



Casa abierta al tiempo

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

**“Regulación de GLUT2 y GLUT4 en células hepáticas tratadas con
el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* Linneo”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Biólogo Experimental Jhovan Eduardo Miranda Núñez

Directores:

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesor:

Dr. Gerardo Blancas Flores

Noviembre 2016

“El programa de maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Para la realización de los estudios de maestría el alumno Jhovan Eduardo Miranda Núñez conto con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de CVU: 635513.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Farmacología y Fisiología Celular del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

I.- 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: **“Regulación de GLUT2 y GLUT4 en células hepáticas tratadas con el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* Linneo”**, que presentó:

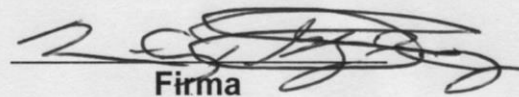
Jhovan Eduardo Miranda Núñez

El día 23 de Noviembre del año 2016

Sinodales

Presidente

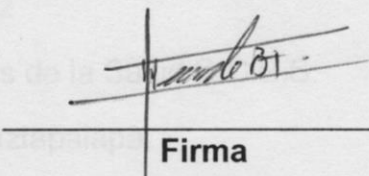
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz.
Profesora Titular C.
Depto. de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Firma

Secretario

Dr. Gerardo Blancas Flores.
Asociado D
Depto. de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Firma

Vocal 1

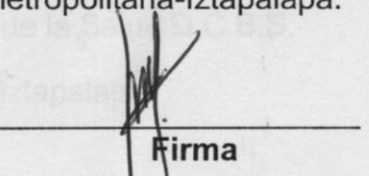
Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera.
Profesora Titular B
Depto. de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Firma

Vocal 2

Dra. María Flores Cruz.
Profesora Titular
Depto. Biología. Centro para la Sustentabilidad Incalli Ixcahuicopa “Centli”, Programa de Investigación Sierra Nevada, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Firma

II.- COMITÉ TUTORAL.

Directora

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva
Laboratorio de Farmacología, Depto. de Ciencias de la salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
mcaresvi@yahoo.com.mx

Director

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Laboratorio de Fisiología Celular, Depto. de Ciencias de la Salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
legq@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Gerardo Blancas Flores
Laboratorio de Farmacología, Depto. de Ciencias de la Salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.
gera@xanum.uam.mx

III.- DEDICATORIA.

Dedico el siguiente trabajo a mis **padres, hermanos y mi prometida (Stefany)** por ser la fuente de inspiración y motivación en mi vida. Por ser flexibles y solidarios brindándome siempre su apoyo incondicional a favor de mi superación profesional.

IV.- AGRADECIMIENTOS.

A **Dios**, por darme todas las armas para culminar esta meta.

A mi padre **Miguel**, A mi madre **Ericka**, que me han ofrecido el amor y la calidez necesaria para crecer como persona. Gracias por su paciencia, su dedicación y esfuerzo constante para que yo pudiera lograr cada uno de mis objetivos, por fomentar en mí, ideales y principios morales, así como ser parte importante de los cimientos para la construcción de una gran familia como la mía, llena de responsabilidad, sonrisas, cariño y deseos de superación.

A mis hermanos **Rubí, Miguel y Erick**, que con su apoyo he logrado salir adelante con felicidad en todas las circunstancias. Gracias por siempre creer en mi capacidad para conseguir este anhelado sueño.

A **Stefany**, que con su alegría, amor, apoyo, cuidado y consejos, colma mi vida de sonrisas ayudándome a superar cualquier obstáculo. La ayuda que me brindaste ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas, gracias por estar a mi lado. A tú

familia (**Carmen e Israel**) que con sus consejos han llenado mi vida de buenos valores orientándome por el camino del bien.

A mis amigos **Elizabeth, Erika, Maetzin, Beatriz, Wendoline, Diana, Felipe, Fabiola, Diana, Mayra, Consuelo, Arturo, Soraya y Abraham**, que con su sencillez me brindaron momentos inolvidables. Les agradezco que a pesar de los buenos o malos momentos siempre estuvieron a mi lado apoyándome y brindándome parte de su atención. Gracias por sus palabras de apoyo, de aliento y motivación, que día a día me fortalecieron para conseguir esta anhelada meta.

Al **Dr. Gerardo Blancas Flores**, por ser mi soporte en este camino tan arduo. Gracias por darme ese apoyo y motivación para superarme y cumplir con éxito mi carrera universitaria.

A la **Dr. María del Carmen Escobar Villanueva**, Al **Dr. Julio César Almanza Pérez** y a la **Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera**, por darme la atención necesaria y guiarme en esta etapa de mi vida.

Al **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz** y a la **Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**, que con su conocimiento, su tiempo y paciencia, me enseñaron el valor y el esfuerzo que se necesita para culminar esta etapa tan importante en mi vida. Gracias por su apoyo.

V.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

Akt/PKB: Proteína cinasa B

AS160: Proteína sustrato de Akt

CCF: Cromatografía en capa fina

ChREBP: Proteína de unión a los elementos de respuesta a carbohidratos

DM: Diabetes Mellitus

DT1: Diabetes Mellitus tipo 1

DT2: Diabetes Mellitus tipo 2

FFA: Ácidos grasos libres

FoXO1: Factor de transcripción forkhead

GI: Tracto gastrointestinal

GIP: Péptido inhibidor gástrico

G6F: Glucosa 6 fosfato

GLUT2: Transportador de glucosa tipo 2

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4

GLP-1: Péptido similar al glucagón-1

Grb2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

GSK-3 β : Cinasa de la glucógeno sintasa 3 beta

HMG: Acido 3-Hidroxi-3-Metilglutarico

HSC: Celulas estrelladas hepáticas

IFN- γ : Interferón γ

IRS: Sustrato receptor de insulina

K⁺ATP: Canal de K⁺ dependiente de ATP

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitogeno

MEC: Matriz extracelular

MPLC: Cromatografía líquida de media presión

mTORC1: Complejo 1 blanco de la rapamicina en mamíferos

NK: Natural Killer

PDK1: Cinasa dependiente de fosfoinositidos-1

PIP₃: Fosfatidil inositol trifosfato

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PI4, 5-P₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC: Proteína cinasa C

PP: Poli-péptido pancreático

PPARs: Receptores activados por la proliferación de peroxisomas

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

Rab: Proteína G pequeña

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa

SEC: Celulas Endoteliales Sinusoidales

SH2: De homología al dominio 2 de la proteína Src

SHP-2: Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

SK6: Proteína cinasa ribosomal S6

SREBP-1C: Proteína de unión de los elementos de respuesta de esteroides

TLR: Receptores tipo toll

TZDs: Tiazolidinedionas

VI.- ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Obtención del cultivo primario de hepatocitos.

Figura 2. CCF del extracto acuoso de *T. usneoides* y HMG.

VII.- ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Grafica 1. Prueba de viabilidad en cultivo primario de hepatocitos.

Grafica 2. Efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT2 en cultivo primario de hepatocitos.

Grafica 3. Efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT4 en cultivo primario de hepatocitos.

Grafica 4. Efecto del extracto acuoso sobre la actividad de GSK-3 β en cultivo primario de hepatocitos.

VIII.- ÍNDICE DE TABLA.

Tabla 1.- Secuencia de los Primers de GLUT2, GLUT4 y 36B4.

1.- RESUMEN.

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas que se caracterizan por niveles elevados de glucosa en sangre, como resultado de defectos en la secreción y/o acción a la insulina afectando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas generando hiperlipidemia e hiperglucemia. Esta patología se clasifica en cuatro tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1 (DT1), diabetes mellitus tipo 2 (DT2), diabetes gestacional (DG) y diabetes generada por factores genéticos y farmacológicos. La DT2 constituye aproximadamente el 80-90% de los casos de diabetes y se debe a una combinación de resistencia periférica a la acción de la insulina y una respuesta secretora inadecuada de las células β pancreáticas, generando un estado de intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina en tejido muscular, adiposo y hepático. A pesar de que en estos tejidos el balance energético es importante, el hígado es uno de los primeros órganos susceptibles a la hiperglucemia inducida, lo que puede conducir a la lesión de los tejidos de este órgano. El hígado contiene diferentes tipos celulares, sin embargo, los hepatocitos son el principal tipo de células en el hígado (~ 80%) y desempeñan muchas funciones vitales, las cuales están relacionadas con el metabolismo de glucosa principalmente, sin embargo, un desbalance en la captación y conversión de glucosa, puede ser clave en los pacientes con DT2. Por lo tanto, una incapacidad para responder a la insulina en los hepatocitos conduce a un aumento en el nivel de glucosa en sangre en pacientes con DT2.

Existen diversas terapias farmacológicas para contrarrestar los síntomas de la DT2, sin embargo, muchas de ellas no son efectivas para su control y es necesaria la alimentación adecuada y el ejercicio regular en el individuo. En las últimas tres décadas, a pesar de los importantes avances logrados en el tratamiento de la diabetes, el resultado del tratamiento en pacientes aún está lejos de ser perfecto. Estos tratamientos tienen algunas desventajas, incluyendo la resistencia a fármacos (reducción de la eficiencia), los efectos secundarios, e incluso toxicidad. A medida que transcurren los años su control metabólico de la DT2 es cada vez más difícil,

convirtiéndose en un problema de salud a nivel mundial. Esto nos ha llevado a continuar la búsqueda de nuevas alternativas para su control. En la medicina tradicional, uno de los recursos más utilizados por la población son las plantas medicinales. En México se ha reportado a *Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*) como una planta hipoglucemiante y se ha logrado demostrar experimentalmente su efecto hipoglucémico en ratones sanos, aunque en un modelo de células RINm5F, no se observó secreción de insulina, ni modificación en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, sugiriendo que posiblemente su mecanismo de acción no este directamente involucrado en las células β pancreáticas y posiblemente el efecto se genere en otros tipos celulares como las células hepáticas aumentando el flujo de transportadores de glucosa (GLUTs). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto del extracto acuoso de *T. usneoides*, sobre la expresión de RNAm de GLUT2 y GLUT4, así como la activación de proteínas involucradas en el metabolismo de glucosa (GSK-3 β) en cultivo primario de hepatocitos. Para cumplir los objetivos se aislaron hepatocitos de ratón (C57BL/6J) y una vez establecido el cultivo, la concentración del extracto acuoso a la cual fueron tratadas las células fueron 1 y 5 μ g/ml. Por otro lado, se incrementó la concentración de glucosa en el medio (25 mM) y se adicionaron las diferentes concentraciones del extracto. También se utilizó un tratamiento con pioglitazona (10 μ g) como control positivo. Después del tratamiento (1, 3, 6, 24 h) se cuantificó la expresión de GLUT2 y GLUT4 mediante RT-PCR en tiempo real y se midió la actividad de GSK-3 β (15 min).

Los resultados muestran que el extracto acuoso de *T. usneoides* más glucosa, produjo un aumento significativo en la expresión de GLUT2, así como un aumento en la activación de GSK-3 β en cultivo primario de hepatocitos. Por lo anterior, esto abre la posibilidad de que el extracto acuoso de *T. usneoides* esté actuando a nivel del transporte de glucosa aumentando la actividad de GLUT2, así como el almacenamiento de glucosa en glucógeno en tejido hepático.

2.- ABSTRACT.

Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic alterations which characterizes for high blood sugar levels as result from defective insulin secretion and/or action, affecting carbohydrates, lipids and proteins metabolism generating hyperlipidemia and hyperglycemia. This pathology is classified into four types: Diabetes Mellitus Type 1 (DT1), Diabetes Mellitus type 2 (DT2), Gestational Diabetes (GD), and Diabetes caused by genetic and pharmacologic factors. DT2 constitutes approximately 80-90% of cases due to a combination of peripheral resistance to the insulin action and an improper secretory response from the pancreatic β cells developing an impaired glucose tolerance estate or insulin resistance in muscular, adipose and hepatic tissue. Despite in these tissues the energetic balance is important, is the liver one of foremost organs susceptible to induced hyperglycemia, which could lead to an injury of the tissues from this organ. The liver contains different cell types, however, the hepatocytes are the main cell type in it (~80%) and play many vital functions, which are related mostly with the glucose metabolism, nevertheless, an unbalance in the conversion and uptake of glucose, could be a key in patients with DT2. Therefore, an incapability to response to insulin in hepatocytes bring an increase in the blood sugar levels in patients with DT2.

Currently exist many pharmacological therapies to counteract the symptoms of DT2, but many of them are not effective to control it, so, is necessary an adequate food intake and regular exercise to the patient. In the last three decades, in spite of important advances achieved in the diabetes treatment, the final result is far to be perfect. These treatments have some disadvantages, including the drug resistance (efficiency reduction), the side effects and toxicity. As the years go by, the metabolic control of DT2 is getting harder, becoming in a worldwide health problem. This has led us to continue the search of new alternatives to control it. Nowadays, in the traditional medicine, one of the most used resources from population are medicinal plants. In Mexico, has been reported that *Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*) as an hypoglycemic plant and has been demonstrated experimentally such effect in

healthy mice, although in a model with RINm5F cells was not observed insulin secretion or modification in the intracellular Ca^{2+} concentrations, suggesting that possibly its mechanism of action is not straightly involved in the pancreatic β cells and likely the effect is generated in other cellular types as the hepatic cells increasing the flux of glucose transporters (GLUTs).

Thus, the aim of this work is to evaluate the effect of aqueous extract from *T. usneoides*, over the GLUT2 and GLUT4 RNAm expression, as well as the activation of proteins involved in the glucose metabolism (GSK-3 β) in the primary culture of hepatocytes. To fulfil the objectives mice hepatocytes, were isolated (C57BL/6J) and established a primary culture, then, the glucose concentration was increased in the culture medium (25mM) and different cell cultures treatment with aqueous extract from *T. usneoides* at 1 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A cell culture treated with pioglitazone (10 μg), was used as positive control. After treatment (1, 3, 6, 24 h) the GLUT2 and GLUT4 expression was quantified using real-time RT-PCR, and the GSK-3 β activity was measured (15min).

The results show that the aqueous extract of *T. usneoides* plus glucose, promotes a significant increase in the GLUT2 expression as wells as an increase in the GSK-3 β activation in the primary culture of hepatocytes. The above suggest that aqueous extract is acting at glucose transport level, increasing the GLUT2 activity, furthermore of the glucose storage as glycogen in hepatic tissue.

ÍNDICE.

I.- MIEMBROS DEL JURADO.....	3
II.- COMITÉ TUTORAL.....	4
III.- DEDICATORIA.....	5
IV.- AGRADECIMIENTOS.....	5
V.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
VI.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
VII.- ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	10
VIII.- ÍNDICE DE TABLA.....	10
1.- RESUMEN.....	11
2.- ABSTRACT.....	13
3.- INTRODUCCIÓN.....	18
3.1.-Diabetes Mellitus (DM).....	19
3.2.- Morfología y anatomía del hígado.....	20
3.3- Tipos celulares del hígado.....	22
3.3.1.- Células Endoteliales Sinusoidales (SEC).....	22
3.3.2.- Células de Kupffer.....	22
3.3.3.- Células Estrelladas.....	23
3.3.4.- Células Pit.....	24
3.3.5.- Hepatocitos.....	25
3.4.- Metabolismo de glucosa en hepatocitos.....	26
3.5.- Mecanismo de acción de la insulina en hepatocitos.....	27
3.6.- Mecanismo de resistencia a la insulina.....	29

3.7.-Terapias farmacológicas y plantas medicinales.	30
4.- Antecedentes.	33
5.- Justificación.	35
6.- Pregunta de investigación.	36
7.- Hipótesis.	37
8.- Objetivo general.	37
9.- Objetivos particulares.	37
10.- Metodología.	38
10.1.- Obtención del material vegetal (<i>T. usneoides</i>).	38
10.2.- Obtención del extracto acuoso.	38
10.3.- Estandarización del extracto acuoso mediante cromatografía en capa fina (CCF).	39
10.3.1.- Condiciones cromatográficas.	39
10.3.2.- Preparación del revelador para CCF.	39
10.4.- Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios.	39
10.5.- Análisis de la viabilidad celular.	41
10.6.-Tratamientos.	41
10.7.- Extracción del ARN total.	41
10.7.1.- Cuantificación de la expresión de los transportadores GLUT2 y GLUT4.	42
10.8.- Identificación de la proteína GSK-3 β	43
10.8.1.- Extracción de la proteína total.	43
10.8.2.- Determinación del contenido de proteína.	43
10.8.3.- Análisis por Western blot.	44
11.- Análisis estadístico.	45

12.- Resultados.....	45
12.1.- Análisis y estandarización del extracto acuoso de <i>T. usneoides</i>.....	45
12.2.- Curva de viabilidad en cultivo primario de hepatocitos, tratadas con el extracto acuoso de <i>T. usneoides</i>.....	46
12.3.- Efecto del extracto acuoso de <i>T. usneoides</i>, sobre la expresión de GLUT2 y GLUT4 en cultivo primario de hepatocitos.	47
12.4.- Efecto del extracto acuoso de <i>T. usneoides</i>, sobre la actividad de GSK-3β en cultivo primario de hepatocitos.....	50
13.- Discusión.....	51
14.- Conclusiones.	59
15.-Perspectivas.....	60
16.-Bibliografía.	61

3.- INTRODUCCIÓN.

El páncreas, es un regulador en la absorción y utilización de nutrientes durante la digestión, esta glándula mixta se compone de dos distintos tejidos que funcionalmente y morfológicamente son diferentes, la porción exocrina (99%) y la endocrina (1%). El páncreas exocrino consta de células acinares y ductales que liberan pro-enzimas (tripsinógeno, quimiotripsinógeno, amilasa pancreática) al duodeno, estas cumplen la función de facilitar la digestión de los alimentos, por otro lado el páncreas endocrino se encuentra disperso en el parénquima exocrino y se forma de islotes de Langerhans que se componen de cinco tipos celulares: células α (35 %), β (50%), δ (10%), poli-péptido pancreático (PP) (4%) y células ϵ (1%). En los roedores, el 80% de las células de los islotes están formados por células β , las cuales son consideradas como la única fuente de secreción de insulina. Las otras células (α , δ , ϵ y células PP) secretan glucagón, somatostatina, grelina y PP, respectivamente (Rorsman *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). En condiciones normales, el mecanismo por el cual se estimula la liberación de la insulina en la célula β requiere de la entrada inicial de glucosa en la célula a través de un transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) asociado a la glucocinasa que al fosforilar a la glucosa constituye el sensor esencial para que se libere insulina. La reducción y disfunción de las células β y la insuficiencia en la secreción de insulina trae consigo un déficit en los mecanismos de compensación de la célula en los tejidos periféricos, generando un estado de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, los cuales son componentes centrales de la patogénesis de la diabetes mellitus (Rodríguez, 2003; Gannon *et al.*, 2015).

3.1.-Diabetes Mellitus (DM).

La DM es un conjunto de alteraciones metabólicas que se caracteriza por deficiencias en la secreción de insulina, así como una respuesta inadecuada en la secreción de insulina generada por las células β pancreáticas. Esta enfermedad es la causa principal de muerte en el mundo. Además, es una de las causas principales de morbilidad que conduce a complicaciones microvasculares (retinopatías, nefropatías y neuropatías) y macrovasculares (enfermedades vasculares periféricas) (Qaseem *et al.*, 2012; Eid *et al.*, 2015). Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México ocupan el sexto lugar a nivel mundial y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país. Los datos de la ENSANUT en el 2012, identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico. En total las personas adultas podrían aumentar e incluso ser el doble de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición. Más del 65% de los pacientes con DM mueren de enfermedades cardiovasculares o accidentes cerebrovasculares (Hernández *et al.*, 2012). La hiperglucemia, ya sea debido a reducción de la secreción de insulina o sensibilidad reducida a esta hormona es la característica distintiva de la DM. La disfunción vascular es un efecto distintivo encontrado en esta enfermedad y podría ser responsable de la alta incidencia de accidentes cerebrovasculares, ataques al corazón y el daño a órganos en pacientes diabéticos (Fernández *et al.*, 2014). La DM puede ser clasificada en 4 grupos: la diabetes gestacional, por factores genéticos y farmacológicos, diabetes mellitus tipo 1 (DT1) y diabetes mellitus tipo 2 (DT2) (López, 2006). La DT2 resulta de un defecto progresivo en la secreción de insulina, generalmente se acompaña de resistencia a la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo y la desregulación de la gluconeogénesis hepática (Ji *et al.*, 2010).

Durante una respuesta normal a la insulina, esta hormona actúa para estimular la captación de glucosa a través de cascadas enzimáticas intracelulares que dan lugar

a la difusión facilitada por los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) predominante en el músculo esquelético, mientras que en células hepáticas se encuentran los GLUT2, y aunque GLUT4 sea dependiente de insulina también se expresa en hígado (Kim *et al.*, 2014; Gannon *et al.*, 2015). A pesar de que en estos tejidos el balance energético es importante, el hígado es uno de los primeros órganos susceptibles a la hiperglucemia inducida, lo que puede conducir a la lesión de los tejidos del hígado. Esto es seguido por alteraciones en el metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo y aún más la activación de la cascada inflamatoria (Jamaludin *et al.*, 2016).

3.2.- Morfología y anatomía del hígado.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo. En humanos, el hígado se separa de forma incompleta en cuatro lóbulos (derecha, izquierda, caudado y cuadrado) cubiertos en sus superficies externas por una cápsula delgada de tejido conectivo (Cápsula de Glisson), parecida al peritoneo. En 1833 se propuso que el hígado de cerdo se organiza en torno a las principales ramas de la vena porta y se compone por pequeñas unidades morfológicas de parénquima poliédrico, llamado lóbulos clásicos, con fronteras hechas de tejido conectivo (Kmiec, 2001). El lóbulo hepático clásico se caracteriza por la presencia de una vena situada aproximadamente en el centro, donde áreas de tejido conectivo se encuentran en sus esquinas, llamados espacios porta, estos espacios contienen ramas interlobulillares de la arteria hepática, la vena porta, conductillos biliares, vasos linfáticos y nervios. Los tractos portales, se encuentran puenteados por pequeñas tiras de tejido conectivo, que se encuentran acompañadas de arterias terminales aferentes y tiras venosas que corren entre los lóbulos para suplementar los sinusoides, dejando así la sangre en la vena central y drenando el lóbulo. Sin embargo, las fronteras periféricas de estos lóbulos se encuentran mal definidos en la mayoría de las especies, incluido el hombre (McCuskey *et al.*, 2010).

Dentro de los lóbulos hepáticos, la heterogeneidad del parénquima a lo largo del eje venoso portal y central resulta en una intralobulillar zonación metabólica con diferentes funciones celulares, representado en diferentes zonas dentro de cada lóbulo. Esta zonificación de funciones enzimáticas se refleja también estructuralmente con diferencias en las mitocondrias y retículo endoplásmico entre las diferentes zonas (Treyer *et al.*, 2013).

El hígado desempeña muchas funciones vitales, las cuales están relacionadas con el metabolismo. Este órgano contiene diferentes tipos celulares entre ellas células del parénquima o hepatocitos y células no parenquimatosas. Las células hepáticas no parenquimatosas, que contribuyen sólo el 6,5% del volumen del hígado se localizan en el compartimiento sinusoidal del tejido. Internamente, el hígado se compone de varios tipos celulares, que interactúan entre sí, pero están adaptadas para realizar funciones específicas (Kmiec, 2001). El tipo celular principal en el hígado es el hepatocito que compone al parénquima hepático representando el 60% de la población total de células y el 80% del volumen del órgano. Las células del parénquima se organizan en placas o láminas que están interconectadas para formar una continua red tridimensional. Dentro de estos espacios se encuentra una red de intercambio llamada sinusoides que nutre cada parénquima de células en diferentes lados (Maslaka *et al.*, 2015). El espacio sinusoidal y el revestimiento sinusoidal comprenden la mayor parte del volumen del hígado restante. Las células endoteliales sinusoidales (SEC) representan el 44% del volumen celular sinusoidal total, mientras 22% son células estrelladas perisinusoidales (células que almacenan grasa o Ito), y 33% son células de Kupffer. Los linfocitos y células natural killer (NK) comprenden el restante 1% del volumen celular sinusoidal. En contraste con los hepatocitos que ocupan casi el 80% del volumen total del hígado y realizan la mayoría de funciones hepáticas (McCuskey *et al.*, 2010).

3.3- Tipos celulares del hígado.

3.3.1.- Células Endoteliales Sinusoidales (SEC).

Las SEC difieren en muchos aspectos estructurales y funcionales de otras células endoteliales del cuerpo. Estas células no tienen una membrana basal regular, y con frecuencia se encuentran en contacto con los procesos citoplasmáticos de las células estrelladas hepáticas subyacentes. SEC constituye una importante barrera de filtración de macromoléculas y células sanguíneas presentes en el lumen sinusoidal que impide su directo contacto con los hepatocitos, determinando el intercambio de diversas sustancias. Se cree que la función principal de SEC es formar una barrera general contra agentes patógenos y servir como una barrera selectiva para sustancias que pasan de la sangre a las células del parénquima y células estrelladas. (Braet *et al.*, 2002; Maslaka *et al.*, 2015) El filtrado es mucho mayor por una gran capacidad basada en la endocitosis mediada por receptor y el metabolismo intercelular de una amplia gama de macromoléculas, incluyendo glicoproteínas, lipoproteínas y componentes de la matriz extracelular. SEC constituyen un componente importante de la compleja red de interacciones celulares en el hígado a través de la secreción de muchas sustancias y actividad a muchas señales recibidas por las células vecinas. Las características estructurales indican que SEC poseen una alta capacidad pinocítica y endocítica para fluidos, moléculas y partículas pequeñas (DeLeve, 2013).

3.3.2.- Células de Kupffer.

Las células de Kupffer o macrófagos residentes del hígado, se encuentran dentro de la luz de los sinusoides. Las células de Kupffer representan la mayor población de macrófagos en el cuerpo de los mamíferos y son en gran parte responsables de la

limpieza de la sangre. Estos macrófagos hepáticos secretan una serie de mediadores que interactúan de una manera paracrina con las células vecinas, principalmente hepatocitos y las células estrelladas. Morfológicamente tienen un núcleo en forma de frijol y abundante citoplasma que contiene muchos lisosomas heterogéneos bien desarrollados y vesículas pinocíticas. Estas características estructurales reflejan el papel prominente de estas células en la degradación de las partículas y sustancias tomadas de la circulación sanguínea (Bilzer, *et al.*, 2006).

Las células de Kupffer, en virtud de su ubicación en la corriente principal del flujo sanguíneo, están posicionadas para recibir una exposición constante a los mediadores derivados del intestino conocidos para activar macrófagos. De las muchas sustancias que activan a las células de Kupffer fisiológicamente las más importantes son las endotoxinas bacterianas intestinales (lipopolisacáridos) que llegan al hígado a través del sistema de la vena porta (Kolios *et al.*, 2006). Es posible que las células de Kupffer, constantemente se encuentren expuestas a bajos niveles de productos bacterianos derivadas del intestino. De manera similar a otros macrófagos las células de Kupffer son muy activas en procesos de endocitosis y fagocitosis debido a la presencia de numerosos receptores de membrana celular. También pueden funcionar en las defensas anti-tumorales y presentar actividad citotóxica (Dixon *et al.*, 2016).

3.3.3.- Células Estrelladas.

Actualmente estas células son conocidas por una variedad de sinónimos (células que almacenan vitamina A, lipocitos, células que almacenan grasa, pericitos del hígado y células perisinusoidales), sin embargo, las células estrelladas hepáticas (HSC), se han utilizado recientemente. HSC se encuentran en el espacio de Disse en la proximidad directa a la capa de células endoteliales con su cuerpo celular entre los hepatocitos (Senoo, 2004). La característica estructural de las HSC es la presencia

en el citoplasma de numerosas gotitas de lípidos, que existen unidas a la membrana y las formas no unidas a la membrana, su principal composición de estas gotas son retinoides (esteres de retinól), triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres. La formación, el tamaño y el número de gotitas de lípidos dependen de las circunstancias fisiológicas, especie y dieta. En un hígado humano normal las gotas de lípidos contribuyen el 20.5% del volumen de las células estrelladas (Kmiec, 2001).

Las HSC podrían influir en el flujo sanguíneo sinusoidal a través de la contracción y dilatación de la luz sinusoidal. En condiciones fisiológicas son consideradas grandes productoras de matriz extracelular (MEC) macromoléculas y enzimas que degradan la MEC. Las interacciones entre HSC y otros tipos de células del hígado, así como los componentes de MEC, desempeñan un papel central en la reparación del tejido hepático como resultado del daño hepático agudo o crónico (Friedman, 2010).

3.3.4.- Células Pit.

Las células Pit a menudo se encuentran en el lumen sinusoidal. Ellas están en contacto con las células de Kupffer o con las células endoteliales sinusoidales. Estas células también se les conoce como NK específicas del hígado que poseen alto nivel de actividad citotóxica, contra una variedad de líneas de células tumorales, ya que pueden mejorar la actividad antitumoral a través de la secreción de interferón γ (IFN- γ), una citocina multifuncional que ejerce su actividad citotóxica en las células tumorales directamente o indirectamente a través de la estimulación de las células efectoras tales como macrófagos (Kmiec, 2001; McCuskey *et al.*, 2010).

Aunque es imposible asignar órdenes de importancia a tipos celulares específicos, son los hepatocitos o células del parénquima que llevan a cabo las funciones generalmente asociadas con el hígado (Nakatan *et al.*, 2004).

3.3.5.- Hepatocitos.

Los hepatocitos, constituyen el principal compartimento celular del hígado y pueden estar consideradas como las células efectoras, ya que la mayoría de las funciones del hígado podrían atribuirse a su actividad. El hepatocito es una célula multifacética poliédrica con ocho o más superficies. Su diámetro varía entre 25 a 30 μm de longitud y de 20 a 25 μm de ancho. Muchos hepatocitos del hígado en mamíferos pueden ser binucleados o poliploides. Hay algunas diferencias en estructura de los hepatocitos que están relacionados con la ubicación en el lóbulo del hígado, por ejemplo, mayor número y dimensiones de las mitocondrias en los hepatocitos periportales en comparación con hepatocitos perivenosos reflejando su mayor actividad metabólica (Treyer *et al.*, 2013). Las células del parénquima hepático participan casi en todas las funciones que se han atribuido al hígado. Los hepatocitos son las únicas células que inactivan amoníaco tóxico en el ciclo de la urea. Células del parénquima hepático sintetizan la mayor parte de las proteínas séricas, incluyendo componentes del complemento, compuestos importantes de la respuesta inmunológica innata. También desempeñan un papel importante en el metabolismo de lípidos exógenos y endógenos a través de la síntesis de muchas clases de lipoproteínas y el catabolismo de colesterol derivado de la sangre (Kmiec, 2001).

Las células del parénquima del hígado participan en la defensa contra el estrés oxidativo, y son responsables de la desintoxicación de numerosas sustancias endo y exógenas. La producción de componentes de la bilis, tales como ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y bilirrubina conjugada, se lleva a cabo también en los hepatocitos. La reactividad de las células del parénquima del hígado hacia la multiplicidad de señales hormonales, paracrinas y autocrinas es de suma importancia para el control de las funciones del hígado. Sin embargo, los hepatocitos desempeñan un papel fundamental en el metabolismo y homeostasis de la glucosa mediante el mantenimiento de las concentraciones de la misma en plasma (McCuskey *et al.*, 2010; Liangyou, 2014).

La comprensión de muchas de las funciones específicas del hígado, generada inicialmente por estudios bioquímicos, se ha ampliado en gran medida durante los últimos 30 años por la introducción de métodos eficaces de aislamiento de células hepáticas parenquimatosas. Aunque el mantenimiento de todas las funciones específicas de las células del parénquima *in vitro* era difícil de obtener, cultivos primarios de hepatocitos han proporcionado gran cantidad de información acerca de los factores que controlan el metabolismo de glucosa en el hígado (Clayton *et al.*, 2005).

3.4.- Metabolismo de glucosa en hepatocitos.

El hígado es un órgano metabólico clave que regula el metabolismo de energía del cuerpo y actúa para conectar metabólicamente a varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético y tejido adiposo. Durante la ingesta de alimentos, estos se digieren en el tracto gastrointestinal (GI), donde la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos son absorbidos en el torrente sanguíneo y son transportados al hígado a través del sistema de circulación de la vena porta. La glucosa en sangre entra en los hepatocitos a través de GLUT2, un transportador de glucosa de la membrana plasmática. GLUT2 también media la liberación de glucosa desde el hígado, sin embargo, la supresión de GLUT2 no afecta la producción hepática de glucosa en estado de ayuno (Kim *et al.*, 2014; Bazottea *et al.*, 2014), lo que sugiere que la glucosa es capaz de ser liberada de los hepatocitos a través de transportadores adicionales (por ejemplo, GLUT1) o por otros mecanismos. También la participación de GLUT4 es importante, ya que durante la ingesta de alimentos la insulina promueve la movilización de GLUT4 a la membrana plasmática del hepatocito favoreciendo la entrada de glucosa al interior de la célula (Gannon *et al.*, 2015). La glucosa una vez que ingresa al interior del hepatocito es fosforilada por la glucocinasa para generar glucosa 6-fosfato (G6P), esto conduce a una reducción en las concentraciones de glucosa intracelulares. Por otra parte, G6P no es capaz de

ser transportada por transportadores de glucosa, por lo que se retiene dentro de los hepatocitos y G6P actúa como un precursor para la síntesis de glucógeno, así como un inhibidor alostérico de la glucógeno fosforilasa y un activador alostérico de la glucógeno sintasa, lo que aumenta aún más los niveles del glucógeno hepático (Liangyou, 2014). La fosforilación de la glucógeno sintasa, principalmente por la cinasa de la glucógeno sintasa 3 beta (GSK-3 β), inhibe la actividad de la glucógeno sintasa generando que la síntesis de glucógeno aumente.

Durante la ingesta de alimentos, las células β pancreáticas secretan insulina en respuesta a un aumento de la glucosa en sangre, aminoácidos y ácidos grasos. La insulina estimula a la glucógeno sintasa mediante la activación de Akt que fosforila e inactiva a GSK-3 β , aumentando así la síntesis de glucógeno, un mecanismo que se le tomara relevancia más adelante (Obel *et al.*, 2012; Gissen *et al.*, 2015).

3.5.- Mecanismo de acción de la insulina en hepatocitos.

La exposición de los hepatocitos a la insulina conduce a la captación, conversión y almacenamiento de la glucosa en glucógeno o lípidos e inhibición tanto de la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Kim *et al.*, 2014). En hepatocitos y otras células, los efectos de la insulina están mediados a través de dos principales vías celulares, la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt (PI3K/Akt) o proteína cinasa B (PKB) y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPK). PI3K/Akt media las acciones metabólicas de la insulina, mientras que la vía MAPK/Ras, en relación con la vía PI3K/Akt, regula el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Bajo condiciones normales, la activación de la vía PI3K/Akt por la insulina regula cuatro vías cruciales corriente abajo, una de ellas es la activación del complejo 1 blanco de la rapamicina en mamíferos (mTORC1) y la proteína cinasa ribosomal S6 (SK6), así como la inactivación tanto de la GSK-3 β , proteína sustrato de Akt (AS160) y el factor nuclear FoxO1 (Welberg *et al.*, 2005; Gannon *et al.*, 2015). La vía del PI3K es el

principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. En hepatocitos la transducción de señales a través de la vía de PI3K se inicia cuando el receptor activo interacciona con el sustrato receptor de insulina (IRS) y este es fosforilado. Adicionalmente, los IRSs se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios de homología al dominio 2 de la proteína Src (SH2), muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras como es el caso de PI3K, proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2), proteína tirosina fosfatasa con homología a Src (SHP-2), entre muchas otras. El PI3K, es un heterodímero que consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110) (Aravinthan *et al.*, 2015). Las subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2, los cuales se unen al sustrato receptor de insulina IRS-1, provocando la activación de la unidad catalítica fosforilando al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI4, 5-P₂) en la posición 3 del inositol generando PI3, 4, 5- trifosfato (PIP₃). El PIP₃ sirve como sitio de unión para cinasas de serina (Ser) y treonina (Thr) como la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) y Akt. En el caso de la cinasa Akt, después de su reclutamiento a la membrana plasmática es fosforilada en dos residuos como Ser⁴⁷³ y la Thr³⁰⁸. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina, y uno de los mecanismos de acción y aun sin comprender en su totalidad es la regulación del transporte de glucosa en células adiposas, musculares y hepáticas, esta señalización promueve la translocación de GLUT4 de compartimientos intracelulares a la membrana plasmática, por la vía de activación del PI3K/Akt favoreciendo la entrada de glucosa en el hepatocito (Olivares, 2008; Dupont *et al.*, 2016). El tráfico de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática depende de varios mecanismos entre los cuales se encuentra la participación de la proteína AS160, esta proteína en un estado no fosforilado inhibe la actividad de las proteínas G pequeñas como Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4 (Gannon *et al.*, 2015). Cuando AS160 es fosforilado por Akt se inhibe, provocando que el tráfico vesicular de Rab se active, generando el transporte de glucosa al interior de la célula, sin embargo, no se conoce si AS160 está implicado en la regulación de

GLUT2 por acción de la insulina pero este transportador si depende de glucosa como el principal estímulo para su expresión en células hepáticas (Aravinthan *et al.*, 2015).

Los niveles de glucosa en sangre (60-110 mg/dL) son controlados por la insulina, que regula tanto la absorción de glucosa y la síntesis de glucógeno en el hígado. Por lo tanto, una incapacidad para responder a la insulina en las células hepáticas conduce a un aumento en el nivel de glucosa en sangre en pacientes con DM. La GSK-3 β es una enzima clave que regula la inhibición de la glucógeno sintasa, esto conduce a una disminución en la síntesis de glucógeno en hepatocitos (Bnouham *et al.*, 2006). La activación de Akt genera la fosforilación de GSK-3 β provocando su inactivación, por lo tanto, la activación de GS conduce a la síntesis de glucógeno. De hecho, la inhibición de GSK-3 β aumenta la síntesis de glucógeno y la sensibilidad a la insulina, lo que indica que la vía de señalización GSK-3 β /Akt juega un papel importante en la regulación de la patogénesis y el progreso de la DM (Inhikawa *et al.*, 2013). La proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), es un factor de transcripción recientemente identificado que media la transcripción inducida por la glucosa. En los hepatocitos, el metabolismo de la glucosa proporciona xilulosa 5-fosfato, un activador de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que desfosforila el factor de transcripción ChREBP, el cual se transporta al núcleo para activar la transcripción de genes sensibles a glucosa. Curiosamente, el promotor GLUT2 no parece contener una secuencia de unión a ChREBP, sino más bien se une a la proteína de unión de los elementos de respuesta de esteroides (SREBP-1C). De hecho, SREBP-1C induce la transcripción de algunos genes lipogénicos (Leturque *et al.*, 2009).

3.6.- Mecanismo de resistencia a la insulina.

El hígado es un regulador para la captación y almacenamiento de la glucosa y es susceptible a los altos niveles de ácidos grasos (FFA). El exceso de FFA, resulta en la acumulación de diacilglicerol intracelular, conduciendo a la activación de la

proteína cinasa C (PKC). PKC induce resistencia a la insulina mediante la inhibición de la proteína IRS (Fayyas *et al.*, 2014). Por otro lado, los FFA generan la activación de receptores tipo toll (TLR) conduciendo al aumento de la síntesis de ceramida y su acumulación en el hígado genera la inhibición de la fosforilación de Akt. Sin embargo, los FFA pueden causar la activación de la PP2A produciendo resistencia a la insulina por la desfosforilación e inactivación de Akt, generando que el factor de transcripción FoxO1 sea transportado al núcleo e induzca la transcripción de enzimas claves en la gluconeogénesis (Bazottea *et al.*, 2014). Sin embargo, el metabolismo energético del hígado está estrechamente controlado. Múltiples señales hormonales y neuronales se han identificado para regular el metabolismo de la glucosa, lípidos y aminoácidos en el hígado. Disfunción de la señalización y metabolismo del hígado causa o predispone a la DT2 (Liangyou, 2014).

3.7.-Terapias farmacológicas y plantas medicinales.

El tratamiento adecuado de la DT2 con terapias farmacológicas y no farmacológicas es importante e incluye la educación del paciente y la evaluación de las complicaciones microvasculares y macrovasculares. Los fármacos ayudan a contrarrestar los síntomas de la DT2, aunque solo aquellos pacientes que no respondan adecuadamente a un régimen dietético y de actividad física deberán ser tratados con estos fármacos (Qassem *et al.*, 2012). Existe una amplia clasificación farmacológica entre los cuales se destacan: las sulfonilureas, estas moléculas son ácidos débiles y se unen ampliamente a proteínas (> 90%), son metabolizadas en el hígado y excretadas a través del riñón o por las heces. Se unen a receptores de alta afinidad en las membranas de las células β , resultando en el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (K^+_{ATP}). Esto causa la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} a la célula, provocando la activación de la maquinaria secretora de insulina independiente de la concentración de glucosa. Todas las sulfonilureas están relacionadas con ganancia de peso. Los agentes de primera generación son:

tolbutamida, acetoexamida, tolazamida y cloropropamida. Estos fármacos se caracterizan por unirse iónicamente a proteínas en el plasma, lo cual incrementa el riesgo de interacciones medicamentosas, principalmente con alcohol, cloranfenicol, acetazolamida, inhibidores de MAO, fenotiazinas, propranolol, rifampicina, salicilatos, sulfonamidas y algunos antiinflamatorios no esteroideos. Los agentes de segunda generación como: glibenclamida, gliclazida, glipizida, y glimepirida. No se unen iónicamente a proteínas, y es menos probable que interaccionen con otros fármacos (Escorcia, 2009; Singh *et al.*, 2016).

Las biguanidas incluyen a la fenformina y metformina, ambas son derivadas de la guanidina, el componente activo de lila francesa (*Galega officinalis*). Su actividad anti-hiperglucémica se debe principalmente al mecanismo de acción en otros órganos potenciando los efectos metabólicos de la insulina en ellos. Además, incrementan el transporte de glucosa al interior de la célula (aumenta la oxidación) (Tahrani *et al.*, 2010). En el hígado, la metformina inhibe la gluconeogénesis y reduce la hiperglucemia postprandial al retardar la absorción de la glucosa en el sistema gastrointestinal (Apovian, 2011).

Los inhibidores de la α -glucosidasas como la acarbosa (pseudotetrasacárido de origen microbiano), el miglitol (derivado de la deoxynojirmycina) y la voglibosa (derivado de la valiolamina), de los cuales sólo los dos primeros se usan actualmente en la práctica clínica. La acarbosa es un potente inhibidor competitivo de la α -glucosidasa y actúa reduciendo la absorción de carbohidratos en el intestino (Lopez, 2005). Al disminuir la absorción de carbohidratos complejos, disacáridos y monosacáridos reducen los picos de glucosa postprandial en sangre. Se ha comprobado como la administración de acarbosa incrementa la liberación intestinal del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y una disminución en la secreción del péptido inhibidor gástrico (GIP), también se tiene evidencia que el GLP-1 estimula la liberación de insulina y disminuye la secreción pancreática de glucagón, al mismo

tiempo que produce un retardo del vaciamiento gástrico (Hoimark *et al.*, 2012; Hernández, 2012).

Las tiazolidinedionas (TZDs), incluyen una serie de fármacos como, rosiglitazona y pioglitazona. Estos fármacos están dirigidos a reducir la resistencia a la insulina e incrementar la actividad del receptor de insulina. Las TZDs funcionan como agonistas de los receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs), mejorando la sensibilidad a la insulina mediante el incremento de la lipogénesis en el tejido adiposo, reduciendo el contenido de grasa y disminuyendo la producción de glucosa en el hígado (Zhang *et al.*, 2014). Los agonistas altamente selectivos que combinan los efectos terapéuticos son PPAR- α y PPAR- γ que incrementan la eficacia en el tratamiento de la DT2. A pesar de las grandes expectativas iniciales en algunos de estos medicamentos, sus efectos secundarios adversos han sido motivo de que algunos sean retirados del mercado (Krentz *et al.*, 2005).

En las últimas tres décadas, a pesar de los importantes avances logrados en el tratamiento de la diabetes, el resultado del tratamiento en pacientes aún está lejos de ser perfecto. Estos tratamientos tienen algunas desventajas, incluyendo la resistencia a fármacos (reducción de la eficiencia), los efectos secundarios, e incluso toxicidad. Por ejemplo, sulfonilureas pierden su eficacia después de 6 años de tratamiento en el 44% de los pacientes (Singh *et al.*, 2016). También se dice que los fármacos reductores de la glucosa no son capaces de controlar la hiperlipidemia. Se recomienda hoy en día, muchos tratamientos que implican el uso de plantas medicinales. En numerosos países en desarrollo la medicina tradicional cumple una función importante para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud de la población, y durante mucho tiempo se han utilizado formas de medicina tradicional específicas. Debido a la popularidad de este tipo de terapia, es que la Organización Mundial para la Salud, considera que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud ya que representa

una fuente abundante de sustancias biológicamente activas que se pueden aplicar para prevenir enfermedades humanas (OMS, 2002-2005; Sánchez, 2013).

En la actualidad, un creciente número de estudios se han centrado en los extractos de hierbas o productos naturales, y muchos de estos estudios han descubierto productos a base de plantas con efectos potentes contra algunas enfermedades (Bnouham *et al.*, 2006). Por este motivo es que las personas recurren a la medicina tradicional como una fuente alternativa para contrarrestar los síntomas de la diabetes. En México se tienen registradas hasta la fecha más de 300 especies vegetales de unas 70 familias diferentes usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, según información etnobotánica registrada en el Herbario medicinal del IMSS (Alarcon *et al.*, 1998; Muñetón, 2009). Muchos estudios han confirmado los beneficios de las plantas medicinales con efectos hipoglucemiantes en la generación de la DM y muchas plantas pueden contribuir a la prevención de varias enfermedades crónicas no transmisibles que aquejan a la población (Mercado *et al.*, 2013).

4.- Antecedentes.

La medicina herbolaria se utiliza en conjunto con los medicamentos farmacológicos, por diferentes razones, ya que incluyen disponibilidad y bajo costo, se considera que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud y destaca la importancia de establecer las bases científicas que sustenten la seguridad, efectividad y calidad necesarias para su administración en humanos. Una planta frecuentemente utilizada en los estados de Veracruz e Hidalgo (México) y en el norte de Luisiana (E.U.A) para curar los síntomas de la diabetes es *Tillandsia usneoides* Linneo (*T. usneoides*), conocida comúnmente como heno. Esta planta pertenece a la familia de las Bromeliáceas y principalmente la

utilizan en la obtención de fibra (Hornung, 2011). Estudios han demostrado que el extracto clorofórmico de *T. usneoides* contiene algunos compuestos como 5,3 9-Dihidroxi-6, 7, 8, 49-tetrametoxiflavanona, 1,3-di-O-cinnamoilglicerol y ácido caféico, donde algunos investigadores han propuesto que estos compuestos pueden ser activos y puedan tener un efecto hipoglucémico (de Queiroga *et al.*, 2004). Sin embargo, hay indicios de usos medicinales de la especie *T. usneoides* como antirreumática y antibacteriana. Se ha demostrado que el extracto acuoso de *T. usneoides* tiene un efecto hipoglucémico en ratones sanos a las 4 y 8 horas posteriores a su administración (Keller *et al.*, 1981). También el estudio en ratas con el extracto acuoso y etanólico (500 mg /kg) provocó hipoglucemia significativa dentro de 24 h, donde el extracto acuoso produjo un máximo de hipoglucemia después de los 4 y 7 días de la exposición crónica del extracto, bloqueando el desarrollo de la diabetes generado por aloxana, sin embargo, al medir insulina en plasma no se vieron modificados estos niveles (Keller *et al.*, 1981; Witherup *et al.*, 1995). También se han identificado algunos componentes orgánicos como: azúcares, triterpenos, esteroides y flavonoides. También fracciones ácidas que contiene el extracto acuoso de *T. usneoides* se fraccionaron por cromatografía líquida de media presión (MPLC), identificando al ácido 3-Hidroxi-3-Metilglutarico (HMG), donde un estudio en ratones en ayuno al administrarles el HMG disminuyó la glucosa en sangre en un 41,7% a 250 mg/Kg, por lo tanto, se sugirió al HMG como el principio activo responsable de este efecto. Por otro lado, se realizó un estudio en pacientes con hipercolesterolemia donde se les administró una dosis de 0.750, 1.500, 2.250 y 3 mg de HMG por día, durante 8 semanas. Cada dosis de HMG disminuyó significativamente los niveles de colesterol en plasma en comparación con el placebo después de seis semanas del tratamiento, sin embargo, no se realizaron pruebas de glucosa y cualquier hipoglucemia inducida por el HMG no se observó (Witherup *et al.*, 1995). Por otro lado, en un estudio con diferentes plantas en ratones CD1 se demostró que el extracto clorofórmico de *T. usneoides* reduce significativamente la glucemia a los 30 min después de la administración en ratones con 12 h de ayuno. Además, el extracto acuoso y clorofórmico de *T. usneoides* se administró en adipocitos (3T3-L1) pero no

aumento la expresión de GLUT4 (Giacoman, 2015). En otro estudio realizado en la línea celular RINm5F se demostró que a diferentes concentraciones del extracto acuoso de esta planta (0.1, 1 y 5 µg/ml) aumenta la expresión del ARNm de insulina solo en condiciones hiperglucémicas (30 mM), pero no favorece el incremento de Ca²⁺ intracelular, ni la secreción de insulina. Por otro lado, en un modelo *in vivo* se observó que a diferentes dosis (100 y 250 mg/Kg) del extracto acuoso, disminuyó la glucosa en sangre en diferentes intervalos de tiempo (Espejel, 2014). Los anteriores estudios sugieren que el extracto acuoso de *T. usneoides* podría estar activando la transcripción del gen, pero no la secreción de insulina; por lo que su mecanismo de acción podría estar involucrado en la captación de glucosa en el tejido hepático.

5.- Justificación.

La prevalencia de la DT2 está aumentando al mismo ritmo que los cambios en el patrón de la dieta en la población. El aumento de la diabetes en los países con ingresos bajos parece estar alimentada por la rápida urbanización, transición de la nutrición y estilos de vida cada vez más sedentarios. La aparición de la DT2 en jóvenes podría aumentar el riesgo de morbilidad y mortalidad. En la actualidad la DM es considerada una pandemia y el 5% de la población mundial (es decir, cerca de 350 millones de 7 mil millones de personas) tienen la enfermedad, donde la población total de diabéticos diagnosticados, al menos el 90% tienen DT2. México tiene una alta incidencia y se estima que para el año 2025 ocupará el sexto lugar entre los países con el mayor número de casos a nivel mundial (Rorsman *et al.*, 2013). Sin embargo, muchas de las complicaciones que ocurren en esta enfermedad se deben a la inhibición del transporte de glucosa en los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo principalmente), cabe destacar que los efectos hipoglucemiantes generados en el organismo no solo dependen de la secreción de insulina, sino de otros factores que intervienen en su regulación.

Por otro lado, las alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad no son curativas y hasta el momento no se ha encontrado ninguna terapia alternativa que lo sea. Además, a pesar de tener una terapia farmacológica, los pacientes siguen utilizando plantas con propiedades antidiabéticas como alternativa de tratamiento para su enfermedad. *T. usneoides* se ha mencionado en diferentes estudios que posee actividad hipoglucemiante en modelos *in vivo*, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción por el cual genere este efecto. A pesar de que *T. usneoides* es una planta utilizada para evitar el deterioro progresivo de la DT2 en la población, se tiene muy poca información sobre ella, representando un buen campo de investigación. Por este motivo la medicina tradicional representa una fuente muy importante para el tratamiento de la DM, resultando de gran interés conocer como estas plantas ejercen su mecanismo de acción hipoglucemiante en modelos experimentales. Además, el apoyar la idea del desarrollo de nuevos medicamentos o fitofármacos con aplicación clínica, con un conocimiento científico que sustente su uso en el control de la diabetes. Por lo tanto, este trabajo está encaminado a evaluar si el extracto acuoso de *T. usneoides* tiene algún efecto sobre GLUT2 y GLUT4, así como la participación de la proteína GSK-3 β presente en la vía PI3K/Akt.

6.- Pregunta de investigación.

¿Cuál es el efecto del extracto acuoso de *T. usneoides* sobre la expresión de transportadores de glucosa, así como la activación de GSK-3 β en células hepáticas con alta concentración de glucosa?

7.- Hipótesis.

Si el extracto de *T. usneoides* incrementa la expresión de GLUT2 y GLUT4, así como la activación de GSK-3 β ; posiblemente el extracto presente un efecto anti-hiperglucémiante.

8.- Objetivo general.

Evaluar el efecto de *T. usneoides* sobre la expresión de transportadores GLUT2 y GLUT4 mediante la participación de GSK-3 β presente en la vía PI3K/Akt en células hepáticas sometidas a altas concentraciones de glucosa.

9.- Objetivos particulares.

- Identificar al ácido 3-Hidroxi-3-metilglutarico en el extracto acuoso de *T. usneoides*.
- Determinar la expresión de GLUT2 y GLUT4 en células hepáticas en condiciones hiperglucémicas, en presencia del extracto acuoso de *T. usneoides*.

- Evaluar la participación de GSK-3 β de la vía PI3K/Akt que participa en la señalización de los transportadores de glucosa en células hepáticas, en presencia del extracto acuoso de *T. usneoides*.

10.- Metodología.

10.1.- Obtención del material vegetal (*T. usneoides*).

T. usneoides se colectó en el Parque Nacional Sacromonte. Municipio de Ameca Ameca en el Estado de México. El ejemplar de la planta fue identificado taxonómicamente por un experto de la UAM-I (Dra. María Flores Cruz). Un ejemplar fue depositado en el herbario medicinal del IMSS con el número 15,992 y otro en el herbario CHAPA del Colegio de Postgraduados s/n.

10.2.- Obtención del extracto acuoso.

El material vegetal se secó bajo aireación constante hasta asegurarnos que la planta estuviera completamente seca. El material seco se trituro en un molino eléctrico (Wiley modelo 4), usando una rejilla de 1 mm de diámetro. El material resultante (75 g) se aisló por maceración acuosa (en una proporción de 100g de planta seca/ L de agua) durante 24 h. El extracto líquido se filtró y el líquido se eliminó mediante un proceso de destilación a presión reducida y posterior proceso de liofilización. El extracto completamente seco con rendimiento de 4.8 %, fue almacenado a -4 °C hasta el momento de su utilización.

10.3.- Estandarización del extracto acuoso mediante cromatografía en capa fina (CCF).

10.3.1.- Condiciones cromatográficas.

Para el estudio se adquirió el HMG (Sigma-Aldrich), el cual junto con el extracto acuoso de *T. usneoides* fueron monitoreados por CCF.

10.3.2.- Preparación del revelador para CCF.

- 4-hidroxibenzaldehído

Se pesaron 0.5 g de 4-hidroxibenzaldehído (marca Sigma Aldrich) en un vaso de precipitado previamente en hielo y se agregaron 90 ml de etanol, manteniéndose en agitación, posteriormente se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico al 96% muy lentamente, y se dejó en agitación por 10 min.

10.4.- Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios.

Para el aislamiento de células hepáticas se usó la técnica de perfusión con colagenasa en dos pasos. Se utilizaron ratones B57BL/6J de 8 a 12 semanas, los cuales se anestesiaron con 0.8 ml tribromoetanol (Avertina) vía intraperitoneal (vi), posteriormente se limpió la superficie abdominal con etanol al 75 % y se realizó una incisión en el abdomen del ratón cortando el peritoneo y el tórax para dejar expuesto el hígado. Se anudó la vena cava inferior y superior con hilo de sutura, evitando que el hilo corte cualquiera de las venas. También se introdujo un catéter acoplado a un equipo de perfusión sobre la aurícula derecha del corazón y como primer paso se perfundió con 20 ml de solución HBSS (Solución salina Balanceada de Hanks) durante 20 min a una temperatura de 37 °C. Posteriormente se cortó la vena cava inferior y la vena porta, y se masajearon para evitar coágulos y la solución de HBSS se

drenará. La solución de HBSS contiene HEPES 10 mM y EGTA 75 mM. El segundo paso fue agregar 50 ml de colagenasa tipo I al 0.05% en medio Williams con HEPES 10 mM (amortiguador) y NAHCO_3 25 mM a pH de 7.4, a una temperatura de 37 °C. Después el hígado se retiró y se colocó en una caja Petri de 10 cm con 25 ml de medio de adhesión en frío (Medio Williams suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibiótico). El hígado se disgregó y se recolectaron las células dispersas con una pipeta de 5ml y se pasaron por un filtro con poros de 100 μm de tamaño. La solución filtrada se centrifugó a 700 rpm durante 7 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante para resuspenderlo en 25 ml de medio de adhesión, donde se le adicionó suavemente por la parte superior del tubo 25 ml de solución de Percoll con solución Hanks 10X y se invirtió cuidadosamente el tubo varias veces para garantizar que la suspensión sea homogénea, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 1200 rpm a 4 °C y al obtener el pellet de hepatocitos viables se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión, después para saber el porcentaje de viabilidad, las células se contabilizaron con azul de tripano (dilución 1:1) en un contador automático Vi-Cell y se sembraron en placas de 6 cm para su posterior tratamiento (Figura 1).

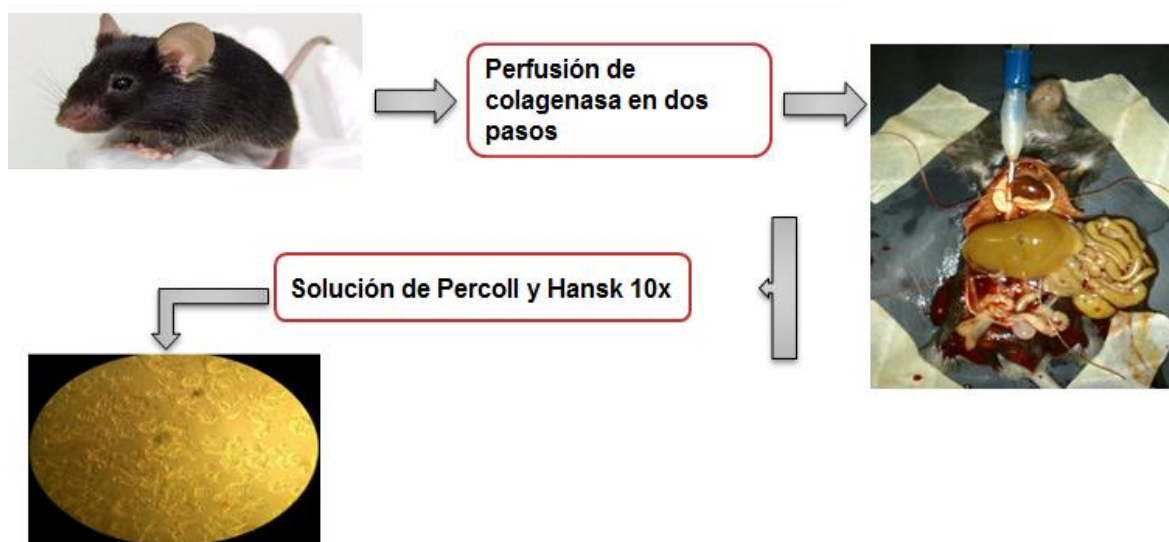


Figura 1.- Obtención del cultivo primario de hepatocitos.

10.5.- Análisis de la viabilidad celular.

La viabilidad celular fue determinada por la prueba de tinción con cristal violeta. Se sembraron 15000 células/pozo en placas de 12 pozos. Una vez establecido el cultivo las células se lavaron con PBS y se les cambió por uno sin SFB, que contenía 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 µg/ml del extracto de *T. usneoides* por 24 h, posteriormente las células se lavaron con PBS y se fijaron con etanol y se tiñeron con 0.2% de cristal violeta. Posteriormente la absorbancia de los extractos en SDS al 2% fue determinada a una longitud de onda de 620 nm. La viabilidad celular fue calculada como porcentaje relativo a las células no tratadas (Gómez, 2008).

10.6.-Tratamientos.

El cultivo primario fue tratado durante 1, 3, 6 y 24 h con diferentes tratamientos: 1) Células control incubadas con medio Williams sin suero; 2) Células tratadas con el extracto acuoso de *T. usneoides* a 1 y 5 µg/ml; 3) Células tratadas con glucosa 25 mM; 4) Células pre-incubadas durante 1 h con glucosa 25 mM y posteriormente se les adicionó el extracto acuoso de *T. usneoides* a concentraciones de 1 y 5 µg/ml y 6) Células incubadas con pioglitazona 10 µM (Hernández, 2012).

10.7.- Extracción del ARN total.

Para la extracción del ARN total del cultivo primario se empleó la técnica descrita por Chomczynski (1993). Para cuantificar la expresión de los transportadores se sembraron 1×10^6 células por cada tratamiento descrito anteriormente. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Se agregó 1ml de Trizol®. El homogenado celular se depositó en tubos Ependorf en donde se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se agitó suavemente el tubo por 15 segundos. Las muestras se

centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se colectó la fase acuosa (superior) y se le adicionó 0.5 ml de isopropanol donde se agitaron suavemente por inversión y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado (ARN total) obtenido se secó al vacío. El botón de ARN se resuspendió en una solución de dietilpicrocarbonato (DEPC) al 0.1 % o agua libre de RNAasas (Chomczynski, 1993). Se cuantificó el ARN por espectrofotometría mediante un NanoDrop® a una absorbancia de 260 nm y finalmente se observó la integridad del ARN total mediante el corrimiento de un gel de agarosa al 1 %.

10.7.1.- Cuantificación de la expresión de los transportadores GLUT2 y GLUT4.

Transcripción en Reversa acoplado a la reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real. El cADN se sintetizó de 2 µg de ARN total por PCR utilizando la transcriptasa reversa ImProm II, también se utilizó iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µl). El volumen total de reacción (20 µg) se incubó en el termociclador de Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700 con el siguiente programa de ciclos: inicio 25° C por 5 min, seguido por la extensión a 42 °C por 55 min y por último la reacción será detenida inactivando la enzima a 70 °C por 15 min y manteniéndola a 4 °C por 5 min.

El cADN se amplificó mediante la enzima ADN polimerasa del kit de “ADN master plus SYBR Green 1” para el gen a estudiar GLUT2, GLUT4 y β-actina como gen de normalización. El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 µl contendrá 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes de interés, usando β-actina como gen de referencia (Tabla 1) y la mezcla de reacción que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM.

Primer	Secuencia forward/reverse	pb
GLUT2 (<i>Mus musculus</i>)	GCCTGTGTATGCAACCATTG/GAAGATGGCAGTCATG CTCA	205
GLUT4 (<i>Mus musculus</i>)	GATTCTGCTGCCCTTCTGTC/ATTGGACGCTCTCTCT CCAA	168
36B4 (<i>Mus musculus</i>)	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT/CCGCAGGGGCAGCA GTGGT	135

Tabla 1.- Secuencia de los Primers de GLUT2, GLUT4 y 36B4.

10.8.- Identificación de la proteína GSK-3 β .

10.8.1.- Extracción de la proteína total.

La extracción de la proteína total se realizó utilizando 200 μ l de un amortiguador de lisis pH 8 (Sigma) suplementándola con 80 μ l de un stock de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics), el homogenizado celular se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante celular se almacenó en pequeños volúmenes a – 80 °C. De una alícuota se cuantificó la concentración de proteína con el reactivo de Bradford.

10.8.2.- Determinación del contenido de proteína.

El contenido de proteína en las muestras se realizó por el método de Bradford (1976), con el reactivo de Bradford (Bio Rad). Se tomó una alícuota de 5 μ l de las muestras y se le adicionó 2.5 ml del reactivo Bradford (1:4), posteriormente se incubaron durante 20 min a 25 °C. La cuantificación se realizó con una curva patrón de albúmina bovina sérica en un rango de 0.1 a 0.5 μ g/ml. Posteriormente la cuantificación se realizó a una absorbancia de 590 nm y se determinó la concentración de proteína total citoplásmica (Bradford, 1976).

10.8.3.- Análisis por Western blot.

El ensayo de Western blot, se utilizó para evaluar las proteínas celulares de interés, el cual se basa en la identificación de la proteína citoplásmica por medio de la unión específica con el anticuerpo primario y el reconocimiento de este anticuerpo por un segundo anticuerpo que lleva una marca fluorescente para mostrar que se encuentra presente.

Se tomaron 5 µg de la proteína total, las muestras se colocaron en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1, Sigma) al 12% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio 10% y 5 µl de TEMED. Después las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio-Rad) con un amortiguador de corrida pH 8.3, formado por Tris-Base, glicina y SDS durante 90 min a 150 Volts a 25 °C. La proteína se transfirió a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF) polyscreen usando un amortiguador de transferencia pH 8.3, formado por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20%, durante 14 h, a 30 Volts a 25 °C. Después la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS-Tween20 pH 7.5, formada por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1%, por 30 min dos veces. La membrana se lavó con TBS-Tween20 varias veces y se le adicionó el anticuerpo primario que reconoce a la proteína GSK-3β en una dilución 1:1000 por 2 h. Posteriormente la membrana se lavó por duplicado con TBS-Tween20 suplementado con leche durante 10 min, seguido de dos lavados con TBS-Tween20 durante 5 min, posteriormente se le adiciono el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa 1:8000 por 2 h. La membrana se lavó con TBS-Tween20 durante 10 min por triplicado y 5 min con TBS. Finalmente, la membrana se trató con el Ensayo SuperSignal® West Pico Substrate (Pierce, Rockford, IL) durante 10 min y se visualizó en un densitómetro GS 670 (Bio Rad) y se analizó en el Molecular Analyst (Kodac).

11.- Análisis estadístico.

Una vez obtenidos los resultados, si estos cumplieron con ciertos supuestos (normalidad y homocedasticidad) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó como prueba complementaria Tukey-Kramer. Utilizando un nivel de significancia \leq a 0.05.

12.- Resultados.

12.1.- Análisis y estandarización del extracto acuoso de *T. usneoides*.

Mediante CCF se logró identificar la concentración del HMG en el extracto acuoso de *T. usneoides* (Figura 2).

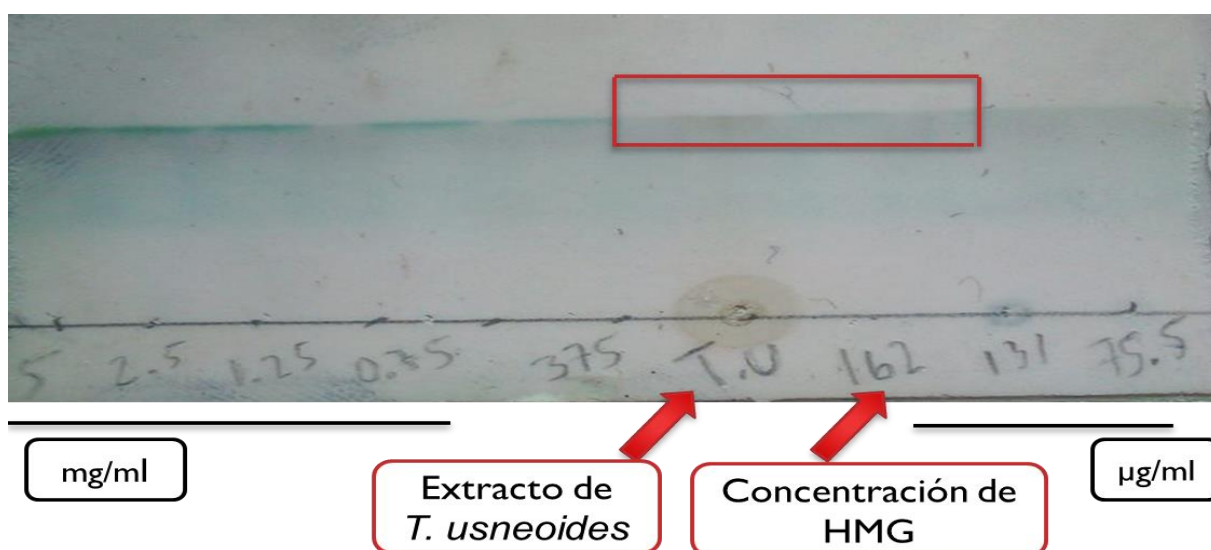
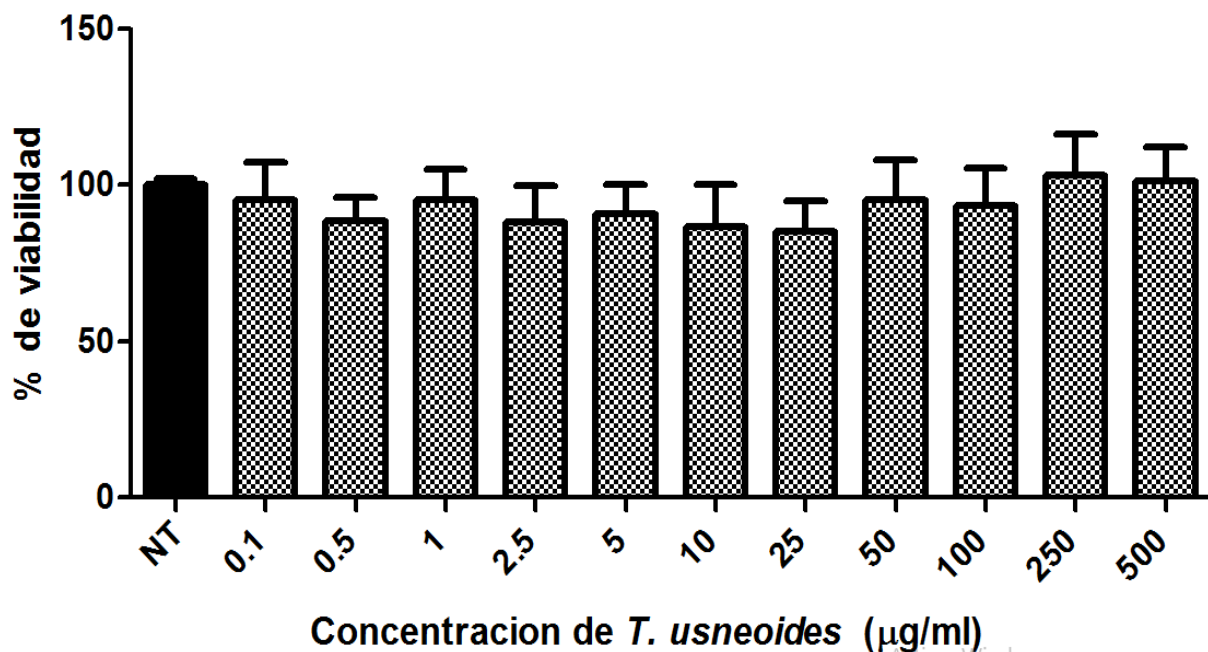


Figura 2. CCF del extracto acuoso de *T. usneoides* (1µg/ml de metanol) y HMG (µg/ml y mg/ml) desarrollada en fase normal en un sistema Acetonitrilo 90 % agua 10 %, revelada con 4-hidroxibenzaldehido. Se identificó la presencia del HMG (162 µg/ml) en el extracto acuoso de *T. usneoides* marcada en rojo.

12.2.- Curva de viabilidad en cultivo primario de hepatocitos, tratadas con el extracto acuoso de *T. usneoides*.

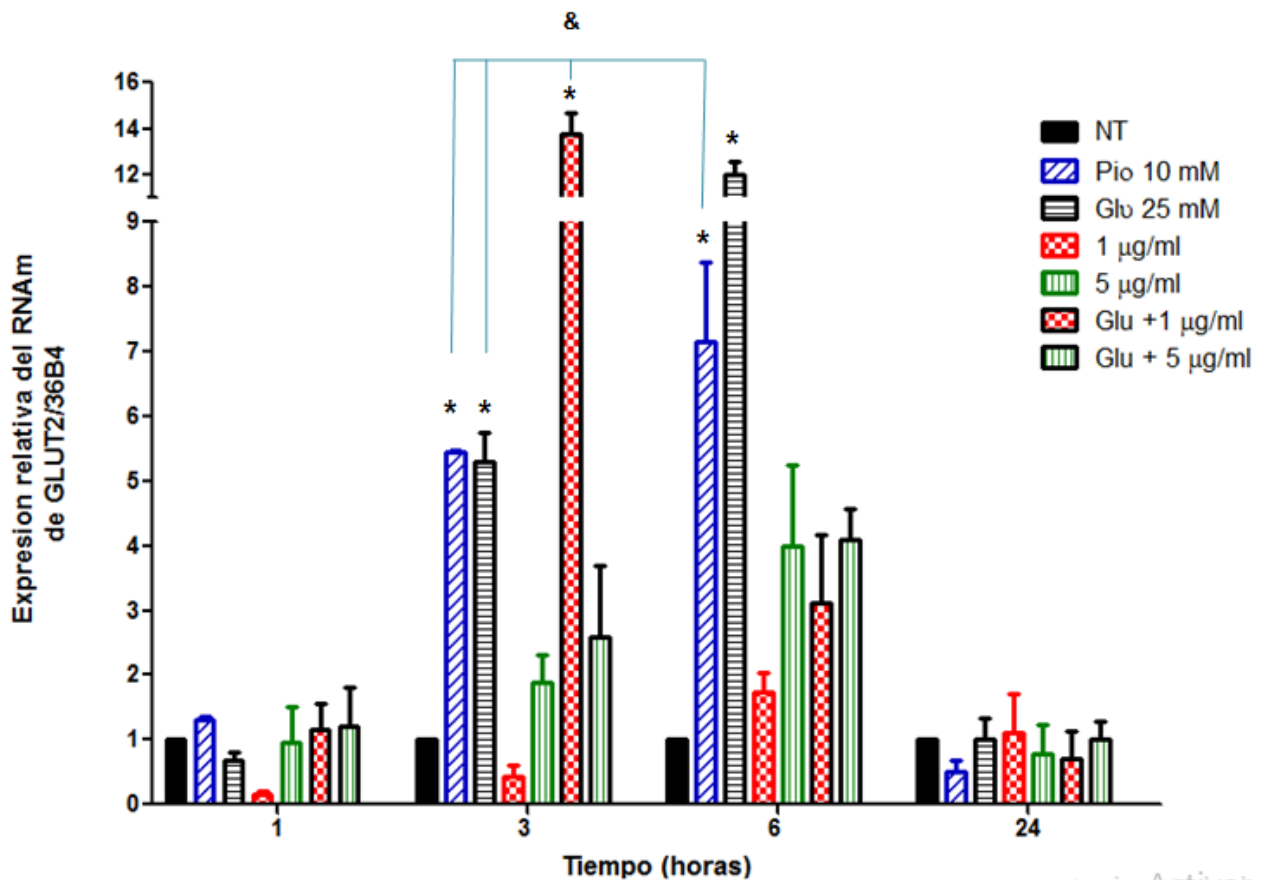
En la gráfica 1 se muestra el porcentaje de viabilidad de los hepatocitos tratados con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. usneoides* (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$), observando una viabilidad similar al grupo no tratado (100%). Posteriormente se eligieron las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para los posteriores tratamientos, ya que las células tratadas con estas concentraciones no mostraron una disminución significativa en el % de viabilidad respecto al grupo no tratado (NT).



Grafica 1. Prueba de viabilidad en cultivo primario de hepatocitos. Los hepatocitos se trataron con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. usneoides* (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$). (*Diferencia significativa respecto al grupo control, $p < 0.05$. Media \pm Error Estándar ($n=4$)).

12.3.- Efecto del extracto acuoso de *T. usneoides*, sobre la expresión de GLUT2 y GLUT4 en cultivo primario de hepatocitos.

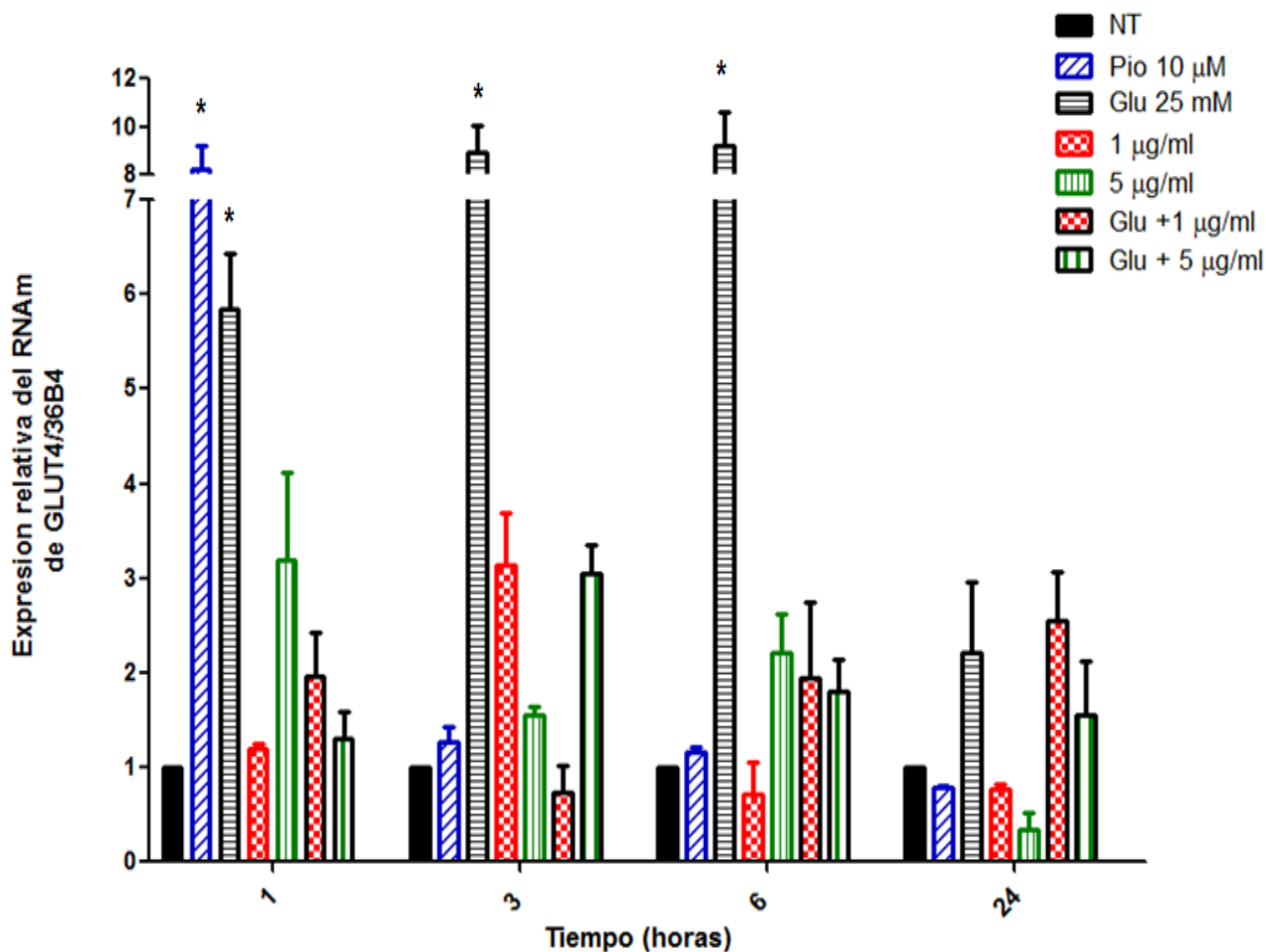
El grafico 2 muestra el efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT2 en diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 h). La adición del extracto acuoso de *T. usneoides* a concentraciones de 1 y 5 µg/ml durante la primera hora, no se mostró diferencias significativas respecto al NT, aun bajo condiciones altas de glucosa (25 mM). Sin embargo, cuando las células se cultivaron con glucosa más el extracto acuoso de *T. usneoides* a 1 µg/ml se observó un incremento significativo respecto al NT. Glucosa y pioglitazona, por otro lado mostraron un incremento significativo respecto al NT en las 3 h posteriores al tratamiento. También durante las 6 h de tratamiento el grupo de glucosa mostró diferencia significativa respecto a los demás grupos. Sin embargo, el tratamiento a 24 h no tuvo efecto positivo sobre la expresión de este transportador de glucosa.



Grafica 2. Efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT2 en cultivo primario de hepatocitos, NT: no tratado; 1 y 5: µg/ml del extracto acuoso de *T. usneoides*; Glu: glucosa (25 mM); Glu + 1 y 5: glucosa más extracto acuoso de *T. usneoides* (1 y 5 µg/ml) y Pio: pioglitazona (10 µM). (*Diferencia significativa respecto al grupo control, $p < 0.05$. Media \pm Error Estándar (n=3)).

El grafico 3 muestra el efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT4 en diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 h). La adición del extracto acuoso de *T. usneoides* a concentraciones de 1 y 5 µg/ml durante la primera hora, no se observó diferencia significativa respecto al NT. Sin embargo, el tratamiento con pioglitazona aumentó la expresión de GLUT4 estadísticamente significativa respecto al NT. Por otro lado el tratamiento con el extracto acuoso a 1 y 5 µg/ml de *T. usneoides* no presentó cambios en la expresión, pero el tratamiento con glucosa aumentó la expresión de

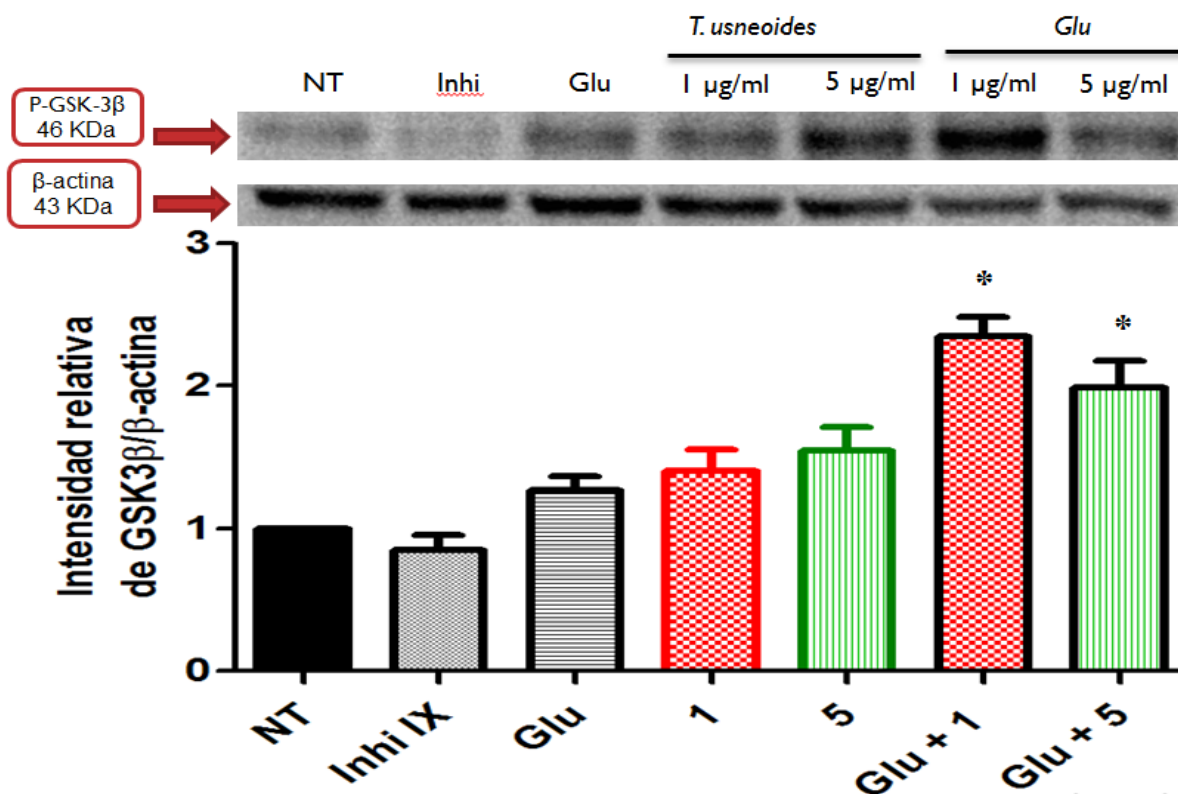
GLUT4 estadísticamente significaba respecto al NT en las 3 y 6 h posteriores al tratamiento. Sin embargo, cuando las células se cultivaron durante 24 con el extracto acuoso de *T. usneoides* a 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ no se observó cambios en la expresión de GLUT4.



Grafica 3. Efecto del extracto acuoso sobre la expresión de GLUT4 en cultivo primario de hepatocitos, NT: no tratado; 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ del extracto acuoso de *T. usneoides*; Glu: glucosa (25 mM); Glu + 1 y 5: glucosa más extracto acuoso de *T. usneoides* (1 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y Pio: pioglitazona (10 μM). (*Diferencia significativa respecto al grupo control, $p < 0.05$. Media \pm Error Estándar ($n=3$)).

12.4.- Efecto del extracto acuoso de *T. usneoides*, sobre la actividad de GSK-3 β en cultivo primario de hepatocitos.

El grafico 4 muestra el efecto del extracto acuoso sobre la actividad de GSK-3 β durante los 15 min de tratamiento. El tratamiento con inhibidor IX no mostro cambios en la actividad de GSK-3 β . Sin embargo, la adición del extracto acuoso de *T. usneoides* a concentraciones de 5 $\mu\text{g/ml}$ aumento la actividad de GSK-3 β significativamente respecto al NT durante los 15 min. Por otro lado, el tratamiento de glucosa más el extracto acuoso a 1 $\mu\text{g/ml}$ de *T. usneoides* presento cambios en la actividad de GSK-3 β estadísticamente significativa respecto al grupo no tratado, sin embargo, el tratamiento con glucosa no mostro cambios en la actividad de GSK-3 β .



Grafica 4. Efecto del extracto acuoso sobre la actividad de GSK-3 β en cultivo primario de hepatocitos, NT: no tratado; Inhi IX 10 μM . Glu: glucosa (25 mM); 1 y 5:

$\mu\text{g/ml}$ del extracto acuoso de *T. usneoides*; Glu + 1 y 5: glucosa más extracto acuoso de *T. usneoides* (1 y 5 $\mu\text{g/ml}$). (*Diferencia significativa respecto al grupo control, $p < 0.05$. Media \pm Error Estándar (n=4)).

13.- Discusión.

Las enfermedades cardiovasculares y la DT2 representan cargas personales, económicas y sociales significativas. Las personas con DT2 llevan el doble de riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Con más de 700 nuevos casos de diabetes diagnosticados diarios, el gasto sanitario total sobre la diabetes se pronostica en un aumento del 10% al 17% para el año 2035. Factores de comportamiento, como la dieta, actividad física reducida y el sedentarismo, son factores de riesgo importantes para el desarrollo de enfermedades metabólicas. El tratamiento actual de la diabetes se centra en el control y la reducción de la glucosa en sangre a un nivel normal (Cassidy *et al.*, 2016). Con un curso largo y complicaciones graves a menudo resultan en alta tasa de mortalidad, ya que el tratamiento de la diabetes requiere de diferentes agentes, incluyendo medicamentos, dietas y entrenamiento físico. Para las personas que padecen de diabetes, la terapia medicinal es una alternativa y hasta ahora muchos tipos de medicamentos antidiabéticos se han desarrollado para los pacientes, pero casi todos son agentes que generan alteraciones en el organismo (de Queiroga *et al.*, 2004). En general la población ha usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud, ya sea por una idealización de lo natural o por la situación de pobreza de grandes sectores de la población.

El uso de las plantas para curar diversos males es una práctica que ha ido en aumento en los últimos tiempos; sin embargo, pocas están validadas científicamente y por lo tanto se desconoce su seguridad y eficacia (Espejel, 2014). El conocimiento que se tiene en la actualidad de las propiedades de los fitoquímicos ha contribuido

enormemente a resolver problemas de salud, ya que una alta proporción de los medicamentos que se utilizan son derivados de plantas. A pesar de que *T. usneoides* en diferentes trabajos se ha evaluado su efecto hipoglucémico, existen una variedad de moléculas importantes que posiblemente generen su acción hipoglucemiante. Por tal motivo, al realizar de manera cualitativa la CCF logramos identificar al HMG en el extracto acuoso de *T. usneoides* (1µg/ml de metanol) como se muestra en la figura 2, esta molécula se ha reportado estar presente en el extracto acuoso de *T. usneoides*. También se ha logrado observar que la administración del HMG disminuye el colesterol en pacientes con hipercolesterolemia, así como presentar un efecto (250 mg/kg) hipoglucémico en ratones sanos (Wetherup *et al.*, 1995), y aunque no se cuantifico el HMG por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) ni se utilizaron tratamientos con este ácido en cultivo primario de hepatocitos, no se descarta la idea de que sea el responsable del efecto hipoglucémico, sin embargo, aunque no se conocen más estudios acerca de esta molécula posiblemente existan una amplia variedad de compuestos en el extracto responsables del efecto hipoglucémico. Es importante mencionar que aunque hay diferentes mecanismos para disminuir los niveles de glucosa en sangre, se descarta la idea de que *T. usneoides* se encuentre actuando a nivel de las células β y adipocitos, involucrando al hígado como uno de los principales órganos que participa en la homeostasis de la glucosa, ya que este órgano participa en el transporte, almacenamiento, producción y metabolismo de la glucosa. Se sabe que GLUT2 y GLUT4 son los principales transportadores de glucosa en el hígado de mamífero (Linga *et al.*, 2016). Estos transportadores regulan el flujo de glucosa en los hepatocitos y este proceso se encuentra alterado en la DT2, generando cambios en la expresión de los transportadores específicos de glucosa. Por otra parte, la regulación de algunos transportadores de glucosa se ha propuesto como objetivos importantes para el desarrollo de enfoques preventivos y terapéuticos para la DT2 (Yogi *et al.*, 2016).

GLUT4 es una de las 14 proteínas de transporte de glucosa codificadas en el genoma y se expresa más abundantemente en el tejido adiposo, esquelético y

hepático, esta proteína de membrana regula los niveles de glucosa en sangre mediante la estimulación de insulina en estos tejidos (Cura *et al.*, 2013). Por lo tanto, GLUT4 es responsable de la captación de glucosa estimulada por la insulina y a pesar de que los hepatocitos constantemente están regulando los niveles de glucosa en sangre, los resultados no mostraron un efecto del extracto acuoso de *T. usneoides* (1 y 5 µg/ml) sobre la expresión de GLUT4 en células hepáticas, ya que se considera generalmente que carecen de expresión significativa de GLUT4, un estudio reciente informa expresión de GLUT4 en el hígado porcino. Aunque hay poca evidencia para la expresión en hepatocitos, GLUT4 ha sido detectado en las células endoteliales sinusoidales y las células estrelladas donde puede mediar la captación de glucosa por los efectos mediados por el receptor de insulina. Sin embargo, la supresión en el músculo esquelético de GLUT4 genera exceso de glucosa circulante a los hepatocitos, donde se convierte en el combustible para la conversión y almacenamiento de lípidos (Karim *et al.*, 2012). Por lo tanto, la homeostasis de la glucosa es mantenida por una compleja relación entre los niveles hepáticos de GLUT4 que pueden ser regulados por la actividad metabólica y la ingesta dietética. Por otra parte, estudios recientes en ratones han demostrado que la disminución en la expresión de GLUT4 en el tejido adiposo conduce a un estado de intolerancia a la glucosa e insulina en el cuerpo, mientras que la sobre expresión mejora la eliminación de la glucosa y sensibilidad a la insulina sistémica. Esto implica un papel importante de la expresión de GLUT4 en tejido adiposo en la homeostasis de la glucosa y a pesar de que GLUT4 es predominante en células adiposas estudios en células 3T3-L1 han demostrado que el extracto acuoso no tuvo ningún efecto sobre la expresión de PPAR- δ y PPAR- γ ni alguno de sus genes regulados (GLUT4), siendo aún una interrogante el mecanismo de acción por el cual actúa, ya que existen reportes que demuestran que el extracto acuoso de esta planta posee efecto hipoglucémico (Witherup *et al.*, 1995; Giacomani-Martínez, 2015). Por otro lado, el tratamiento con pioglitazona como agonista de PPAR- γ aumento la expresión de GLUT4 durante la 1 y 3 h. Estudios en ratones knockout ob/ob han demostrado que los agonistas como la pioglitazona incrementan el contenido hepático de triglicéridos

y favorecen el desarrollo de esteatosis. Muchos estudios han puesto de manifiesto la regulación de enzimas involucradas en la lipogénesis como la lipoproteína lipasa (LPL), así como la expresión de GLUT1 y GLUT4 (Thorens, 2015), este dato se relaciona con el aumento de expresión de GLUT4 mediado por pioglitazona. Mientras que el tratamiento de glucosa más el extracto de *T. usneoides* no mostro ningún efecto sobre la expresión de GLUT4, sin embargo, el tratamiento con glucosa aumento de manera significativa la expresión de este transportador durante la 1, 3 y 6 h. Aunque la glucosa no es un nutriente esencial (algunas personas subsisten con un alto contenido de grasa y proteína), esta molécula asume un papel central en el metabolismo energético de los mamíferos, ya que sirve como sustrato metabólico en los hepatocitos. Sin embargo, no hay genes sensibles a la glucosa que se hayan identificado, ya sea GLUT1 o GLUT4, y no hay información disponible sobre metabolitos de glucosa que median la respuesta de la expresión de GLUT4 (Klip *et al.*, 1995; Cura *et al.*, 2013). Otros estudios han demostrado que la insulina ejerce un efecto sobre la expresión de GLUT4 en adipocitos maduros 3T3-F442A. Este efecto de la insulina depende de la concentración de glucosa que rodea a las células y se observó a una concentración baja (5.6 mM), pero no a un nivel alto de glucosa (25 mM), lo que se sugiere un efecto de supresión de la glucosa sobre la expresión de GLUT4 inducida por insulina. Este estudio demostró que el tratamiento de glucosa en hepatocitos aumento la expresión de GLUT4 (Zhi *et al.*, 2001). Esto pone en evidencia la actividad de la glucosa sobre la regulación de GLUT4 y aunque el extracto acuoso de *T. usneoides* no mostro diferencias en la expresión de GLUT4 posiblemente lo haga mediante la movilización de GLUT4 a la membrana plasmática del hepatocito. Sabemos que la captación de glucosa por el tejido muscular, adiposo y hepático se produce a través de GLUT4, y puede ser de forma aguda a través de su translocación a la membrana plasmática en respuesta a la insulina.

Aunque se ha creído que la translocación de GLUT4 es el paso limitante para la captación de glucosa y la utilización en tejidos sensibles a la insulina, los ratones knockout de GLUT4 no desarrollan hiperglucemia, lo que sugiere que otras isoformas

de GLUT podrían estar involucradas en la regulación y homeostasis de la glucosa en el cuerpo (Bridges *et al.*, 2015).

En el caso de GLUT2, esta proteína realiza un flujo bidireccional de glucosa en los hepatocitos, en consecuencia con el gradiente de concentración del sustrato, que es crítica para la producción de glucosa celular. GLUT2 promueve la salida de glucosa rápida después de la gluconeogénesis. Durante un ayuno prolongado el hígado produce glucosa a través de la gluconeogénesis o glucogenólisis con la conversión de glucosa 6 fosfato en glucosa liberándola a través de GLUT2, observándose mayor expresión de GLUT2 en hepatocitos periportales que en perivenosos (Cura *et al.*, 2012). Estudios en células HepG2 cultivadas con alta concentración de glucosa (400 mg/dl) mostraron un efecto sobre la expresión de GLUT2 (Higuchi *et al.*, 2011), esto se relaciona con cambios en la expresión de este transportador durante la 3 y 6 h (Gráfica 2), ya que GLUT2 es un transportador de baja afinidad, expresado predominantemente en hígado, donde media aspectos críticos en la homeostasis de la glucosa. Esto es importante, ya que el tratamiento de glucosa más el extracto acuoso de *T. usneoides* aumentó la expresión de GLUT2, estadísticamente significativo en comparación con el grupo no tratado y los demás tratamientos (glucosa y pioglitazona) durante las 3 h. En varios estudios se demostró que la glucosa induce la expresión del gen de SREBP-1c y GLUT2 en una forma dependiente de la concentración en hepatocitos primarios de ratón. También se demostró como el tratamiento de insulina no aumento la expresión génica de GLUT2, pero SREBP-1c aumento el nivel de expresión de GLUT2 inducida por glucosa y aunque no se entiende actualmente este proceso, se observó que el tratamiento con insulina no genero la unión de SREBP-1c al promotor GLUT2, mientras que SREBP-1c se unió al promotor de GLUT2 con alta concentración de glucosa (Seung *et al.*, 2005). SREBP-1c es un factor de transcripción que regula la transcripción de muchos genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Hasta la fecha, se han identificado tres isoformas de SREBP. SREBP-1a y 1c que se derivan de un solo gen y utilizan diferentes sitios de iniciación de la transcripción. SREBP-2 se transcribe a

partir de otro gen y muestra 50% de homología de secuencia con la isoforma SREBP-1c. SREBP-2 juega un papel crítico en la regulación de genes en la biosíntesis de colesterol, mientras que SREBP-1c regula genes lipogénicos en el hígado (Ansari *et al.*, 2016). Esto se relaciona con los animales resistentes a la insulina, tales como ratones ob/ob, donde se sabe que la señalización de insulina se encuentra bloqueada, y animales knockout sobre expresaron SREBP-1c en el hígado (Matsumoto *et al.*, 2002). Por otro lado, en un estudio en ratas diabéticas el tratamiento con FA (ácido ferúlico) redujo la expresión de GLUT2 en los hepatocitos, al afectar la interacción de factores de transcripción como SREBP-1c (Narasimhan *et al.*, 2015). Estos informes sugieren que la inducción de SREBP-1c también podría ocurrir por la glucosa, algo que probablemente corresponda con la respuesta observada con el tratamiento de glucosa en el cultivo primario de hepatocitos y aunque no hay evidencias de que el extracto acuoso de *T. usneoides* contenga moléculas que favorezcan la activación de estos factores. Se ha realizado un análisis químico del extracto acuoso de *T. usneoides* identificando algunos componentes orgánicos como: azúcares, triterpenos, esteroides y flavonoides. Dentro de los azúcares se lograron identificar arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa (Witherup *et al.*, 1995), aunque no se sabe si estas moléculas puedan favorecer la expresión de GLUT2 a excepción de glucosa, posiblemente el efecto que se genere por el sinergismo de otras moléculas contenidas en este extracto, las cuales estén generando el efecto hipoglucémico. En estudios preliminares *in vivo* se ha logrado observar que la administración aguda utilizando la preparación de *T. usneoides* (decocción acuosa), dio como resultado reducciones significativas de la glucemia en ratas sanas tras la administración diaria, vía oral, del jugo de *T. usneoides* (500 mg/kg) (Marles y Farnsworth., 1995). Este efecto también se observó en ratones bajo la administración del extracto acuoso de *T. usneoides* a una concentración de 100 mg/Kg encontrando una disminución en la concentración sérica de glucosa; sin embargo, cuando se incrementa la concentración del extracto, también aumenta la glucemia, lo cual puede deberse a que la planta contiene carbohidratos. También el extracto acuoso de *T. usneoides* aumentó la expresión de insulina sin modificaciones

en la secreción (Espejel, 2014). Esto proporciona evidencia de la actividad del extracto acuoso de esta planta, sobre la expresión de GLUT2 en el cultivo primario de células hepáticas. Es importante mencionar que el tratamiento con pioglitazona aumentó de manera significativa la expresión de GLUT2 durante la 1 h de tratamiento, sin embargo, a pesar de que esta tiazolidinediona se ha logrado elucidar su mecanismo de acción, promoviendo la sensibilidad a la insulina mediante su unión con el receptor PPAR- γ (Dunn *et al.*, 2010) estimulando la expresión de genes; entre ellos GLUT4 y otros que incrementan la lipogénesis en el tejido adiposo reduciendo el contenido de grasa hepática, no involucra la expresión de GLUT2. En estudios *in vitro* con células 3T3-L1 el tratamiento con pioglitazona no aumentó la expresión de GLUT4 y PPAR- γ , esto podría atribuirse a que los adipocitos al estar en el octavo día de diferenciación, han iniciado el proceso de adipogénesis, manteniéndose constantes los niveles del RNAm de PPAR- γ ; quien promueve la expresión de genes implicados en la adipogénesis como es el caso de GLUT4. También se evaluó el efecto de pioglitazona en la línea celular HepG2, encontrando que no aumenta la expresión de GLUT4, aunque los tratamientos duraron 24 h (Hernández, 2012) es posible que el mecanismo de acción de pioglitazona se lleve en menor tiempo, y aunque no se observa actividad sobre GLUT2 como se muestra en la gráfica 2 abre la posibilidad de explorar más acerca de su mecanismo de acción. Aunque pioglitazona se utiliza como un fármaco antidiabético, es decir, disminuyendo las concentraciones de glucosa en sangre (Zhang *et al.*, 2014), probablemente el extracto acuoso de *T. usneoides* pueda actuar a este nivel favoreciendo la captación de glucosa en sangre y aumentando el proceso de glucogenogénesis.

Aunque la glucogenogénesis es un proceso regulado, durante la ingesta de alimentos se genera G6P, la cual actúa como un precursor para la síntesis de glucógeno a través de la actividad de la GS. La fosforilación de GS es regulada por la cinasa GSK-3 β , inhibiendo su actividad. La insulina estimula a la GS mediante la activación de Akt que fosforila e inactiva a GSK-3 β , lo que aumenta la síntesis de glucógeno en el hepatocito (Gissen *et al.*, 2015). Se ha observado que la

desregulación en la actividad de GSK-3 β está implicada en una diversa variedad de patologías humanas, incluyendo la DT2. Algunos compuestos encontrados en diferentes plantas entre ellos la hoja del árbol de mango regulan las diferentes vías involucrando a AMPK y Akt, proteínas involucradas en el catabolismo de lípidos, y catabolismo/anabolismo de glucosa respectivamente (Zhang *et al.*, 2013).

A pesar de que *T. usneoides* mostro efecto sobre la expresión de GLUT2, el siguiente punto fue evaluar la actividad de GSK-3 β en el cultivo primario de hepatocitos; como se muestra en la gráfica 4, el tratamiento con el inhibidor IX disminuyo la actividad de GSK-3 β (Ibrahim *et al.*, 2012). Este dato corresponde con la literatura, donde se ha evaluado la actividad del inhibidor IX sobre GSK-3 β en cultivo primario de hepatocitos, encontrando una reducción de la fosforilación de la glucógeno sintasa, un sustrato específico de GSK-3 β , y aunque no se evaluó la actividad de la GS en este trabajo, la actividad de GSK-3 β disminuyo. Por otro lado, el tratamiento de glucosa no tuvo efecto sobre la actividad de GSK-3 β , por lo anterior, se ha evaluado el efecto de la glucosa (altas y bajas concentraciones) en celulas HepG2, sin embargo, no se detectó fosforilación (Ser9) de GSK-3 β , este dato es importante, ya que la participación de GSK-3 β en la señalización de la insulina está bien documentada y aunque glucosa no se ha reportado tener efecto sobre la activación de esta proteína, nuestros datos corresponden al efecto observado en la gráfica 4. También nuestros resultados mostraron que los tratamientos hiperglucémicos más el extracto acuoso de *T. usneoides* (1 μ g/ml) en el cultivo primario de hepatocitos, mostraron un aumento en la fosforilación de GSK-3 β y aunque nuestros estudios no se han informado previamente, existen evidencias (Wong *et al.*, 2015) de la actividad del extracto acuoso de *Gynura procumbens* en celulas HepG2 con esta misma actividad. En este estudio, se propuso al extracto acuoso de *Gynura procumbens* tener efecto anti-hiperglucémico, es decir, este efecto es atribuido por la inhibición de GSK-3 β , algo que corresponde al efecto observado por *T. usneoides*, por lo tanto, nuestros resultados ofrecen una posible explicación del efecto anti-hiperglucémico de *T. usneoides* reportado anteriormente, ya que

permiten elucidar que el extracto acuoso de *T. usneoides* podría actuar a nivel de la transcripción de GLUT2, puesto que su expresión está regulada por glucosa, así como la activación de GSK-3 β favoreciendo la síntesis de glucógeno en el hígado.

14.- Conclusiones.

- 1.- Se identificó al HMG en el extracto acuoso de *T. usneoides*.
- 2.- El extracto acuoso de *T. usneoides* mostró tener efecto sobre la expresión de GLUT2 y GLUT4 a las 3 h posteriores a su administración en presencia de glucosa.
- 3.- El extracto acuoso de *T. usneoides* mostro aumentar la fosforilación de GSK-3 β durante los 15 min posteriores a su administración.

15.-Perspectivas.

1. Determinar que fracción del extracto acuoso de *T. usneoides* presenta actividad hipoglucemiante en un modelo de diabetes experimental.
2. Evaluar la actividad del HMG en la fracción de *T. usneoides* que presente actividad hipoglucemiante.
3. Evaluar la fracción hipoglucemiante de *T. usneoides* sobre el contenido de glucógeno, así como la participación de proteínas involucradas en su regulación.
4. Determinar la fracción hipoglucemiante de *T. usneoides* sobre la vía PI3K/Akt, así como en la regulación de GLUT2 en células hepáticas.

16.-Bibliografía.

Alarcón-Aguilar FJ., Román-Ramos R., Pérez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber CC., Flores-Saenz JL., (1998). Study of the antihyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 101-110.

Ansari RA., Husain K. and Rizvi SA., (2016). Role of Transcription Factors in Steatohepatitis and Hypertension after Ethanol: The Epicenter of Metabolism. *Biomolecules*. 6: 29.

Aravinthan A., Challis B., Shannonc, Matthew Hoare N., Heaney J., Alexander JM., (2015). Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Experimental Cell Research*. 331: 38-45.

Apovian CM., (2011). Management of diabetes across the course of disease: minimizing obesity-associated complications. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 4: 353-369.

Bazottea RB., Silvaa LG. and PM Schiavon PM., (2014). Insulin resistance in the liver: Deficiency or excess of insulin?. *Cell Cycle*. 13: 2494-2500.

Bilzer M., Roggel F. and Gerbes AL., (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 26: 1175-1186.

Bnouham M., Ziyat A., Mekhfi H., Tahri A., Legssyer A., (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity-A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*. 14: 1-25.

Bradford MM., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Braet F. and Wisse E., (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology*. Doi: 10.1186/1476-5926-1-1.

Bridges D. and Saltielc AR., (2015). Phosphoinositides: Key modulators of energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1851: 857-866.

Cassidy J., Chau YJ., Catt M., Bauman A., Trenell MI., (2016). Cross-sectional study of diet, physical activity, television viewing and sleep duration in 233 110 adults from the UK Biobank; the behavioural phenotype of cardiovascular disease and type 2 diabetes, *BMJ Open*. 6: e010038.

Chomczynski P., (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15: 532-537.

Clayton RF., Rinaldi A., Kandyba EE., Edward M., Willberg C., Klenerman P., Patel AH., (2005). Liver cell lines for the study of hepatocyte functions and immunological response. *Liver Int*. 25:389-402.

Cura AJ. and Carruthers A., (2013). The role of Monosaccharide Transport Proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. *HHS Public Access*. 2: 863-914.

de Queiroga MA., de Andrade LM., Florencio KC., de Fatima Agra M., da Silva MS., Barbosa-Filho JM. and da-Cunha, EV., (2004). Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia*. 75: 423-425.

DeLeve LD., (2013). Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*. 123: 1861–1866.

Dixon LJ., Barnes M., Tang H., Pritchard MT. and Nagy LE., (2016). Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol*. 3: 785–797.

Dupont J. and Scaramuzzi RJ., (2016). Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochemical Journal*. 473: 1483-1501.

Eid HM., Nachar A., Thong F., Sweeney G. and Haddad PS., (2015). The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Pharmacogn Mag*. 11: 74–81.

Escorcia S., (2009). Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 17: 120-128.

Espejel-Nava JA. (2014). "Efecto de *Tillandsia usneoides* Linneo sobre la síntesis y secreción de insulina en células RINm5F". Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Tesis de Maestría).

Fayyaz S., Japtok L., Kleuser B., (2014). Divergent Role of Sphingosine 1-Phosphate on Insulin Resistance. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 34: 134-147.

Fernández-Velasco M., Ruiz-Hurtado G., Gómez AM., Rueda A., (2014). Ca²⁺ handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium*. 56: 397-407.

Friedman SL., (2010). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev.* 88: 125–172.

Galindo-García CG., Vega-Arias MJ., Hernández-Marín I., Ayala-Aquiles R., (2007). Mecanismos de acción de los agentes sensibilizantes de insulina en el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico. *Ginecología y Obstetricia de México.* 75: 148-154.

Gannon NP., Conn CA. and Vaughan RA., (2015). Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: A mini-review. *Molecular Nutrition and Food Research.* 59: 48-64.

Giacoman-Martinez A., (2015). “Extractos de Hibiscus sabdariffa L., Psacalium decompositum (A. Gray) H. Rob and Brettell y Tillandsia usneoides L. como posibles agonistas duales dePPARs”. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Tesis de Maestría).

Gissen P., Irwin MA., (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology.* 63: 1023–1037.

Gomez-Quiroz LE., Factor VM., Kaposi-Novak P., Coulouarn C., Conner EA. and Thorgeirsson SS., (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* 283: 14581- 14589.

Hernández M., and Gutiérrez J., (2012). Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Instituto de Nacional Salud Pública Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT).

Hernández-Rosado JV., (2012). "Participación de Cucurbita ficifolia Bouché en el metabolismo de la glucosa y lípidos mediante la activación de PPAR's en adipocitos y hepatocitos." Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Tesis de Maestría).

Higuchi N., Kato M., Miyazaki M., Tanaka M., Kohjima M., Ito T., Nakamuta M., Enjoji M., Kotoh K., Takayanagi R., (2011). Potential role of branched-chain amino acids in glucose metabolism through the accelerated induction of the glucose-sensing apparatus in the liver. *Journal of cellular biochemistry*. 112: 30-38.

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.* doi: 10.2147/DMSO.S16288.

Hornung-Leoni CT., (2011). Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10: 297-314.

Ibrahim SH., Akazawa Y., Cazanave SC., Bronk SF., Elmi NA., Werneburg NW., Billadeau DD., and Gores GJ., (2012). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibition Attenuates Hepatocyte Lipoapoptosis. *Journal Hepatology*. 54: 765-772.

Ishikawa M., Yoshida K., Okamura H., Ochiai K., Takamura H., Fujiwara N., (2013). Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1832: 2035-2043.

Jamaludin-Mohamed, Nazratun-Nafizah AH., Zariyantey AH. and Budin SB., (2016). Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage. Sultan Qaboos University Medical Journal. 16: e132–e141.

Ji-Hyeon L., Junghyo J., Anandwardhan AH., Vipul P. and Sushi GR., (2010). Cdk4 Regulates Recruitment of Quiescent β -Cells and Ductal Epithelial Progenitors to Reconstitutive β -Cell Mass, PLoS ONE, 5: 1-11.

Karim S., Adams DH. and Lalor PF., (2012). Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. World Journal of Gastroenterology. 18: 6771-6781.

Keller WJ., Bourn WM., Bonfiglio JF., (1981). A Folk Medicine for Diabetes Mellitus. Quarterly. Journal of. Crude Drug Research. 19: 49-51.

Kim S., Jung J., Kim H., Heo RW., Yi CO., Lee JE., Jeon BT., Kim WH., Hahm JR. and Roh GS., (2014). Exendin-4 Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Glucose Transporter 4 Expression in ob/ob Mice. Korean Journal of Physiology and Pharmacology. 18: 333-339.

Klip A., Tsakiridis T., Marette A. and Ortiz PA., (1994). Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 8: 43-53.

Kmieć Z., (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. Advances in anatomy, embryology, and cell biology. 161: 1-151.

Kolios G., Valatas V. and Kouroumalis E., (2006). Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease World J Gastroenterol. 12: 7413–7420.

Krentz AJ., Bailey CJ., (2005). Oral antidiabetic agents. *Drugs*. 65: 385-411.

Sánchez LP., (2013). Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*. 55: 17-25.

Liangyou R., (2014). Energy Metabolism in the Liver *Compr Physiol*. 4: 177–197.

Leturque A., Brot-Laroche E., and Le Gall M., (2009). GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*. 296: 985-992.

Li WL., Zheng HC., Bukuru J., y De Kimpe N., (2004). Natural Medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 1-2.

Linga Z., Shua N., Xua P., Wanga F., Zhonga Z., Suna B., Lib F., Zhanga M., Zhaoa M., Tanga X., Wanga Z., Zhua L., Liua L. and Liua X., (2016). Involvement of pregnane X receptor in the impaired glucose utilization induced by atorvastatin in hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 100: 98–111.

Lopez-Bilbao la Vieja I., (2005). Nuevas opciones terapeuticas para tratamiento de la Diabetis Mellitus tipo 2. *Cuadernos Hospital de Clínicas*. 50: 75-82.

López-Luengo MT., (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. *Published in Offarm*. 25: 82-88.

Marles RJ. y Farnsworth NR., (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 2: 137-189.

Maslaka E., Gregoriusa A., Chlopickia S., (2015). Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver. *Pharmacol Rep.* 67: 689-694.

Matsumoto M., Ogawa W., Teshigawara K., Inoue H., Miyake K., Sakaue H., Kasuga M., (2002). Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element-binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes.* 51: 1672–1680.

McCuskey RS., and Sipes IG., (2010). Introduction to the Liver and its Response to Toxicants. *Comprehensive Toxicology.* 9: 1-10.

Mercado-Mercado G., De la Rosa-Carrillo L., Wall-Medrano A., López-Díaz JA., y Álvarez-Parrilla E., (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria.* 28: 36-46.

Muñetón P., (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria* [Fecha de consulta: 30-09-16].

Nakatani K., Kaneda K., Seki S., Nakajima Y., (2004). Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.* 37: 29-36.

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. *European Journal of Pharmacology.* 761: 391-397.

Obel LF., Müller MS., Walls AB., Sickmann HM., Bak LK., Waagepetersen HS. and Schousboe A., (2012). Brain glycogen—new perspectives on its metabolic

function and regulation at the subcellular level. *Frontiers in Neuroenergetics*. doi: 10.3389/fnene.2012.00003.

Olivares-Arellano P., (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educacion Bioquimica*. 27: 9-18.

OMS. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005.

Qaseem A., Humphrey LL., Sweet DE., Starkey M., Shekelle P., (2012). Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*. 156: 218-231.

Rodríguez-Lay G., (2003). Insulinoterapia. *Revista Medica Herediana* 14: 140-144.

Rorsman P. and Braun M., (2013). Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annual Review of Physiology*. 75: 155-179.

Seung-Soon I., Seung-Youn K., So-Youn K., Ha-il K., Jae-Woo K., Kyung-Sup K. and Yong-Ho A., (2005). Glucose-Stimulated Upregulation of GLUT2 Gene Is Mediated by Sterol Response Element–Binding Protein-1c in the Hepatocytes. *American Diabetes Association*. 54: 1684-1691.

Singh S., Usman K. and Banerjee M., (2016). Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World Journal Of Diabetes*. 7(15):302-315.

Treyer A., and Müsch A., (2013). Hepatocyte Polarity. *Comprehensive Physiology*.3: 243-287.

Senoo H., (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 37: 3-15.

Tahrani AA., Piya MK., Kennedy A., Bammet AH., (2010). Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology and Therapeutics.* 125: 328-361.

Thorens B., (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia.* 58: 221–223.

Yogi-Yonamine C., Pinheiro-Machado E., Michalani ML., Corrêa-Giannella ML., (2016). Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: participation of the hepatic territory. *Nutrition and Metabolism.* doi: 10.1186/s12986-016-0103-0.

Welberg LA., Thiruvikraman K., Plotsky PM., (2005). Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Journal of Endocrinology.* 186: R7-R12.

Wetherup KM., McLaughlin JL., Judd RL., Ziegler MH., Medon PJ., Keller WJ., (1995). Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*). *Journal of Natural Products.* 58: 1285-1290.

Wong SK., Nurul Aiezzah Z., Embi N. and Hasidah MS., (2015). Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) Inhibition by Kaempferol Mediates the Anti-hyperglycaemic Effect of *Gynura procumbens*. *Malaysian Applied Biology Journal.* 44: 143-145.

Wu J., Yang X., Chen B. and Xu X., (2015). Pancreas β cell regeneration and type 1 diabetes (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 9: 653-657.

Zhang Y., Liu X., Han L., Gao X., Liu E. and Wang T., (2013). Regulation of lipid and glucose homeostasis by mango tree leaf extract is mediated by AMPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Food Chem* 141: 2896-2905.

Zhang Y., Yu, L., Cai W., Fan S., Feng L., Ji G. and Huang C., (2014). Protopanaxatriol, a novel PPAR γ antagonist from *Panax ginseng*, alleviates steatosis in mice. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep07375.

Zhi-Wen Y., Jonas B., Sven E., Ewa N., Lena S., Eriksson, JW, (2001). Insulin can enhance GLUT4 gene expression in 3T3-F442A cells and this effect is mimicked by vanadate but counteracted by cAMP and high glucose – potential implications for insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1535: 174-185.