.G., Zamoner, A., Reginatto, F.H., Silva, F.R.M.B., 2013. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1179–1186. <https://doi.org/10.1111/jphp.12066>.

Karim, S., Adams, D.H., Lalor, P.F., 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J. Gastroenterol.* 18, 6771–6781. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i46.6771>.

Keller, W.J., Bourn, W.M., Bonfiglio, J.F., 1981. A folk medicine for diabetes mellitus. *Pharm. Biol.* 19, 49–51. <https://doi.org/10.3109/13880208109070574>.

Kharroubi, A.T., Darwish, H.M., 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* 6, 850–867. <https://doi.org/10.4239/wjcd.v6.i6.850>.

Kim, G.H., Park, E.C., Yun, S.H., Hong, Y., Lee, D.G., Shin, E.Y., Jung, J., Kim, Y.H., Lee, K.B., Jang, I.S., Lee, Z.W., Chung, Y.H., Choi, J.S., Cheong, C., Kim, Soohyun, Kim, Seung, 2013. Proteomic and bioinformatic analysis of membrane proteome in

- type 2 diabetic mouse liver. *Proteomics* 13, 1164–1179. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200210>.
- Kim, M.S., Hur, H.J., Kwon, D.Y., Hwang, J.T., 2012. Tangeretin stimulates glucose uptake via regulation of AMPK signaling pathways in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in high-fat diet-induced obese mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.013>.
- Kim, S., Jung, J., Kim, H., Heo, R.W., Yi, C.O., Lee, J.E., Jeon, B.T., Kim, W.H., Hahm, J. R., Roh, G.S., 2014. Exendin-4 improves nonalcoholic fatty liver disease by regulating glucose transporter 4 expression in ob/ob mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18, 333–339. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.333>.
- Laguna-Hernández, G., Rfo-Zamorano, C.A., Meneses-Ochoa, I.G., Brechú-Franco, A.E., 2017. Histochemistry and immunolocalisation of glucokinin in antidiabetic plants used in traditional Mexican medicine. *Eur. J. Histochem.* 61, 125–134. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2782>.
- Lewis, D.S., Mabry, J.T., 1976. 3,6,3',5'-Tetramethoxy-5,7,4'-Trihydroxyflavone from *Tillandsia usneoides* 16, 1115–1116. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86764-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86764-3).
- Li, Ha., Ou, L., Fan, J., Xiao, M., Kuang, C., Liu, X., Sun, Y., Xu, Y., 2017. Rab8A regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation in C2C12 myoblasts. *Int. J. Lab. Hematol.* 591, 491–499. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>.
- Loza-Rodríguez, H., Estrada-Soto, S., Alarcón-Aguilar, F.J., Huang, F., Aquino-Jarquín, G., Fortis-Barrera, A., Giacoman-Martínez, A., Almanza-Pérez, J.C., 2020. Oleonic acid induces a dual agonist action on PPAR $\gamma$ / $\alpha$  and GLUT4 translocation: A pentacyclic triterpene for dyslipidemia and type 2 diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 883, 173252. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173252>.
- Martínez-Carrillo, M.A., Solís, C., Andrade, E., Isaac-Olivé, K., Rocha, M., Murillo, G., Beltrán-Hernández, R.I., Lucho-Constantino, C.A., 2010. PIXE analysis of *Tillandsia usneoides* for air pollution studies at an industrial zone in Central Mexico. *Microchem. J.* 96, 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.06.014>.
- Olson, A.L., 2012. Regulation of GLUT4 and insulin-dependent glucose flux. *ISRN Mol. Biol.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.5402/2012/856987>.
- Perry, B.D., Caldwell, M.K., Brennan-Speranza, T.C., Sbaraglia, M., Jerums, G., Garnham, A., Wong, C., Levinger, P., Asrar, M., Hare, D.L., Price, S., Levinger, I., 2016. Muscle atrophy in patients with T2DM role of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exerc Immunol Rev* 22, 94–109. <https://doi.org/10.1155/2017/3417306>.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E.F.T., Sousa, J.L.C., Tomé, S.M., Ramos, M.J., Silva, A.M.S., Fernandes, P.A., Fernandes, E., 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 1216–1228. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1368503>.
- Russo, B., Picconi, F., Malandrucchio, I., Frontoni, S., 2019. Flavonoids and insulin-resistance: From molecular evidences to clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms20092061>.
- Shokrzadeh, M., Abdi, H., Asadollah-Pour, A., Shaki, F., 2015. Nanoceria attenuated high glucose-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Cell J* 18, 97–102. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.3992>.
- Testa, R., Bonfigli, A.R., Genovese, S., De Nigris, V., Ceriello, A., 2016. The possible role of flavonoids in the prevention of diabetic complications. *Nutrients* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu8050310>.
- Tong, T., Ren, N., Soomi, P., Wu, J., Guo, N., Kang, H., Kim, E., Wu, Y., He, P., Tu, Y., Li, B., 2018. Theaflavins improve insulin sensitivity through regulating mitochondrial biosynthesis in palmitic acid-induced HepG2 cells. *Molecules* 23, 3382. <https://doi.org/10.3390/molecules23123382>.
- Wang, T., yang, Li, Q., Bi, K.shun, 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 13, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.
- Williams, C.A., 1978. The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the Bromeliaceae. *Phytochemistry* 17, 729–734. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94216-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94216-X).
- Witherup, K.M., McLaughlin, J.L., Judd, R.L., Ziegler, M.H., Medon, P.J., Keller, W.J., 1995. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of spanish moss (*Tillandsia usneoides*). *J. Nat. Prod.* 58, 1285–1290. <https://doi.org/10.1021/np50122a023>.
- Yadav, H., Devalaraja, S., Chung, S.T., Rane, S.G., 2017. TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway targets PP2A-AMPK-FoxO1 signaling to regulate hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 292, 3420–3432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764910>.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00131

Matricula: 2143800937

Efecto antihiperoglucémico de *Tillandsia usneoides* Linneo: posible participación de Flav1 sobre la translocación de GLUT2 Y GLUT4



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 13:00 horas del día 20 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado::

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA  
DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JHOVAN EDUARDO MIRANDA NUÑEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JHOVAN EDUARDO MIRANDA NUÑEZ  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

SECRETARIA

DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella