



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Estudio fitoquímico y actividad antihiper glucémica e
hipolipidémica de *Salvia polystachya* Ort., en ratones con
diabetes experimental**

TESIS

Que para obtener el grado de doctora en ciencias biológicas y de la salud

Presenta

M. en C. ROCÍO ORTEGA GÓMEZ

Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Asesora:

Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera

Ciudad de México, Agosto de 2022



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Siglo XX y el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Fernando Calzada Bermejo, el Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y el asesoramiento de la Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 308404 que comprendió del periodo de 01/09/2017 al 31/10/2021. Así como al apoyo financiero para el proyecto otorgado por el IMSS, con número de registro FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/110. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de excelencia del CONACyT además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 05 de agosto del año 2022, quien suscribe Rocio Ortega Gomez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada “Estudio fitoquímico y actividad antihiper glucémica e hipolipidémica de *Salvia polystachya* Ort., en ratones con diabetes experimental”, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por el Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar, Dr. Fernando Calzada Bermejo y de la Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico rciortega@hotmail.com ; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Rocio Ortega Gomez

Matricula: 2173801871



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

La que suscribe Rocio Ortega Gomez, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y autora de la tesis o titulada: "Estudio fitoquímico y actividad antihiper glucémica e hipolipidémica de *Salvia polystachya* Ort., en ratones con diabetes experimental"

Declaro que:

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

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 05 de agosto del 2022.

Atentamente

Rocio Ortega Gomez



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana

A la unidad de estudios campus Iztapalapa

Al Instituto Mexicano del Seguro Social.

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología

Agradezco a cada uno de los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera

Así como a los miembros del jurado del examen pre-doctoral:

Dr. Normand García Hernández

Dra. Claudia Velásquez González

Dr. Cuahutemoc Pérez Gonzaález

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Por el tiempo brindado a la revisión de la tesis, así como por sus comentarios y sugerencias.



Agradecimientos

Al **Dr. Fernando Calzada Bermejo**, por su paciencia y por dirigirme por el camino de la investigación, por apoyarme y ayudarme en mi formación académica durante todo este tiempo. ¡Muchas gracias!

Al **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**, porque el apoyo y confianza que me brindó fueron esenciales en mi desarrollo, por todas las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio, por su orientación, sus consejos y por compartir sus conocimientos conmigo. ¡Gracias!

A la **Dra. Ángeles Fortis**, Por todo el tiempo y paciencia que dedico al trabajar conmigo, por sus valiosos consejos y sobre todo por su apoyo y entusiasmo hacia mi trabajo. ¡Gracias!

Al **Dr. Christian Guerra** y a la **Dra. Adelina Jiménez**, por sus consejos y palabras de aliento durante todo este tiempo.

Al **Dr. Julio Almanza** y el **Dr. Gerardo Blancas** por su confianza y hacerme sentir parte del laboratorio.

A los compañeros de la Unidad de Investigando Médica en Farmacología, Jesús, Tzayaka, Jessica, Carmen, Miguel, Ariel y Verence por los buenos momentos y su apoyo en todo momento.

A todos los que conforman el **Laboratorio en Farmacología**, por ayuda, amistad y los buenos momentos que hacían ameno el trabajo en el laboratorio.

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada: "Estudio fitoquímico y actividad antihiper glucémica e hipolipidémica de *Salvia polystachya* Ort., en ratones con diabetes experimental" que presentó la Maestra en Ciencias Biológicas y de la Salud, Rocio Ortega Gómez el día 05 de agosto del 2022.



Presidente

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Secretario

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Vocal

Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera

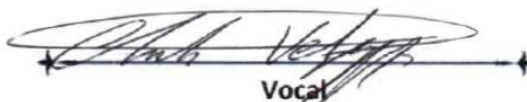
Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal

Dr. Normand García Hernández

Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica. UMAE
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Vocal

Dra. Claudia Velázquez González

Área académica de Farmacia, Instituto de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Diabetes mellitus en el mundo y en México	1
1.3. Clasificación de la diabetes mellitus	2
DMT1.....	2
DMT2.....	2
Formas híbridas de DM.....	3
Otros tipos específicos.....	3
Diabetes sin clasificación	5
Hiperglicemia detectada por primera vez durante el embarazo.....	5
1.4. Complicaciones de DMT2	5
1.5. Diagnóstico de DMT2.....	5
1.6. Fármacos utilizados en el tratamiento de DMT2.....	6
I. Biguadinas	6
II. Sulfonilureas	7
III. Tiazolidinedionas (TZD) o glitazonas	8
IV. Glinidas o meglitinidas.....	9
V. Inhibidores de α -glucosidasas.....	10
VI. Agonistas de GLP-1 y antagonistas de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)	11
VII. Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (ISGLT2)	12
1.7. Medicina tradicional en el control de DMT2.....	13
1.8. Salvias con efecto antidiabético	14
1.9. <i>Salvia polystachya</i> Ort. (Lamiaceae)	15
2. Justificación	20
3. Pregunta de investigación	21
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivo general	22
6. Objetivos específicos	23
7. Material y métodos	24
7.1 .Fitoquímica.....	24



7.1.1. Preparación del material vegetal	24
7.1.2. Preparación de los extractos.....	24
7.1.3. Fraccionamiento del extracto de tallo	24
7.1.4. Obtención de fracciones secundarias mediante columna abierta	24
7.1.5. Análisis cromatográfico de las fracciones secundarias	25
7.1.6. Caracterización de ácido oleanólico y ácido ursólico mediante HPLC.....	25
7.1.7. Docking molecular	25
7.2 Pruebas biológicas	26
7.2.1. Animales	26
7.2.2. Toxicidad aguda	26
7.2.3. Preparación y administración de tratamientos.....	27
7.2.4. Inducción de diabetes experimental (DME).....	27
7.2.5. Medición de glucemias	27
7.2.6. Modelo para pruebas agudas	28
7.2.7. Prueba subcrónica en ratones con DME	28
7.2.8. Prueba de orina.....	28
7.2.9. Toma de parámetros bioquímicos	28
7.2.10. Toma de hemoglobina glicada	28
7.2.11. Curvas de tolerancia oral a carbohidratos	29
7.2.12. Prueba “ <i>ex vivo</i> ” de inhibición de hidrolisis intestinal a glucosa y sacarosa	29
7.3 Análisis estadístico.....	30
8. Resultados	31
8.1. Rendimiento de los extractos	31
8.2. Toxicidad aguda.....	31
8.2.1 Perfil de orina	32
8.2.2 Peso corporal y peso relativo de órganos	32
8.3. Pruebas agudas.....	33
8.3.1. Evaluación de SpEET en ratones sanos	33
8.3.2. Evaluación de SpEET en ratones con DME	34
8.3.3. Fraccionamiento de SpEET y evaluación en ratones con DME.....	35



8.4. Prueba subcrónica con SpEET Y FrAcOEt.....	36
8.4.1. Efecto sobre la glucemia.....	36
8.4.2. Efecto sobre triglicéridos y HDL.....	36
8.4.3. Perfil de orina.....	37
8.4.4. Efecto sobre el peso corporal.....	38
8.5. Fraccionamiento químico e identificación de compuestos por CCF y HPLC-DAD.....	39
8.6. Evaluación de ácido oleanólico y ácido ursólico en ratones con DME.....	41
8.7. Pruebas de tolerancia oral a carbohidratos.....	43
8.7.1. Prueba de tolerancia oral a sacarosa (PTOS) y almidón (PTOA) de los productos obtenidos de SpEET.....	43
8.7.2. Prueba de tolerancia oral a glucosa (PTOG) y galactosa (PTOGaT) de los productos obtenidos de SpEET.....	45
8.8. Pruebas <i>ex vivo</i>	47
8.8.1. Inhibición de la hidrólisis intestinal de sacarosa de los productos obtenidos de SpEET.....	47
8.8.2. Inhibición de la hidrólisis intestinal de glucosa de los productos obtenidos de SpEET.....	48
8.9. Pruebas <i>in silico</i>	49
8.9.1. Docking molecular de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre α -glucosidasa.....	49
8.9.2. Docking molecular de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre SGLT1.....	49
9. Discusión.....	53
10. Conclusión.....	59
11. Perspectivas.....	60
12. Referencias.....	61
13. Anexo I.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Otros tipos específicos de DM.....	4
Tabla 2. Tratamientos y dosis administradas en pruebas de tolerancia oral.....	29
Tabla 3. Rendimiento de los extractos de flor, hoja y tallo de <i>S. polystachya</i> de las colectas de los años 2016 y 2018.....	31
Tabla 4. Mortalidad registrada en un lapso de 14 días después de administrar vía oral: SpEET, SpEEF y SpEEH a dosis de 50, 300 y 2000 mg/kg en ratones sanos hembra (n=3) de la cepa Balb-C. DL ₅₀ determinada para cada extracto de acuerdo a la OECD 423.....	31
Tabla 5. Perfil de orina realizado en ratones hembra sanos (BalbC) que fueron sometidos a pruebas de toxicidad aguda bajo los tratamientos de SpEET, SpEEF y SpEEH a dosis de 50, 300, y 2000 mg/kg (n=3).....	32
Tabla 6. Peso corporal (g) y peso relativo de órganos (g) de ratones hembra sanos sometidos a pruebas de toxicidad aguda.....	33
Tabla 7. Efecto agudo de SpEET sobre la glucemia de ratones macho sanos.....	34
Tabla 8. Efecto agudo de SpEET sobre la glucemia de ratones macho con DME.....	34
Tabla 9. Rendimiento de la fracción acuosa residual (FrAcR) y acetato de etilo (FrAcOEt) obtenidas a partir del extracto etanólico de tallo de <i>S. polystachya</i> (SpEET).....	35
Tabla 10. Efecto agudo de FrAcR y FrAcOEt en ratones con DME.....	35
Tabla 11. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre las concentraciones de triglicéridos y HDL de ratones con DME.....	37
Tabla 12. Perfil de orina de ratones con DME administrados subcrónicamente con SpEET y FrAcOEt.....	38
Tabla 13. Compuestos identificados, sistemas de elusión y R _f calculados mediante cromatografía analítica en capa fina de la fracción secundaria FrSec6 obtenida a partir de FrAcOEt.....	41
Tabla 14. Efecto agudo de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre la glucosa de ratones con DME.....	41
Tabla 15. Inhibición de la hidrólisis intestinal de sacarosa (HIS). Glucosa medida en el medio acuoso externo, porcentaje de inhibición y CI ₅₀ calculado después de la adición de tratamientos.....	47
Tabla 16. Prueba de inhibición de la absorción intestinal de glucosa (AIG). Glucosa medida en el medio acuoso externo, porcentaje de inhibición y CI ₅₀ calculado después de la adición de tratamientos.....	48
Tabla 17. Interacciones de ácido oleanólico, ácido ursólico, acarbosa y canagliflozina con los residuos en los sitios de unión de las enzimas α-glucosidasa y SGLT1.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de metformina.....	7
Figura 2. Estructura química de glibenclamida.....	8
Figura 3. Estructura química de a) rosiglitazona y b) pioglitazona	9
Figura 4. Estructura química de a) repaglinida y b) nateglinida.....	10
Figura 5. Estructura química de acarbosa	11
Figura 6. Estructura química de: a) exenatida y b) sitagliptina	12
Figura 7. Estructura química de canaglifozina	13
Figura 8. Partes de <i>S.polystachya</i>	16
Figura 9. Estructuras químicas de los compuestos identificados en <i>S. polystachya</i>	18
Figura 10. Peso (mg) y cromatograma de las fracciones secundarias (FrSec) 1-10 obtenidas de FrAcOEt, revelada con H ₂ SO ₄ al 10% y observada bajo luz UV de onda larga.	40
Figura 11. Co-cromatograma de A) AO: ácido oleanólico vs FrSec6 y B) AU: ácido ursólico vs FrSec6, placas reveladas con H ₂ SO ₄ al 10% y observadas bajo luz UV de onda larga.	40
Figura 12. Cromatogramas HPLC-DAD de: a) FrAcOEt; b) FrSec6; c) ácido oleanólico y d) ácido ursólico	42
Figura 13. Modelo estructural 3D del acoplamiento molecular sobre la enzima α -glucosidasa y sus posiciones con el sitio de unión con: acarbosa, ácido oleanólico y ácido ursólico.	51
Figura 14. Modelo estructural 3D del acoplamiento molecular sobre el cotransportador SGLT1 y sus posiciones con el sitio de unión con canagliflozina, ácido oleanólico y ácido ursólico.	52
Figura 15. Estructura química de los terpenos identificados en <i>S.polystachya</i>	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con DME	36
Gráfica 2. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre el peso corporal de ratones con DME	39
Gráfica 3. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de <i>S. polystachya</i> en la prueba de tolerancia oral a sacarosa de grupos tratados con A) SpEET y FrAcOEt y B) AO y AU.....	43
Gráfica 4. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de <i>S. polystachya</i> en la prueba de tolerancia oral a almidón de grupos tratados con A) SpEET y FrAcOEt y B) AO y AU	44
Gráfica 5. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de <i>S. polystachya</i> en la prueba de tolerancia oral a glucosa de grupos tratados con A) SpEET y FrAcOEt y B) AO y AU.	45
Gráfica 6. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de <i>S. polystachya</i> en la prueba de tolerancia oral a galactosa de grupos tratados con A) SpEET y FrAcOEt y B) AO y AU.	46

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AIG	Absorción intestinal de glucosa
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
DM	Diabetes mellitus
DME	Diabetes mellitus experimental
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa-4
E.E.M	Error estándar de la media
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EtOH	Etanol
FID	Federación Internacional de la Diabetes
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FrAcOEt	Fracción de acetato de etilo
FrAcR	Fracción acuosa residual
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic peptide</i>
GLP-1	Péptido similar a glucagón tipo 1
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
Hb1Ac	Hemoglobina glucosilada 1Ac
HIS	Hidrólisis intestinal de sacarosa
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IMC	Índice de Masa Corporal
i.p	Intraperitoneal
KATP	<i>ATP-sensitive potassium channels</i>
KIR 6.2	Subunidades rectificadoras de entrada de K ⁺ del isotipo 6.2
L-Ca²⁺	Canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mg/dL	Miligramo sobre decilitro
mg/kg	Miligramo sobre kilogramo
NA	Nicotinamida
NaCl	Cloruro de sodio
NO	Óxido Nítrico
OCT1	<i>Organic Cation Transporter 1</i>
OCT2	<i>Organic Cation Transporter 2</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMAT	Plasma Membrane Monoamine Transporter



PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
RI	Resistencia a la insulina
RD	Retinopatía diabética
SLC5	<i>Sodium/glucose cotransport family</i>
SpEEF	Extracto etanólico de flor de <i>S.polystachya</i>
SpEEH	Extracto etanólico de hoja de <i>S.polystachya</i>
SpEET	Extracto etanólico de tallo de <i>S.polystachya</i>
STZ	Estreptozotocina
SUR1	<i>Sulfonylurea receptor -1</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
TZD	Tiazolidinedionas
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
v.i.	Vía intragástrica
WHO	<i>World Health Organization</i>
AcOEt	Acetato de etilo
AIG	Absorción intestinal de glucosa

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad endocrino metabólica caracterizada por una deficiencia o resistencia a la insulina que conduce a un estado de hiperglucemia crónica, desencadenando cambios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. En la medicina tradicional mexicana, las plantas medicinales son ampliamente utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de la diabetes mellitus (DM). Entre estas se reportan diferentes especies del género *Salvia* (Lamiaceae), que en nuestro país está representado por 312 especies; de las cuales, un porcentaje importante (85-88%) es endémico; basándonos en el criterio de selección químico taxonómico *S. polystachya* Ort., comparte relaciones filogenéticas con otras especies que han sido utilizadas como antidiabéticas, por lo que esta especie podría ser la fuente de nuevos metabolitos con efecto antidiabético.

OBJETIVO GENERAL. Realizar un estudio biodirigido utilizando el extracto etanólico de *S. polystachya* en modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in silico* e identificar compuestos con potencial antidiabético mediado por la inhibición de enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1.

METODOLOGIA. Las partes aéreas de *S. polystachya* fueron maceradas en etanol para la obtención de los extractos de tallo (SpEET), flor (SpEEF) y hoja (SpEEH), la toxicidad aguda para cada extracto fue determinada siguiendo los lineamientos de la norma OECD 423. El extracto con menor toxicidad (SpEET), se eligió para determinar su efecto sobre la glucemia de ratones macho sanos y en un modelo de diabetes mellitus experimental (DME) inducido con estreptozotocina/nicotinamida (SZT/NA), realizando pruebas agudas (0, 30, 60, 90 y 120 min). Posteriormente SpEET fue sometido a un fraccionamiento líquido/líquido obteniendo dos fracciones: acuosa residual (FrAcR) y acetato de etilo (FrAcOEt), ambas fracciones se sometieron a pruebas glucémicas agudas, en donde la FrAcOEt fue la fracción más activa. El extracto completo (SpEET) y la FrAcOEt se sometieron a una prueba subcrónica (45 días) en ratones con DME, registrando semanalmente el peso de los animales y los niveles de glucosa y, quincenalmente los triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un examen general de orina. Para la purificación de compuestos de la FrAcOEt, se realizó una cromatografía en columna abierta de fase normal, obteniendo diez fracciones secundarias (FrSec1-FrSec10); como primer paso estas fracciones fueron comparadas con 42 compuestos estándar de diferentes polaridades utilizando técnicas cromatográficas y un análisis de HPLC para confirmar la presencia de los compuestos identificados. Los compuestos identificados se evaluaron en pruebas agudas en ratones con DME. Para determinar el efecto inhibitorio de enzimas α -glucosidasas y del cotransportador sodio-glucosa (SGLT1) se realizaron pruebas de tolerancia oral a sacarosa (PTOS), almidón (PTOA), glucosa (PTOG) y galactosa (PTOGaT), así como pruebas *ex vivo*, en donde se realizaron ensayos de hidrólisis intestinal de sacarosa (HIS) y de absorción intestinal de glucosa (AIG). Finalmente, en las pruebas *in silico* se realizaron



análisis de acoplamiento molecular (docking) de ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO) contra la enzima α -glucosidasa y el cotransportador SGLT1.

RESULTADOS: En la prueba de toxicidad aguda, el extracto etanólico de tallo (SpEET) fue clasificado en categoría 5 ($DL_{50} = 2500 > 5000$ mg/kg) de bajo riesgo toxicológico. En las pruebas glucémicas agudas, SpEET disminuyó la glucemia en ratones sanos (200 mg/kg) y diabéticos (100 mg/kg); de las fracciones obtenidas FrAcOEt mostró mayor actividad al disminuir la glucemia de ratones con DME a la dosis de 50 mg/kg. Al finalizar la prueba subcrónica (45 días), SpEET y FrAcOEt disminuyeron la glucemia y TG, aumentando HDL. En la fracción secundaria 6 (FSec6) obtenida de FrAcOEt fueron aislados AO y AU, en pruebas agudas ambos compuestos disminuyeron las glucemias de ratones con DME a dosis de 50 mg/kg. Durante las pruebas de tolerancia oral a carbohidratos, todos los tratamientos (SpEET, FrAcOet, AO y AU) redujeron el pico posprandial, de forma similar a los fármacos control. En la prueba de HIS, se obtuvieron valores de IC_{50} de 726,3 y 739,9 μ M para AO y AU, respectivamente; y en las pruebas de AIG, se obtuvieron valores de IC_{50} de 849,3 y 966,6 μ M para AO y AU, respectivamente. Finalmente, en los estudios de acoplamiento molecular para la enzima α -glucosidasa, AO y AU mostraron valores de ΔG de -5,48 y -6,41 kcal/mol, respectivamente y en la inhibición del cotransportador SGLT1, AO y AU mostraron valores de ΔG de -9,65 y -10,55 kcal/mol. Con estos resultados se propone que AO y AU podrían ser inhibidores de las enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1, reduciendo la absorción de carbohidratos y la hiperglucemia posprandial en la diabetes. Estos datos apoyan la hipótesis de que *S. polystachya* es una fuente potencial de agentes antidiabéticos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, *Salvia polystachya*; ácido oleanólico; ácido ursólico; actividad antihiperglucémica; inhibición de α -glucosidasa; inhibición de SGLT1.



Abstract

INTRODUCTION. Diabetes mellitus type 2 (DMT2) is an endocrine-metabolic disease characterized by a deficiency or resistance to insulin, that leads to state of chronic hyperglycemia, triggering changes in carbohydrate, lipid and protein metabolism. In the traditional mexican medicine, the medicinal plants are widely used as adjuvants in the treatment of diabetes mellitus (DM). Among these, are reported different species of the genus *Salvia* (Lamiaceae), which in our country is represented by 312 species; of them, an important percentage (85-88%) is endemic. Based on the chemotaxonomic selection criteria, *S. polystachya* Ort., due to its phylogenetic relationships with other species that have been used as an antidiabetic, so *S. polystachya* could be a new source of metabolites with antidiabetic effect so this species could be the source of new metabolites with antidiabetic effect.

GENERAL OBJECTIVE. Carry out a bioguided study with the ethanolic extract of *S. polystachya* over *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* models and identify compounds with antidiabetic potential, mediated by the inhibition of α -glucosidase enzymes and the SGLT1 cotransporter.

METHODOLOGY. The aerial parts of *S. polystachya* were macerated in ethanol to obtain the stem (SpEET), flower (SpEEF) and leaf (SpEEH) extracts. The acute toxicity for each extract was determined following OECD 423 guidelines. The extract with less toxicity (SpEET) was chosen to determine its effect on glycemia in healthy male mice and in a model of experimental diabetes mellitus (DME) induced with streptozotocin/nicotinamide (SZT/NA), performing acute tests (0, 30, 60, 90 and 120 min). SpEET was subsequently subjected to liquid/liquid fractionation, obtaining two fractions: residual aqueous (FrAcR) and ethyl acetate (FrAcOEt), both fractions were subjected to acute glycemetic tests, where FrAcOEt was the most active fraction. The complete extract (SpEET) and FrAcOEt were subjected to a subchronic test (45 days) in mice with DME, weekly recording the weight of the animals and the levels of glucose and, fortnightly the triglycerides (TG), high-density lipoproteins (HDL) and a general urine test. For the purification of compounds of the FrAcOEt, a normal phase open column chromatography was performed obtaining ten secondary fractions (FrSec1-FrSec10); As a first step, these fractions were compared with 42 standard compounds of different polarities using chromatographic techniques and a HPLC analysis was performed to confirm the presence of the identified compounds. The identified compounds were evaluated in acute tests in DME mice. To determine the inhibitory effect of α -glucosidase enzymes and the sodium-glucose cotransporter (SGLT1), oral tolerance tests to sucrose (PTOS), starch (PTOA), glucose (PTOG) and galactose (PTOGaT) were performed, as well as *ex vivo* tests, where performed intestinal sucrose hydrolysis (HIS) and intestinal glucose

absorption (AIG) assays. Finally, *in silico* tests, molecular docking analyzes of oleanolic acid (AO) and ursolic acid (AU) against the α -glucosidase enzyme and the SGLT1 cotransporter were performed.

RESULTS: In the acute toxicity test, the ethanolic stem extract (SpEET) was classified in category 5 ($DL_{50} = 2500 > 5000$ mg/kg) of low toxicological risk. In acute glycemic tests, SpEET lowered blood glucose in healthy (200 mg/kg) and diabetic mice (100 mg/kg); of the fractions obtained, FrAcOEt showed greater activity lowering the glycemia of mice with DME at a dose of 50 mg/kg. At the end of the subchronic test (45 days), SpEET and FrAcOEt decreased glycemia and TG, and increasing HDL. In the secondary fraction 6 (FrSec6) obtained from FrAcOEt, AO and AU were isolated. In acute tests, both compounds lowered glycemia in mice with DME at dose of 50 mg/kg. During oral carbohydrate tolerance tests, all treatments (SpEET, FrAcOet, AO and AU) reduced the postprandial peak, similar to the control drugs.

In the HIS test, IC_{50} values of 726.3 and 739.9 μ M were obtained for AO and AU, respectively; and in the AIG tests, IC_{50} values of 849.3 and 966.6 μ M were obtained for AO and AU, respectively. Finally, in the molecular docking studies for the α -glucosidase enzyme, AO and AU showed ΔG values of -5.48 and -6.41 kcal/mol, respectively, and in the inhibition of the SGLT1 cotransporter, AO and AU showed ΔG values of -9.65 and -10.55 kcal/mol. These results suggest that AO and AU could be inhibitors of α -glucosidase enzymes and the SGLT1 cotransporter, reducing carbohydrate absorption and postprandial hyperglycemia in diabetes condition. These data support the hypothesis that *S. polystachya* is a potential source of antidiabetic agents.

Key words: Diabetes mellitus, *Salvia polystachya*; ursolic acid; oleanolic acid; antihyperglycemic activity; α -glucosidase inhibitor; SGLT1 inhibitor.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome de hiperglucemia crónica que puede afectar a todos los órganos del cuerpo y causar severas complicaciones. Resulta de la deficiencia, por parte de las células β pancreáticas, en la producción de la hormona insulina, ya sea por una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos o por una disminución en la eficacia en los mecanismos de señalización (resistencia a la insulina) [Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal, 2013; ADA, 2014; Aylwin, 2016]. La insulina es una hormona esencial producida en el páncreas que permite la entrada de glucosa del torrente sanguíneo a las células en donde se convierte en energía o se almacena, también es esencial para el metabolismo de proteínas y grasas.

La deficiencia de insulina, o la incapacidad de las células para responder a ella, conduce a altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), que es el indicador clínico de la diabetes [FID, 2019; Olivares y Arellano, 2008]. La exposición a la hiperglucemia crónica puede resultar en complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y complicaciones macrovasculares (infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica), así como amputación de miembros inferiores. Por otra parte, cuando el síndrome se desarrolla durante el embarazo, aumenta el riesgo de muerte fetal [OMS, 2016; Egan & Dinneen, 2018]. La DM con o sin tratamiento, es progresiva; tiene un alto impacto social en materia de salud pública y dependiendo de la evolución de la enfermedad y del grado de control, puede acelerar o retrasar el deterioro del paciente diabético [Cervantes-Villagrana y Presno-Bernal, 2013; ADA, 2014; Aylwin, 2016; WHO, 2019].

1.2. Diabetes mellitus en el mundo y en México

La DM se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID) en el año 2021 a nivel mundial, se reportaron 587 millones de personas diabéticas adultas entre 20-79 años, de las cuales, 360 millones se encuentran en zonas urbanizadas y 176.6 millones en áreas rurales, siendo China, India, Pakistán, Estados Unidos, Indonesia, Brasil y México los países con mayor número de diabéticos [FID, 2021].

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en el año 2018 se reportaron 82,767,605 mayores de 20 años con DM, de las cuales, el 5.1 millones (13.22 %) son mujeres y 3.4 millones (7.75 %) son hombres [Shamah-Levy y col., 2020]. En México, la diabetes afecta a 12.8 millones de personas, y se estima que 3.7 millones de personas desconocen su condición [Basto-Abreu y col., 2021]. Cerca de 4 millones de muertes al año están relacionadas directamente con esta afección (lo que equivale a una de cada

20 muertes, 8 700 muertes cada día y 6 cada minuto) [Vintimilla y col., 2019], en donde los cambios en el estilo de vida de la población son factores determinantes. Además, las personas diagnosticadas con DM tienen mayor vulnerabilidad a sufrir complicaciones discapacitantes y a una reducción significativa en la esperanza de vida y, con el tiempo, el gasto económico originado por las complicaciones es tres veces superior al de su tratamiento y control [Olokoba y col., 2012; Mata y col., 2013].

1.3. Clasificación de la diabetes mellitus

La hiperglucemia es la característica común de todos los tipos de diabetes, los cuales se diferencian por su etiología, su mecanismo patogénico y su tratamiento. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una clasificación tomando en cuenta los parámetros clínicos para identificar diferentes subtipos de diabetes, agrupándolos en 6 grupos:

- Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1).
- Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).
- Formas híbridas de DM.
- Otros tipos específicos.
- Diabetes sin clasificación.
- Hiperglicemia detectada por primera vez durante el embarazo.

DMT1. Se desarrolla por un proceso autoinmune, en donde, el sistema inmune ataca a las células β del páncreas, disminuyendo la secreción de insulina y, en otros casos, esta es nula. La causa de este proceso no se comprende completamente, pero se ha estipulado que se desencadena por una compleja interacción entre diferentes genes y factores ambientales (como una infección viral). Esta condición puede desarrollarse a cualquier edad; sin embargo, se ha estimado un incremento anual de incidencia entre el 3 y 4% en la infancia y, de los casos registrados de DMT1, un 42% se detecta antes de los 30 años [Egan & Dinneen, 2018; WHO, 2019]. Las características clínicas que presentan estos individuos incluyen un índice de masa corporal bajo, uso de insulina dentro de los 12 meses posteriores al diagnóstico, y mayor riesgo de cetoacidosis diabética [WHO, 2019].

DMT2. Es el tipo de diabetes más común; se presenta con una frecuencia del 90–95% de los casos de diabetes; se caracteriza por una disfunción en las células β y, en consecuencia, defectos en la secreción/acción de insulina o la presencia de ambos factores. Puede iniciar como una descompensación hiperosmolar y la mayoría de los pacientes (60%) presentan algún grado de obesidad; quienes no lo son, según los criterios del índice de masa corporal (IMC), presentan un mayor grado de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal, lo que indica mayor adiposidad visceral en comparación con las

personas sin diabetes, empatando con el diagnóstico de síndrome metabólico y, por tanto, con resistencia a la insulina (RI) [WHO, 2019]. Esta patología está asociada con factores genéticos, envejecimiento y estilo de vida sedentario [Vintimilla y col., 2019].

Para la mayoría de las personas con DMT2, el tratamiento con insulina no es necesario para sobrevivir, pero puede ser necesario para reducir la hiperglucemia y evitar complicaciones crónicas. La DMT2 a menudo no se diagnostica durante muchos años porque la hiperglucemia no es lo suficientemente grave como para provocar síntomas perceptibles de diabetes; sin embargo, las complicaciones a largo plazo son el mayor problema, en donde se incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía. Además, se tiene un mayor riesgo a desarrollar enfermedades cardíacas, arteriales periféricas y cerebrovasculares, cataratas, disfunción eréctil y enfermedad del hígado graso no alcohólico, entre otras [Egan & Dinneen, 2018; Vintimilla y col., 2019; WHO, 2019]. La DMT2 y sus complicaciones asociadas contribuyen al 8.4% de las muertes en todo el mundo, consumiendo importantes recursos sanitarios [Nanayakkara y col., 2021]. Aunque el diagnóstico se realiza normalmente en adultos, cada vez la edad de diagnóstico es menor, llegando a diagnosticarse en adolescentes y en niños [Sanzana & Durruty, 2016]

Formas híbridas de DM. La “hipótesis del acelerador” se describió por primera vez en 2001 y argumenta que DMT1 y DMT2 son el mismo desorden, pero puede distinguirse por tres aceleradores uno intrínseco: muerte de las células β y, dos adquiridos: 1) RI provocada por aumento de peso, grasa visceral y sedentarismo y 2) destrucción las células β por procesos autoinmunes generada por factores genéticos [Libman, 2009; Khawandanah, 2019]. La forma híbrida (doble diabetes) se refiere a los casos en donde el paciente demuestra características de TDT1 y DMT2, en donde, la obesidad y acantosis nigricans no son características exclusivas de pacientes adultos con DMT2, ya que también puede presentarse durante la juventud (11-19 años), como resultado del aumento de peso y RI por destrucción autoinmune de células β , ya sea por presencia de anticuerpos o como una respuesta anormal de los linfocitos a antígenos celulares de los islotes pancreáticos [Libman, 2009; Khawandanah, 2019].

Otros tipos específicos. Agrupa una serie de situaciones clínicas que se presentan con baja frecuencia y está constituido por 8 subgrupos (**Tabla 1**); se incluyen síndromes de diabetes monogénica, como la diabetes neonatal y la diabetes del inicio de la madurez de los jóvenes, enfermedades del páncreas exocrino como fibrosis quística y pancreatitis, diabetes inducida por químicos o medicamentos como con el uso de glucocorticoides en el tratamiento de VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos [Sanzana & Durruty, 2016; WHO, 2019].

Tabla 1. Otros tipos específicos de DM.

A. DEFECTOS GENÉTICOS EN LA FUNCIÓN DE DIABETES MELLITUS	
1. Cromosoma 12, HNF-1 β (MODY3)	5. Diabetes neonatal transitoria
2. Cromosoma 20, HNF-4 β (MODY1))	6. Diabetes neonatal permanente
3. Cromosoma 7, glucoquinasa (MODY2)	7. ADN mitocondrial
4. Otras formas muy raras de MODY	
B. DEFECTOS GENÉTICOS EN LA ACCIÓN DE LA INSULINA	
1. Resistencia a la insulina tipo A	
2. Leprechaunismo	
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall	
4. Diabetes lipoatrófica	
C. ENFERMEDADES DEL PÁNCREAS EXOCRINO	
1. Pancreatitis	5. Hemocromatosis
2. Trauma/pancreatectomía	6. Pancreatopatía fibrocalculosa
3. Neoplasia	
4. Fibrosis quística	
D. ENDOCRINOPÁTÍAS	
1. Acromegalia	5. Hipertiroidismo
2. Síndrome de Cushing	6. Somatostatina
3. Glucagonoma	7. Aldosteronoma
4. Feocromocitoma	
E. INDUCIDA POR FÁRMACOS O SUSTANCIAS	
1. Vacor	6. Diazóxido
2. Pentamidina	7. Agonistas β -adrenérgicos
3. Ácido nicotínico	8. Tiazidas
4. Glucocorticoides	9. Dilantin
5. Hormona tiroidea	10. Interferón-Y
F. INFECCIONES	
1. Rubéola congénita	
2. Citomegalovirus	
G. FORMAS INFRECIENTES DE DIABETES MEDIADA POR INMUNIDAD	
1. Síndrome de "Stiff-man"	
2. Anticuerpos anti receptores de insulina	
H. OTROS SÍNDROMES GENÉTICOS OCASIONALMENTE ASOCIADOS A DIABETES	
1. Síndrome de Down	6. Corea de Huntington
2. Síndrome de Klinefelter	7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
3. Síndrome de Turner	8. Distrofia miotónica
4. Síndrome de Wolfram	9. Porfiria
5. Ataxia de Friedreich	10. Síndrome de Prader-Willi

Tomado de Sanzana & Durruty, 2016.

Diabetes sin clasificación. Debido a la dificultad de clasificar el tipo de DM en el momento del diagnóstico fue propuesta la categoría “sin clasificación” con la finalidad de darle seguimiento hasta tener un diagnóstico definitivo [WHO, 2019].

Hiperglicemia detectada por primera vez durante el embarazo. La diabetes mellitus gestacional (DMG) se refiere a un trastorno en la tolerancia de carbohidratos que resulta en hiperglucemia sostenida que inicia o se diagnostica por primera vez en cualquier momento del período prenatal. Se acompaña de un aumento de las complicaciones perinatales (macrosomía, cesáreas, distocia de hombros, parálisis del plexo braquial) y no se espera que persistan después del parto. Los factores de riesgo incluyen obesidad, intolerancia a la glucosa, historia familiar de diabetes mellitus y antecedente de óbito fetal [Bougherara y col., 2018; Torres y col., 2018; WHO, 2019; FID, 2021].

1.4. Complicaciones de DMT2

Bajo el término de complicaciones crónicas de la DM se agrupa un conjunto de procesos causados a largo plazo por las alteraciones metabólicas características de la DM. Se ha denominado como complicaciones microvasculares a aquellos cuadros en los que predominantemente se afecta a la microcirculación y, por el contrario, si las alteraciones se producen en los vasos de mayor calibre se habla de complicaciones macrovasculares [Valdés & Bencosme, 2010; Bosque y col., 2019].

El mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre, presión arterial y colesterol puede ayudar a retrasar o prevenir las complicaciones de la diabetes, sin embargo, pacientes con 15 años de evolución de esta enfermedad causa en un 2% de ellos ceguera y en un 50% muerte por alguna enfermedad cardiovascular [Cordero-Hernández y Pinto-Almazán, 2014].

1.5. Diagnóstico de DMT2

En la mayoría de los casos, la progresión de la diabetes es lenta, puede pasar desapercibida hasta que las primeras complicaciones aparecen, aumentando la probabilidad de muerte prematura y el aumento de los costos de atención médica [Basto-Abreu y col., 2021]. Los síntomas comunes son: poliuria, polidipsia y polifagia astenia y/o pérdida de peso. La glucemia de una persona sana habitualmente oscila entre 80 y 90 mg/dL por la mañana, antes del desayuno, y se eleva hasta 120-140 mg/dL en la primera hora después de una comida. El diagnóstico de DM se establece por la elevación de la glucemia en condiciones basales o después de una sobrecarga con glucosa. En la actualidad, el diagnóstico de DM2 se establece siguiendo los criterios consensados en 1999 por la ADA y la OMS, en donde se consideran cuatro situaciones diferentes dentro de las alteraciones hiperglucemiantes del metabolismo de la glucosa:

1. Glucosa anormal en ayunas (GAA). Este grupo debe presentar una concentración plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL en ayunas de 8 horas.
2. Intolerancia a la glucosa. Este diagnóstico exige la realización de una prueba de tolerancia oral a glucosa (75 g de glucosa) y se consideran dos parámetros: la glucemia basal y la glucemia a las 2 h de la ingesta de glucosa. Si la glucemia a las 2 horas es < 140 mg/dL se considera normal, pero si se encuentra en valores entre 140 y 200 mg/dL, el diagnóstico es intolerancia a la glucosa.
3. Hemoglobina glicada (A1C) $\geq 6.5\%$. Esta prueba debe realizarse en laboratorios certificados.

Los síntomas de DM y una glucemia en cualquier momento del día y sin relación con el ayuno o ingesta previa ≥ 200 mg/dL son suficientes para un diagnóstico positivo.

1.6. Fármacos utilizados en el tratamiento de DMT2

El tratamiento de la DMT2 busca asegurar la buena calidad de vida del paciente, así como evitar el desarrollo de descompensaciones agudas y complicaciones crónicas. Durante los últimos años se han desarrollado otras diferentes dianas terapéuticas que han supuesto la aparición de varios grupos farmacológicos [Vintimilla y col., 2019]. Hasta el momento existen siete grupos principales de fármacos que se utilizan para el control de la DMT2:

- I. Biguanidas
- II. Sulfonilureas
- III. Tiazolidinedionas (Glitazonas)
- IV. Glinidas (meglitinidas)
- V. Inhibidores de α -glucosidasas
- VI. Agonistas de GLP-1
- VII. Antagonistas de DPP-4
- VIII. Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (ISGLT2)

I. Biguanidas. Son fármacos sensibilizadores a la insulina que disminuyen la hiperglucemia sin estimular la producción de insulina. Aunque pueden producir ganancia de peso e hipoglucemia, tienen efectos benéficos en reducir los lípidos circulantes (triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total), cuyo incremento está asociado a un mayor riesgo cardiovascular [Tran y col., 2015; Rodríguez-Rivera y col., 2017]. La metformina (**Figura 1**) es el fármaco más utilizado en este grupo [Olokoba y col., 2012]; es una dimetilguanida que reduce los niveles elevados de glucosa sanguínea al disminuir la producción hepática de glucosa e incrementar la sensibilidad periférica a insulina, inhibe la absorción intestinal de glucosa e incrementa la recaptura de glucosa por musculo esquelético. Después de su administración oral, la

metformina es absorbida en el intestino por el transportador de monoaminas de la membrana plasmática (PMAT por sus siglas en inglés) y llevada por la vena porta hepática al hígado por el transportador de iones orgánicos 1 (OCT1); no se conocen interacciones importantes con otros fármacos. Su eliminación vía renal está mediada por OCT2 y se excreta sin ser metabolizada. [Rodríguez-Rivera y col., 2017;]. Dentro de los efectos adversos identificados en este grupo se encuentran: intolerancia gastrointestinal, cefalea, alergias cutáneas transitorias, vómito y sabor metálico, el principal efecto adverso que presentan es la acidosis láctica [Tran y col., 2015; Rodríguez-Rivera y col., 2017; IMSS, 2018].

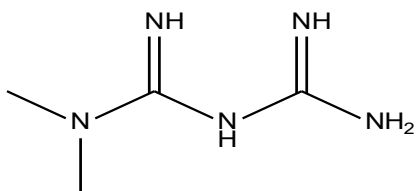


Figura 1. Estructura química de metformina.

II. Sulfonilureas. Son fármacos que incrementan la liberación de insulina (secretagogos de insulina) actuando sobre receptores específicos de las células β pancreáticas, por lo que es necesaria cierta integridad funcional pancreática. Esta liberación ocurre cuando las sulfonilureas se unen a un receptor específico situado en la membrana de la célula β (SUR-1) que, junto con una unidad interna “rectificadora” (K_{IR} 6.2), inhiben los canales de potasio sensibles a ATP (KATP por sus siglas en inglés) y promueven la liberación de insulina a largo plazo. En las células β -pancreáticas, la glucosa es transportada al citosol por el transportador de glucosa 2 (GLUT-2), donde se desata la producción de ATP y disminuye el ADP. Los KATP son bloqueados por ATP de forma fisiológica. El aumento en la glucosa citosólica disminuye entonces la actividad de los KATP, lo que ocasiona que la membrana se despolarice, desencadena un potencial de acción que activa canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L ($L-Ca^{2+}$) y provoca un influjo de Ca^{2+} que origina la exocitosis de gránulos transportadores de insulina [González-Sánchez & Ortiz-Andrade, 2012; Rodríguez-Rivera y col., 2017].

Todas las sulfonilureas se unen al mismo sitio del receptor. La diferencia de la potencia entre ellas se debe al grado de afinidad con el receptor, clasificándose en fármacos de primera generación (tolbutamida y clorpropamida), segunda generación (glicazida, glipentida y glipizida) y tercera generación, que se caracterizan por ser moléculas más complejas y con acción sostenida de 24 h, como glimepirida y glibenclamida (**Figura 2**) [Tran y col., 2015; Kumar y col., 2017].

Los principales efectos adversos se asocian con ganancia de peso, hipoglucemia, urticaria, fatiga, debilidad, cefalea, náusea, diarrea, hepatitis reactiva, anemia hemolítica e hipoplasia medular y, en combinación con otros medicamentos, incrementan el riesgo de hipoglucemia, mareo, nerviosismo, y distensión abdominal [Tran y col., 2015; Qaseem y col., 2017; IMSS, 2018].

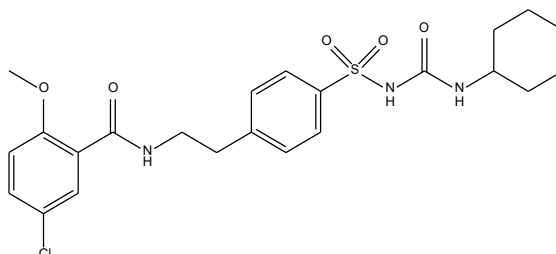


Figura 2. Estructura química de glibenclamida

III. Tiazolidinedionas (TZD) o glitazonas. Los fármacos más utilizados son rosiglitazona y pioglitazona (**Figura 3a y 3b**). Son sensibilizadoras a la insulina al ser agonistas selectivos del receptor de peroxisoma activador del proliferador de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ por sus siglas en inglés), un receptor de la membrana nuclear que se expresa principalmente en adipocitos; su activación regula el metabolismo de carbohidratos, disminuyendo los niveles de lípidos en sangre [Hidalgo-Figueroa y col., 2017; Rodríguez-Rivera y col., 2017]. Aumentan la expresión de genes involucrados en la adipogénesis y la oxidación de ácidos grasos e interfieren con la expresión y liberación de mediadores de la resistencia a insulina en el tejido adiposo, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), resistina y adiponectina, incrementando la sensibilidad a insulina en músculo e hígado [Rodríguez-Rivera y col., 2017; Nanjan y col., 2018].

Por otro lado aumentan la captación de glucosa en el organismo, tanto muscular, como en el tejido adiposo mediante el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) en músculo esquelético, disminuyen la tasa de gluconeogénesis, así como también reducen las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres y la síntesis de triglicéridos; por lo tanto, el aumento de la expresión de PPAR γ en el tejido adiposo reduce la resistencia a la insulina al aumentar la expresión de GLUT4 [González-Sánchez & Ortiz-Andrade, 2012; Hidalgo-Figueroa y col., 2017]. Al usarse como monoterapia, las TZD disminuyen los niveles plasmáticos de hemoglobina glucosilada 1Ac (Hb1Ac) en niveles similares a las sulfonilureas, metformina o el tratamiento con insulina, sin causar hipoglucemia [Rodríguez-Rivera y col., 2017].

Los efectos adversos reportados de estos fármacos han limitado su utilidad. Se ha observado un riesgo de falla cardíaca congestiva debido al incremento en el volumen intravascular, inducen obesidad, hepatotoxicidad, osteoporosis, pérdida de visión, infección del tracto respiratorio, cefalea, sinusitis, mialgias, alteraciones dentales, faringitis, anemia y edema bi-maleolar, elevación del colesterol, LDL, dorsalgia, fatiga, dolor muscular y de piernas [Rizza y Vella, 2010; Tran y col., 2015; Rodríguez-Rivera y col., 2017; Kumar y col., 2017; Qaseem y col., 2017; IMSS, 2018; Nanjan y col., 2018].

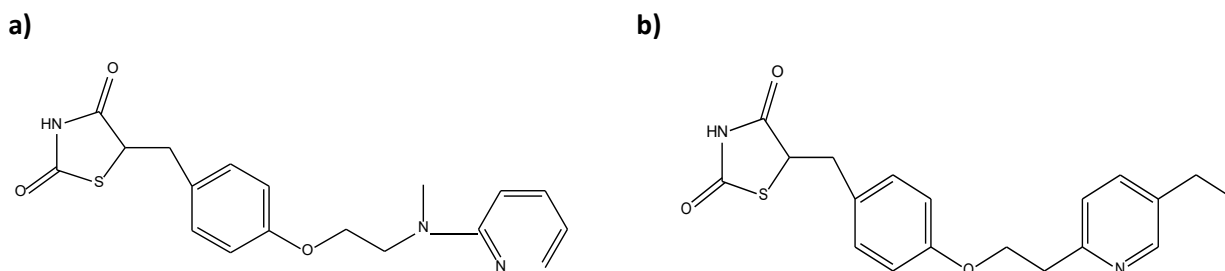


Figura 3. Estructura química de a) rosiglitazona y b) pioglitazona.

IV. Glinidas o meglitinidas. Estimulan la secreción de la insulina durante la primera fase de su liberación por un mecanismo similar al de las sulfonilureas, al unirse y bloquear a los KATP, despolarizando la membrana y favoreciendo la liberación de insulina vía la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Las glinidas no inducen una liberación prolongada de insulina; es decir, su tiempo de acción es menor al de las sulfonilureas [Tran y col., 2015; Rodríguez-Rivera y col., 2017]. Sus propiedades farmacocinéticas le confieren una rápida aparición del efecto y una corta duración de acción, es por ello que sólo estimula la secreción de insulina en el período postprandial, sin originar una sostenida liberación de insulina entre las comidas [González-Sánchez & Ortiz-Andrade, 2012]. Se postula que la rápida acción de las glinidas favorece un menor estrés en las células β -pancreáticas, lo que elimina la necesidad de una secreción casi constante de insulina y disminuye también el riesgo de hipoglucemia. Las más utilizadas son repaglinida y nateglinida (**Figura 4a, 4b**) [Rodríguez-Rivera y col., 2017].

Los efectos adversos reportados incluyen hipoglucemia, infecciones respiratorias, cefalea y dolor abdominal, hepatotoxicidad, ictericia colestásica, dermatitis grave, anemia hemolítica, trombocitopenia y agranulocitosis [Tran y col., 2015; Qaseem y col., 2017].

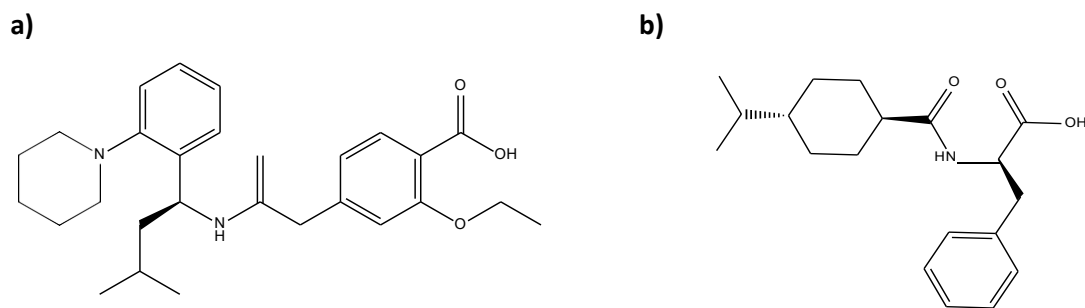


Figura 4. Estructura química de: **a)** repaglinida y **b)** nateglinida.

V. Inhibidores de α -glucosidasas. Dentro de estos fármacos se incluyen acarbosa (**Figura 5**), miglitol y voglibosa, que bloquean la degradación enzimática de carbohidratos complejos en el intestino delgado. Su mecanismo de acción se centra en impedir, mediante inhibición competitiva en los vellos intestinales de los enterocitos del borde dentado, que las α -glucosidasas y α -glucosidasa-hidrolasas (glucoamilasas) degraden disacáridos y oligosacáridos a monosacáridos antes de su absorción, retrasando la absorción de glucosa; es decir, se provoca una reducción en la producción de insulina mediante la atenuación del incremento de glucosa postprandial. Los inhibidores de α -glucosidasa disminuyen la secreción de polipéptidos inhibitorios gástricos y aumentan la secreción del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) [Masharani y German, 2012; Standl & Schnell, 2012; Tran y col., 2015].

Aunque tienen la ventaja de su relativa seguridad, sus efectos adversos incluyen poca tolerabilidad a nivel gastrointestinal, cefalea, alergias cutáneas transitorias, sabor metálico, acidosis láctica, falla renal, problemas cardiovasculares, dolor abdominal, flatulencias y diarrea [Rizza y Vella, 2010; Tran y col., 2015; IMSS, 2018].

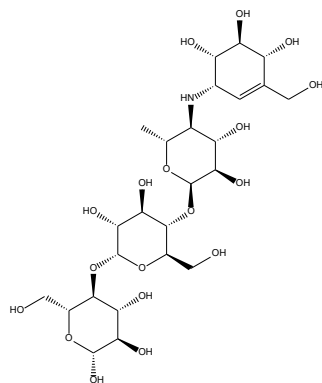


Figura 5. Estructura química de acarbosa.

VI. Agonistas de GLP-1 y antagonistas de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). El GLP-1 es una hormona incretina secretada por las células enteroendocrinas de las células L del íleon distal y colon y liberada en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen intestinal, su acción principal consiste en estimular la secreción de insulina de las células β pancreáticas y la disminución de la glucogenólisis hepática, el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP por sus siglas en inglés) que es elaborado por las células K del duodeno y el yeyuno [Tran y col., 2015; Aylwin, 2016; Kumar y col., 2017]. Exenatida (**Figura 6a**) y liraglutida, son péptidos que mimetizan la acción de incretina uniéndose al receptor para GLP-1 para mejorar el control glucémico, con la ventaja de tener una vida media mucho mayor a la de GLP-1 debido a una modificación química en su estructura: la ausencia de alanina en posición 2, que es el sitio catalítico reconocido por DPP-4, lo que impide que este los degrade, aumentando la secreción de insulina y, por tanto, la disminución de glucagón dependiente de los niveles plasmáticos de glucosa, mejorando el control glucémico. Entre estos fármacos se tiene a la sitagliptina (**Figura 6b**) [Tran y col., 2015; Rodríguez-Rivera y col., 2017].

Los efectos adversos de los análogos de GLP-1 incluyen reacciones de hipersensibilidad, como hinchazón o erupciones severas en la piel; cuando se trata de los IDDP-4 pueden provocar dolor de cabeza, de garganta y en articulaciones. En ambos casos son comunes los malestares gastrointestinales, en los que se incluyen náuseas o diarrea y, en menor grado, se ha reportado que incrementan el riesgo de pancreatitis [Kumar y col., 2017; Qaseem y col., 2017].

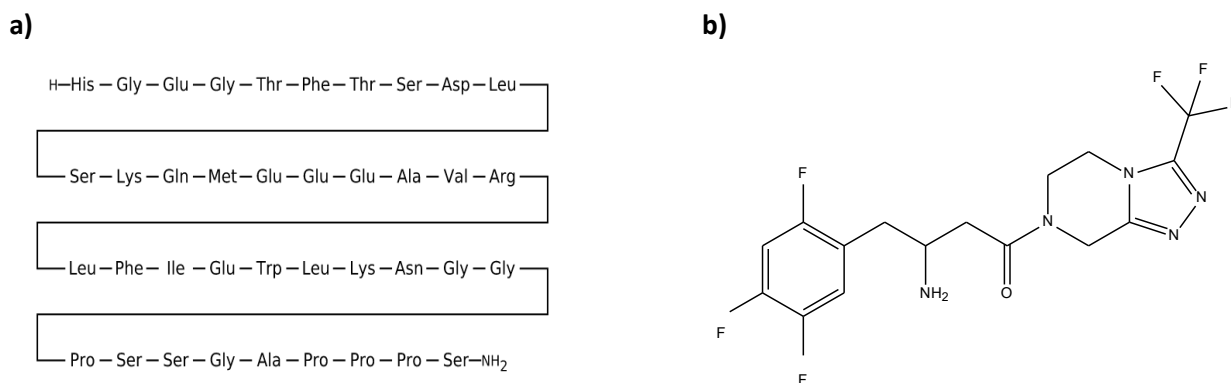


Figura 6. Estructura química de: **a)** exenatida y **b)** sitagliptina.

VII. Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (ISGLT2). La reabsorción de glucosa por parte del riñón es mediada por transportadores de glucosa (SGLT). SGLT1 es un cotransportador de baja capacidad y de alta afinidad a glucosa que se expresa a nivel intestinal, en donde es el principal transportador de glucosa/galactosa y se encarga de reabsorber el 10% de la glucosa filtrada por el riñón; SGLT2 es un transportador de alta capacidad y de baja afinidad a glucosa con expresión casi exclusiva en la superficie luminal del segmento S1 del túbulo contorneado proximal, en donde reabsorbe el 90% de la glucosa filtrada por el riñón [Pérez y col., 2010; Aylwin, 2016].

Los ISGLT2 inhiben de forma competitiva, reversible y selectiva al transportador SGLT2, lo que reduce los niveles glucosa plasmática al disminuir la reabsorción tubular de glucosa, lo que se traduce en un aumento en la excreción urinaria de glucosa en forma independiente de la insulina; además, tienen otros efectos benéficos como pérdida de peso, reducción de la presión arterial y aumento de HDL. Entre estos fármacos se encuentra la dapaglifozina y la canagliflozina (**Figura 7**) [Pérez y col., 2010; Tran y col., 2015; Aylwin, 2016].

Por otro lado, los ISGLT2 pueden presentar dolor en las articulaciones, constipación, nasofaringitis, nicturia, infecciones en el tracto urinario, incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares, desequilibrio hidroelectrolítico y nefrotoxicidad debido a la acumulación de productos finales de la glucosilación avanzada [Pérez y col., 2010; Tran y col., 2015; Qaseem y col., 2017].

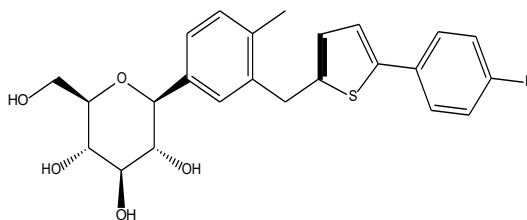


Figura 7. Estructura química de canaglifozina.

1.7. Medicina tradicional en el control de DMT2

En México el uso de la medicina tradicional para el tratamiento y control de enfermedades es una práctica común. Se han registrado de 3000 a 7000 especies de plantas utilizadas como tratamientos naturales para diferentes enfermedades [Casas y col., 2001; Hernández y col., 2005; Gómez, 2012]. En el caso de la DMT2 se han descrito la utilización de aproximadamente 383 especies [Mata y col., 2013], siendo estos recursos una gran fuente de productos útiles y variados, ampliamente distribuidos y con mucha accesibilidad por parte de la población. En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de estas especies y se ha demostrado que la mayoría de las plantas que se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes poseen componentes químicos biológicamente activos, como: alcaloides, glucósidos, cumarinas, flavonoides, terpenoides, entre otros, que pueden ser empleados como nuevos agentes hipoglucemiantes [Gordillo y col., 2012].

Aproximadamente el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades medicinales [Gutiérrez y col., 2013]. La mayoría de los estudios realizados con estas plantas ha sido a nivel experimental, estudiando efectos agudos (90%), pero solo al 10% de ellas se le han hecho estudios clínicos y toxicológicos y en menos del 10% de las plantas estudiadas se han realizado estudios crónicos o dirigidos a la determinación biológica a mediano plazo [Gordillo y col., 2012]. Aun así, el estudio de las especies utilizadas en la medicina tradicional ha ido en aumento y se ha avalado el efecto de algunas especies, como es el caso del nopal (*Opuntia joconostle*), wereque (*Ibervillea sonora*); guarumbo o chancarro (*Cecropia obtusifolia*), cuajilote (*Parmentiera aculeata*), tronadora (*Tecoma stans*), chirimoya (*Annona cherimola*) y algunas especies de la familia Lamiaceae [Argueta y col, 1994; Alarcón-Aguilar y col., 2005; Hernández-Galicia y col., 2007; Andrade-Cetto y col., 2008; Calzada y col., 2017]. La familia "Lamiaceae", con 236 géneros y 7,173 especies conocidas, se encuentra en el sexto lugar por su riqueza a nivel mundial [Bedolla-García y col., 2011; Martínez-Gordillo y col., 2017]. Esta familia posee una gran importancia económica en varias partes

del mundo por lo que se han cultivado para su uso en la medicina tradicional [Kumar y col., 2010], como condimentos (*Origanum, Thymus, Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula, Pogostemon, Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus, Salvia, Scutellaria*) [Cornejo-Tenorio y Ibarra-Manrique, 2011].

Salvia es el género más diverso de la familia Lamiaceae, con una amplia distribución alrededor del mundo [Argumedo y col., 2003; Cornejo-Tenorio y Ibarra-Manrique, 2011; Martínez-Gordillo y col., 2013;], México es considerado como una de las áreas con mayor diversidad del género, con aproximadamente 300 especies, de las cuales un gran porcentaje (85-88%) son endémicas (Cornejo-Tenorio y Ibarra-Manrique, 2011). Son generalmente hierbas, perennes o anuales, pero también existen plantas arbustivas y menos frecuentemente arbustos trepadores [Cornejo-Tenorio y Ibarra-Manrique, 2011]. Este género se reconoce por poseer el cáliz bilabiado y dos estambres fértiles, en donde el mecanismo de polinización conectivo y las anteras estériles forman parte de una estructura especializada [Cornejo-Tenorio y Ibarra-Manrique, 2011; Martínez-Gordillo y col., 2011].

El nombre *salvia*, deriva del latín “*Salvare*” que significa salvar [Jash y col., 2016]; diferentes especies de *Salvia* se han utilizado desde tiempos antiguos para el tratamiento de más de 60 enfermedades, que van desde dolores leves hasta epilepsia y principalmente para tratar diabetes, resfriados, bronquitis, tuberculosis, hemorragias y trastornos menstruales, por lo que son un gran recurso dentro de la medicina tradicional [Kumar y col., 2010; Jash y col., 2016]. Los principales metabolitos secundarios constituyentes de las especies de *Salvia* son de naturaleza terpenoide y flavonoide [Kumar y col., 2010].

1.8. Salvias con efecto antidiabético

Debido a la gran variedad del género *salvia* en la medicina tradicional, algunos grupos de trabajo han validado sus propiedades antidiabéticas en diferentes modelos experimentales. Una de las especies más estudiadas es *S. officinalis*; en donde en estudios fitoquímicos se han identificado monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, terpenos, glucósidos y polisacáridos [Wang y col., 1999; Miura y col., 2001]. Además, se ha demostrado que el extracto etanol/agua de la planta completa a dosis de 500 mg/kg reduce la hiperglucemia de ratones diabéticos 4 h después de su administración [Alarcón y col., 2002]. En pacientes diabéticos, la administración de tabletas de 150 mg tres veces al día durante tres meses, a partir de la segunda semana, disminuyeron significativamente las concentraciones de glucosa sanguínea posprandial y una disminución en colesterol a partir de la segunda semana de tratamiento [Behradmanesh y col., 2013].

El extracto alcohólico de las partes aéreas de *S. hydrangea* (100 y 200 mg/kg) se administró en ratas diabéticas durante 21 días y se observó una disminución significativa en las concentraciones de glucosa

sanguínea; además, la dosis de 200 mg/kg incrementó los niveles de insulina y HDL, lo cual indicó que el extracto podría ayudar a mejorar el estado de hiperlipidemia [Zarei y col., 2015]. En estudios fitoquímicos de las raíces se identificaron terpenos de tipo abietano, y del extracto de las flores se reportó la presencia de ácido oleanólico [Sairafianpour y col., 2003].

Por otro lado, la administración del extracto acuoso de las hojas de *S. libanotica* (150 y 450 mg/kg) en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas durante seis semanas, disminuyó la concentración de glucosa en suero, así como un aumento en insulina y HDL. Además, disminuyó LDL, colesterol y la grasa abdominal [Bassil y col., 2015]. En estudios fitoquímicos se han aislado cetonas, terpenos y alcoholes [Farhat y col., 2001].

El extracto acuoso de las partes aéreas de *S. circinata* (Syn. *S. amarissima* Ort.), una especie que crece en el valle de México, mostró efecto antihiper glucémico en pruebas de tolerancia oral a sacarosa, sugiriendo la presencia de inhibidores de enzimas α -glucosidasas, efecto atribuido a los compuestos pedalitina y apigenina-7-O- β -D glucosido [Flores-Bocanegra y col., 2007]. Además, se ha determinado que el extracto de éter de petróleo de las partes aéreas frescas de *S. circinata* disminuyó las concentraciones de glucosa en pruebas agudas y, en estudios subcrónicos, se vieron disminuidas las concentraciones de triglicéridos y HDL [Solares-Pascasio y col., 2021].

En estudios fitoquímicos preliminares se han aislado de esta especie diferentes compuestos como: 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6-dihydroxy-7-methoxy-4H-chromen-4-one y a los diterpenos glucosilados de tipo neoclerodano: amarisolido, teotihuacanina, amarisininas A-C [Maldonado y col., 1996; Flores-Bocanegra y col., 2007; Bautista y col., 2015; Bautista y col., 2016].

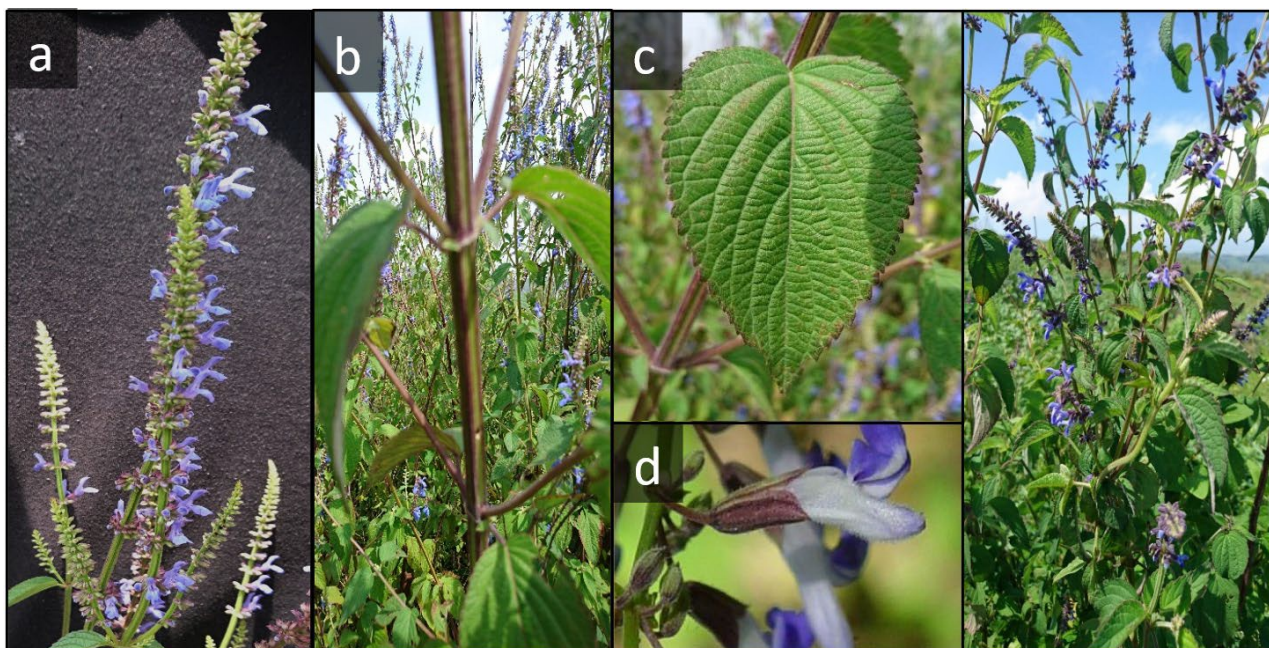
1.9. *Salvia polystachya* Ort. (Lamiaceae)

Sinonimia: *S. Polystachya* Cav. = *S. compacta* Kuntze = *S. cataria* Briq y *S. reducta* Epling [Zolla & Argueta., 2009]. Es una especie endémica de México que crece en algunas zonas del Valle de México y se distribuye en otros estados, como: Chiapas, Colima, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Michoacán, Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca y Veracruz [Dieringer y col., 1994; Aguilar y col., 1991; Villaseñor-Gómez y Gómez., 2005; Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez., 2011].

Dependiendo el lugar en que se encuentre, se le conoce de forma común como: vara cuadrada, alchichía, poleo azul, mirto, hierba chica, chía de campo, romerillo, ulcema, xilpapah, lucemilla, azulema y santomexochitl [Navarro & Avedaño., 2002; González & Garciglia, 2013; García y col., 2016; Fernández-Nava y Ramos-Rivera, 2017].

S. polystachya (**Figura 8**) es una planta herbácea perenne y arbustiva que llega a medir de 50 cm a 3.5 m de alto. Los tallos (**Figura 8b**), son tomentosos, a veces pubescentes con pelos aplicados y retrorsos. Las hojas (**Figura 8c**) tienen forma ovada o elíptica agudas acuminadas en el ápice y son más largas que anchas midiendo de 3 a 14 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho. Las flores (**Figura 8d**) son de color azul- violáceo o blancas, tubulares y bilabiadas, el labio el superior es más corto con pelitos y el inferior más largo, éstas miden de 1 a 1.2 cm (tubo de 6 a 7 mm); dispuestas en densos racimos terminales (**Figura 8a**). La época de floración es de junio – noviembre. Crece en altitudes que van de 2250-2900 msnm. Y se encuentra en bosque de encino, bosque de pino, pastizales, matorrales secundarios y áreas perturbadas [Ramamoorthy, 2001; Zolla y Argueta, 2009].

Figura 8. Partes de *S.polystachya*



a) racimo terminal; **b)** tallo; **c)** hoja y **d)** flor de *S.polystachya*.

En la medicina tradicional se utiliza para el tratamiento de malestares respiratorios, como purgante, antigástrico, antipirético, antipalúdico, antihemorrágico, emoliente para tratar la disentería y para la retención de orina [Ortega y col., 2006; Calzada y col., 2010; Bautista y col., 2017]. La decocción de la planta es usada para tratar la bilis, los cólicos y para el parto difícil. La planta completa seca se usa para curar heridas y en decocción para desinfectarlas. Las hojas se usan para la hemorragia nasal y la maceración en agua se ocupa para aliviar el dolor de cabeza, las ramas se ocupan para la gastritis, los parásitos y ayuda a crecer el cabello. Por otra parte, se recomienda su uso en enfermedades de filiación cultural como “sacar al diablo” o

para “inciensar” o sahumar una casa que tiene “maleficio” [Aguilar y col., 1994; Navarro y Avedaño., 2002; Zolla y Argueta., 2009].

Información fitoquímica y farmacológica: de las hojas se han aislado diterpenos de tipo neo-clerodano denominados polistachinas A-H (**Figura 9a-h**), 15-*epi*-polistachina G (**Figura 9i**), 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavona (**Figura 9j**); otros clerodanos como: salvifaricina (**Figura 9k**), linearolactona (**Figura 9l**), dehidroquerlina (**Figura 9m**), salvifilina A y C (**Figura 9n,ñ**) y 15-episalvifilina A (**Figura 9o**); de las semillas se han identificado niacina (**Figura 9p**), riboflavina (**Figura 9q**), tiamina (**Figura 9r**), retinol (**Figura 9s**) y los polisacáridos xilosa (**Figura 9t**) y arabinosa (**Figura 9u**) [Bushway y col., 1981; Ortega y col., 2006; Calzada y col., 2010; Bautista y col., 2017].

En el campo biológico se ha demostrado que las hojas tienen actividad antiprotozoaria sobre *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, en donde se ha identificado al diterpeno linearolactona como responsable de esta actividad [Calzada y col., 2010].

Se ha demostrado que algunos compuestos aislados de las hojas (Polistachina G, 15-*epi*-polistaquina G, salvifilina A, 15-*epi*-salvifilina A, polistachina B y linearolactona) producen un aumento en la expresión de genes codificantes para proteínas en la matriz extracelular de fibroblastos dérmicos humanos de elastina y colágeno tipo I, III y V [Bautista y col., 2017].

Figura 9. Estructuras químicas de los compuestos identificados en *S. polystachya*.

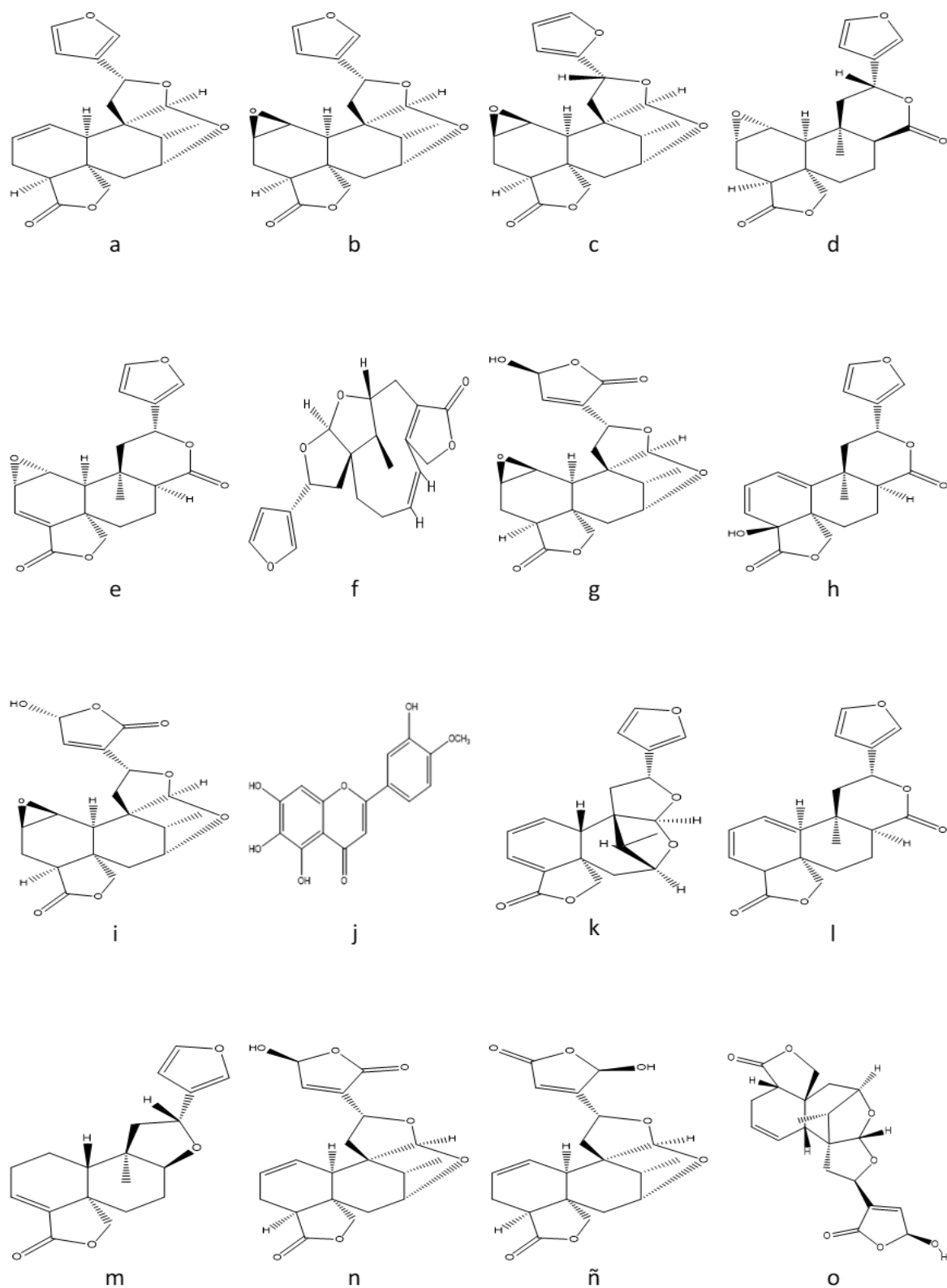
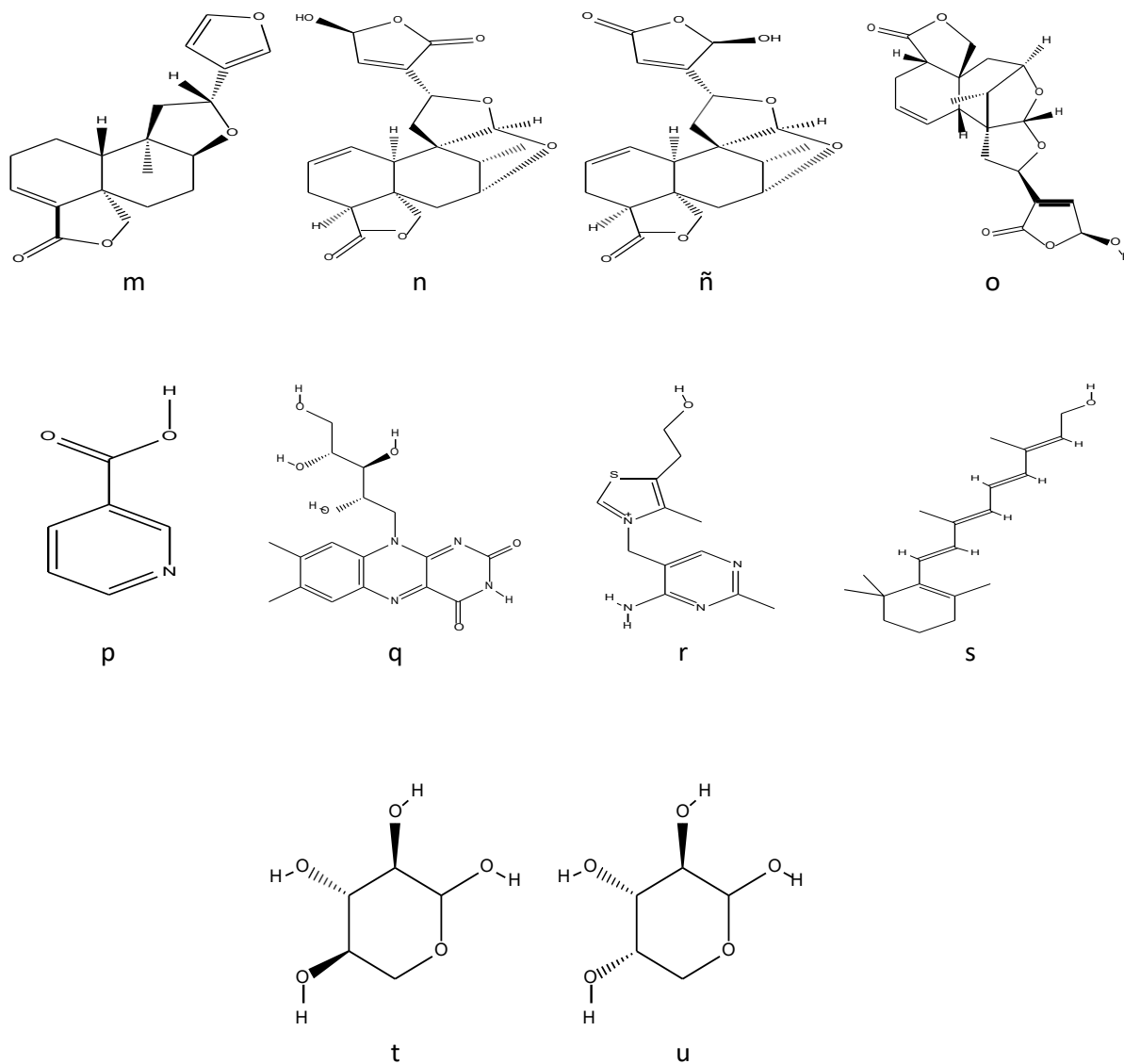


Figura 9. Continuación



a-h: Polistaquina A-H; **i:** 15-*epi*-polistachina G; **j:** 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavona; **k:** salvifaricina; **l:** linearolactona; **m:** dehidroquerlina; **n:** salvifilina A; **ñ:** salvifilina C; **o:** 15-*epi*-salvifilina A; **p:** niacina; **q:** riboflavina; **r:** tiamina; **s:** retinol; **t:** xilosa y **u:** arabinosa.

2. JUSTIFICACIÓN

En la medicina tradicional mexicana no se ha descrito el uso de *S. polystachya* para en el control de la diabetes mellitus; tomando en cuenta el criterio de selección químico taxonómico, que implica las relaciones filogenéticas estableciendo la presencia de diferentes compuestos como marcadores biosintéticos en familias, subfamilias y géneros para la investigación con otras especies de salvias que si han sido utilizadas en la medicina tradicional y que además cuentan con estudios que validan su efecto sobre la enfermedad, *S. polystachya* tiene potencial para la obtención de nuevos metabolitos que sean eficaces en el control de las glucemias, por lo que se considera necesario, a través de este proyecto, establecer las bases fitoquímicas y terapéuticas para su uso en el control de la DMT2.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿*S. polystachya* disminuirá la glucemia de ratones con DME y será posible aislar e identificar compuestos que sean responsables de este efecto?

4. HIPÓTESIS

De acuerdo con las relaciones quimiotaxonómicas de *S. polystachya* con otras especies de la familia Lamiaceae, esta especie vegetal se podrán aislar e identificar compuestos con un efecto favorable sobre la glucemia de ratones con DME, efecto que posiblemente este regulado por la inhibición de enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio biodirigido utilizando el extracto etanólico de *S. polystachya* en modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in silico* e identificar compuestos con potencial antidiabético mediado por la inhibición de enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Por medio de un estudio biodirigido, establecer la toxicidad aguda de las partes aéreas de *S. polystachya* (flor, hojas y tallos), seleccionar al extracto con menor toxicidad y determinar su efecto agudo sobre las glucemias de ratones sanos y con DME.
2. Realizar un fraccionamiento del extracto elegido e identificar a la fracción con mejor efecto agudo sobre la glucemia de ratones con DME.
3. Evaluar en un estudio subcrónico el efecto del extracto y la fracción seleccionadas sobre las glucemias, triglicéridos y HDL en ratones con DME.
4. Aislar e identificar de la fracción más activa al menos un producto con potencial antidiabético.
5. Evaluar el potencial inhibitorio de los compuestos identificados sobre enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1 utilizando estudios *in vivo* y *ex vivo*.
6. Identificar las interacciones de los compuestos identificados sobre α -glucosidasas y el cotransportador SGLT1 mediante pruebas *in silico* (docking molecular).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. FITOQUÍMICA

7.1.1. Preparación del material vegetal

Especímenes de *S. polystachya* Ort., se recolectaron en el mes de octubre del año 2016 en la localidad de San Gregorio Atlapulco, Xochimilco (19°14'9.9198" N 99°2'53.879" W). Un espécimen de referencia se depositó para su identificación en el Herbario de Plantas Medicinales del IMSS (Herbario IMSS-M), el cual fue identificada por el biólogo Santiago Xolalpa Molina y al cual se le asignó el número de voucher 16386. El material vegetal fue cuidadosamente limpiado y separado en hojas, flores y tallo; posteriormente fue secado a la sombra y a temperatura ambiente. En el año 2018, se realizó una colecta adicional de tallo en las mismas coordenadas y en la misma época del año.

7.1.2. Preparación de los extractos

Cada parte fue molida por separado con ayuda de un molino Tor-Rey; las muestras obtenidas fueron pesadas y maceradas en etanol durante una semana. Los extractos resultantes se filtraron y se concentraron utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida, llevando el etanol a sequedad. Este procedimiento se realizó durante dos ocasiones para cada uno de los extractos. Cada extracto fue denominado con las claves: SpEET (tallo), SpEEH (hoja) y SpEEF (flor).

7.1.3. Fraccionamiento del extracto de tallo

El fraccionamiento de SpEET se llevó a cabo mediante un método de reparto, en donde se pesaron 50 g de SpEET y se resuspendieron en 170 ml de etanol al 10%; se colocó en un embudo de separación de 2000 mL, y se agregaron 170 ml de acetato de etilo (AcOEt). El embudo se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta observar la separación de fases, recuperando a la fracción orgánica. Este proceso se llevó a cabo durante dos ocasiones. Se obtuvieron 2 fracciones: fracción de acetato de etilo (FrAcOEt) y fracción acuosa residual (FrAcR); estas fracciones se concentraron utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida hasta sequedad.

7.1.4. Obtención de fracciones secundarias mediante columna abierta

47 mg de FrAcOEt fueron sometidos a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta (2 cm x 34.5 cm) empaquetada con gel de sílice 60 y eluida con solventes de polaridad creciente: hexano/acetato de etilo (100:0 → 0:100), acetato de etilo/metanol (50:50). Se colectaron eluatos de 10 ml,

los cuales fueron agrupados por similitud cromatográfica, obteniendo así diez fracciones secundarias asignadas con las claves FrSe1-FrSe10.

7.1.5. Análisis cromatográfico de las fracciones secundarias

El análisis de las fracciones secundarias se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de silica gel 60 F245 soportadas en aluminio (Merk, NJ, EE.UU.) y empleando distintos sistemas de elución. Se utilizó una lámpara de UV (254 y 365 nm) para la visualización de las placas y como agente revelador se utilizó una solución ácido sulfúrico al 10% y tricloruro de aluminio. Para desarrollar el color, las placas se calentaron aproximadamente por un minuto. Las fracciones fueron comparadas contra 42 compuestos estándar de diferentes polaridades para realizar un cernimiento preliminar del extracto.

7.1.6. Caracterización de ácido oleanólico y ácido ursólico mediante HPLC

FrSec6 se analizó usando HPLC-detección de arreglo de diodos (DAD) (Waters Agilent, 5301 Stevens Creek Blvd Santa, Clara, CA 95051, EE.UU.). El análisis se realizó mediante un HPLC-DAD Waters 2795 sistema de cromatografía líquida acoplado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y una estación de trabajo analítica Millennium 3.1 equipada con una columna analítica C18 (Waters, Ciudad de México, México) con dimensiones de 250 mm 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm (Spherisorb S50D52, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). Para el análisis, 50 mg de FrSec6 se disolvieron en 10 mL de EtOH y se inyectaron 20 μL de la muestra. Para la elución, se utilizó un sistema que comprende una fase móvil binaria de acetonitrilo 100% (disolvente A) y ácido acético al 2% (disolvente B) en agua. Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo fueron programadas para dar el gradiente lineal de 80 (A)/20 (B) durante 15 min con un flujo de 0.8 mL/min de la fase móvil. Las detecciones se realizaron a una longitud de onda de 200 a 400 nm a temperatura ambiente y un tiempo total de elución de 25 min. La fracción FrSec6 se comparó con los tiempos de retención de la biblioteca de estándares. Los grados de pureza de los patrones de referencia de ácido oleanólico (AO) y ácido ursólico (AU) utilizados fueron del 90 y 97, respectivamente, dichas muestras fueron preparadas y analizadas por separado bajo las condiciones descritas anteriormente. En todos los casos, el agua utilizada fue de calidad HPLC y purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

7.1.7. Docking molecular

Para obtener la estructura química de los ligandos, se utilizó la base de datos PUBCHEM®. A partir de ella se obtuvieron las estructuras 2D de ácido oleanólico (CID: 10494), ácido ursólico (CID: 64945), acarbose (CID: 41774) y canagliflozina (CID: 24812758). Los ligandos fueron optimizados y minimizados energéticamente

utilizando el software Avogadro®. Para los blancos farmacológicos, se escogieron las proteínas cristalizadas de la enzima α -glucosidasa (ID de PDB: 5nn8) y del cotransportador de sodio-glucosa SGLT-1 (Uniprot ID: P13866), para su utilización se eliminaron las moléculas totales de agua, los iones y los cofactores no necesarios para preservar la proteína completa [Wang y col., 2019; Roig-Zamboni y col., 2017].

Los ligandos y las proteínas fueron preparados para llevar a cabo el ensayo de acoplamiento molecular con la ayuda del software Autodock tools 1.5.6, en el caso de los ligandos se calcularon las torciones y se agregaron las cargas de Gasteiger, en el caso de las proteínas se agregaron hidrógenos polares en aquellos átomos capaces de establecer interacciones de enlace de hidrógeno (átomos de O y N) y se agregaron cargas de Kollman. Para el ensayo de acoplamiento molecular se utilizó un “grid box” de 126 Å³ en cada coordenada espacial, con un espaciado de 0.375 Å y se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano como función de puntuación con una población aleatorizada de 100 individuos y número máximo de evaluaciones energéticas de 1 x 10⁷ ciclos. Los archivos obtenidos fueron analizados con los sistemas Autogrid 4.0 y Autodock 4.0 [Morris y col., 2009].

7.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

7.2.1. Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa Balb-C con un peso de 17±10 g y, ratas macho Sprague-dawley con un peso de 450 - 500 g del bioterio del Centro Médico Nacional SXXI. Todos los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, en ambiente controlado de temperatura (22 ± 1°C), ciclo de luz/oscuridad de 12 h. con acceso a agua y alimento *ad libitum* (LABDIET FORMULAB DIET 5008). Todos los protocolos experimentales se realizaron en conformidad con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Salud Animal (NOM-062-ZOO-1999).

7.2.2. Toxicidad aguda

La prueba de toxicidad aguda se realizó según los lineamientos de la norma OECD 423; se utilizaron 4 grupos de ratones sanos hembra (n=3) con un ayuno de 12 h. Un grupo se utilizó como control, por lo que no recibió ningún tratamiento; a los grupos restantes se les administró alguno de los extractos obtenidos a partir de *S. polystachya*, a dosis de 300, 600 y 1200 mg/kg vía intragástrica (v. z i.); 4 h posteriores a la administración se dejó a los grupos experimentales con acceso *ad libitum* a comida y agua. La mortalidad de los animales se registró 30 min, 4 y 72 h después de la administración de los tratamientos y se mantuvieron bajo observación durante 14 días, poniendo énfasis en algún signo aparente de toxicidad como cambios en el comportamiento, peso corporal, micción, ingesta de alimentos, salivación, respiración, convulsiones,

temblores, estreñimiento, color de ojos y de piel. Al finalizar el estudio los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el bazo, estómago, intestinos, páncreas y riñones y se observó macroscópicamente el posible daño en los diferentes órganos. El peso relativo de los órganos fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula [Porwal y col., 2017]:

$$\text{Peso relativo (\%)} = \frac{\text{Peso del órgano (g)}}{\text{Peso del animal (g)}} \times 100$$

7.2.3. Preparación y administración de tratamientos

Los extractos, fármacos, fracciones y los compuestos puros se administraron en suspensión, utilizando como vehículo agua con 0.05% de *tween* 80 en un volumen de 0.5 mL para cada animal. La administración se realizó v.i. con ayuda de una cánula esofágica; cada una de las dosis administradas fue ajustada al peso de los animales.

7.2.4. Inducción de diabetes experimental (DME)

Se utilizaron ratones macho, sanos, con 16 h de ayuno, en el día 1 se les administró vía intraperitoneal (i.p.) 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ, Sigma Aldrich, EE.UU.) disuelta en un buffer de citratos (0.1 M, pH 4.5) en un volumen de 0.5 ml y 30 min después se administraron 240 mg/kg de nicotinamida (NA) a un volumen de 0.5 ml disuelta en solución salina isotónica (NaCl 0.9%, SSI), al finalizar la administración se dejó a los animales con alimento *ad libitum*. En el día 3 a los ratones en ayunas (16 h) se les administró una segunda dosis de STZ (100 mg/kg), después de la administración a estos se les colocó alimento y se dejó una solución de sacarosa al 10%. El día 5 se retiró la solución de sacarosa y se sustituyó por agua. 72 h después, se midió la glucemia de todos los animales de experimentación; aquellos con niveles en un rango de 250-350 mg/dL se consideraron hiperglucémicos y se utilizaron para etapa experimental.

7.2.5. Medición de glucemias

Las muestras sanguíneas se tomaron mediante una punción de la vena caudal. La concentración de glucosa (mg/dL) se determinó por el método de glucosa-deshidrogenasa con un glucómetro comercial (Eclipse, Infopia USA, LLC).

7.2.6. Modelo para pruebas agudas

Para las pruebas agudas se utilizaron animales normoglucémicos e hiperglucémicos. La glucosa basal (tiempo 0) fue determinada y posteriormente se administraron los tratamientos. Las tomas de las muestras sanguíneas se realizaron 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de los tratamientos.

7.2.7. Prueba subcrónica en ratones con DME

Una dosis del tratamiento evaluado fue administrada v.i. durante 42 días. Se considero como semana 0, al momento en que se inició la prueba y se determinaron los parámetros iniciales. Las concentraciones de glucosa y el peso de los ratones se tomaron semanalmente, El perfil de orina, HA1bc, TG y HDL se midieron quincenalmente; durante los 42 días los animales mantuvieron con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

7.2.8. Prueba de orina

Esta prueba se realizó en los ratones sometidos a las pruebas de toxicidad aguda (15 días) y en todos los animales sometidos a estudios subcrónicos (al inicio de la prueba y en la semana 6), los ratones se colocaron por grupo experimental en jaulas metabólicas durante 2 h sin accesos a comida, para la recolección de orina; una vez obtenida la muestra, se utilizaron tiras reactivas (SPINREACT) para la determinación de los parámetros.

7.2.9. Toma de parámetros bioquímicos

Los parámetros de triglicéridos y HDL fueron medidos a los ratones sometidos a pruebas subcrónicas, a los cuales se les tomo una muestra de sangre (15 μ L) mediante punción de la vena caudal. Las muestras se obtuvieron al inicio de la prueba y en las semanas 2, 4 y 6 de tratamiento. Los parámetros fueron determinados por el método de fotometría de reflectancia utilizando tiras reactivas (Lipid test strip MLS-1c, Veri-Q multi).

7.2.10. Toma de hemoglobina glicada

Las concentraciones de hemoglobina glicada se obtuvieron por la técnica de espectrofotometría con ayuda de un equipo CLOVER A1C (Infopia USA, LLC) utilizando 60 μ l de sangre, la cual se obtuvo por punción en la vena caudal al inicio de la prueba y en las semanas 2,4 y 6.

7.2.11. Curvas de tolerancia oral a carbohidratos

Los ratones utilizados en esta prueba fueron colocados en cajas metabólicas y se les dejó sin acceso a comida, después de 2 h se midió la concentración de glucosa basal y los ratones con glucemias en un rango de 95 - 115 mg/dL fueron incluidos en las pruebas. Los fármacos control (acarbosa o canagliflozina) y los compuestos (AO y AU) fueron administrados a dosis de 50 mg/kg, SpEET a 300 mg/kg y FrAcOet a 200 mg/kg. Después de treinta minutos de la administración de los tratamientos, los animales recibieron una carga oral de alguno de los carbohidratos (glucosa, galactosa, sacarosa o almidón) de acuerdo con la **Tabla 1**. La concentración de glucosa se determinó a los tiempos 30, 60, 90 y 120 min después de la administración del carbohidrato. Los grupos control únicamente recibieron la administración del carbohidrato evaluado.

Tabla 2. Tratamientos y dosis administradas en pruebas de tolerancia oral.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Carbohidrato evaluado	Dosis (g/kg)
Control	-		
Canagliflozina	50	Glucosa	1.5
Ácido Oleanólico	50		
Ácido Ursólico	50		
FrAcOEt	200		
SpEET	300	Galactosa	3
Control	-		
Acarbosa	50	Sacarosa Almidón	3
Ácido Oleanólico	50		
Ácido Ursólico	50		
FrAcOEt	200		
SpEET	300		

7.2.12. Prueba “*ex vivo*” de inhibición de hidrólisis intestinal a glucosa y sacarosa

Para el ensayo de inhibición de la absorción intestinal de glucosa (AIG) e hidrólisis intestinal de sacarosa (HIS) se utilizaron ratas macho con un peso entre 450-500 g; se sacrificaron y se extrajo el intestino delgado. A partir de éste se realizaron cortes del duodeno con una longitud de 3 cm y se ligaron los bordes con seda negra no reabsorbible COVIDIEN®. Para la evaluación se utilizó una concentración de 200, 400 y 800 µM para los productos puros y el fármaco control canagliflozina (INVOKANA®); todas las muestras fueron disueltas en 1.5 mL de una solución de glucosa al 5%, para cada evaluación se utilizó un volumen de 0.5 mL y estas se inyectaron con la ayuda de una jeringa de insulina en el interior de las porciones de intestino previamente elaboradas. Las porciones de intestino se colocaron en una caja Petri con 15 mL de agua destilada (medio

acuoso externo) y se incubaron a 37°C con agitación constante. En el medio externo se midió la glucosa liberada al inicio del experimento (0 h) y 1 h después por el método de glucosa-deshidrogenasa [Valdes y col., 2020].

7.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media (E.E.M.). La estimación de la diferencia estadística significativa se calculó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de un análisis *post-hoc* Dunnet, realizando las comparaciones con respecto al grupo control. Para el cálculo de las diferencias estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism (version 7.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE.UU.)). En todos los casos se considerarán como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual a 0.05 ($p < 0.05$).

8. RESULTADOS

8.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento obtenido de los extractos en las colectas del 2016 y 2018 se muestran en la **Tabla 3**; En el año 2016 se colectó un total de 1.210 kg de material vegetal seco, el extracto de flor (SpEEF) obtuvo el mayor rendimiento con un 13.6%, seguido del extracto de hojas (SpEEH) con un 9.2% y finalmente el extracto de tallo (SpEET) con un 2.4%. En el año 2018 se realizó una colecta adicional de tallo obteniendo un rendimiento del 2%.

Tabla 3. Rendimiento obtenido de los extractos de flor, hoja y tallo de *S. polystachya* de las colectas de los años 2016 y 2018.

<i>Salvia polystachya</i> Ort.					
Año	Parte	Clave	Peso	Extracto	Rendimiento
2016	Hoja	SpEEH	256.6 g	23.6 g	9.2%
	Tallo	SpEET	695.1 g	16.94 g	2.4 %
	Flor	SpEEF	259.6 g	35.39 g	13.6%
2018	Tallo	SpEET	2,500 g	50.8 g	2.0 %

8.2. Toxicidad aguda

Los extractos de la colecta del año 2016 se sometieron a pruebas de toxicidad aguda bajo los lineamientos de la OECD 423, de acuerdo a esta norma dentro de las primeras 4 h y en los 14 días de observación, ningún extracto mostró signos de toxicidad aparente en los ratones. En la **Tabla 4**, se muestran los datos de mortalidad para cada uno de los extractos, en donde, seis días después de la administración se registró la muerte de todos los ratones administrados con SpEEF y SpEEH a una dosis de 2000 mg/kg; y basándonos en los lineamientos de la OECD estos extractos se clasifican en categoría 4 ($DL_{50} = 300$ mg/kg). Por otro lado, la administración de SpEET no causó la muerte de ningún animal durante a ninguna de las dosis administradas, por lo que fue clasificado en categoría 5 ($DL_{50} = 2500 > 5000$ mg/kg).

Tabla 4. Mortalidad registrada en un lapso de 14 días después de administrar vía oral: SpEET, SpEEF y SpEEH a dosis de 50, 300 y 2000 mg/kg en ratones sanos hembra (n=3) de la cepa Balb-C. DL_{50} determinada para cada extracto de acuerdo a la OECD 423.

Tratamiento	Mortalidad *			DL_{50} (mg/kg)	Categoría OECD
	50 mg/kg	300 mg/kg	2000 mg/kg		
SpEET	0	0	0	2000 > 5000	5
SpEEF	0	0	3	300	4
SpEEH	0	0	3		

*Número de ratones muertos

8.2.1 Perfil de orina

Al finalizar los 14 días de observación en los ratones sometidos a la prueba de toxicidad, se realizó un perfil de orina de los ratones sobrevivientes (**Tabla 5**) con la finalidad de detectar alguna alteración (urobilinógeno, proteínas y bilirrubina) como indicativo de daño a riñones o hígado en estos animales. Los datos obtenidos fueron comparados con el grupo normal que no recibió ningún tratamiento. Los parámetros determinados se encontraron dentro de rangos normales establecidos para estas pruebas en todos los grupos experimentales.

Tabla 5. Perfil de orina realizado en ratones hembra sanos (BalbC) que fueron sometidos a pruebas de toxicidad aguda bajo los tratamientos de SpEET, SpEEF y SpEEH a dosis de 50, 300, y 2000 mg/kg (n=3).

Grupo	Dosis (mg/kg)	LEU	NIT	URO	PRO	PH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
Normal	-	-	+	0.2 (3.5)	30 (0.3) +	6	-	1.03	5 (0.5) ±	-	-
SpEET	50	-	-	0.2 (3.5)	30 (0.3) +	6.5	++	1.025	5 (0.5) ±	-	-
	300	-	-	0.2 (3.5)	30 (0.3) +	6	++	1.025	-	-	-
	2000	-	-	0.2 (3.5)	30 (0.3) +	5	-	1.03	-	-	-
SpEEF	50	-	-	0.2 (3.5)	30 (0.3) +	6.5	+++	1.025	5 (0.5) ±	-	-
	300	-	-	0.2 (3.5)	-	6	-	1.01	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SpEEH	50	-	-	0.2 (3.5)	15 (0.15) ±	5	-	1.02	-	-	-
	300	-	-	0.2 (3.5)	16 (0.15) ±	6.5	-	1.02	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SpEET: extracto etanólico de tallo, SpEEF: extracto etanólico de flor, SpEEH: extracto etanólico de hoja, LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: sangre, SG: densidad aparente, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.

8.2.2 Peso corporal y peso relativo de órganos

Durante los 14 días de evaluación se registró semanalmente el peso de los animales (**Tabla 6**). Ninguno de los grupos experimentales varió su peso con respecto al grupo control. Al finalizar la prueba, los animales fueron sacrificados para la obtención del hígado, estómago, intestino y riñones. Se calculó el peso relativo para cada uno y se analizaron macroscópicamente. Ningún órgano mostró alguna alteración en textura o coloración, sin embargo, en el caso de SpEEF a dosis de 50 mg/kg, se observó un aumento en el peso del intestino; en contraste, en el caso de SpEEH a la misma dosis (50 mg/kg) disminuyó el peso intestinal.

Tabla 6. Peso corporal (g) y peso relativo de órganos (g) de ratones hembra sanos sometidos a pruebas de toxicidad aguda.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Peso corporal		Hígado	Páncreas	Estomago	Intestino	Riñones
		inicial	14 días					
Normal	-	20.3 ± 0.1	22.3 ± 0.7	0.8 ± 0.0	4.9 ± 0.1	1.2 ± 0.05	1.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0
	50	20.0 ± 0.6	23.3 ± 0.3	0.7 ± 0.0	4.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.7 ± 0.0
SpEET	300	21.0 ± 1.5	23.7 ± 0.7	0.6 ± 0.1	5.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.5	0.6 ± 0.1
	2000	20.7 ± 0.3	21.7 ± 0.3	0.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.9 ± 0.5	0.8 ± 0.2
SpEEF	50	18.0 ± 0.6	21.7 ± 0.3	0.9 ± 0.0	5.3 ± 0.2	1.3 ± 0.0	2.5 ± 0.3*	0.9 ± 0.0
	300	18.3 ± 0.3	22.7 ± 1.4	0.9 ± 0.1	5.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	2000	19.0 ± 0.0	-	-	-	-	-	-
SpEEH	50	18.3 ± 0.3	21.0 ± 0.6	0.6 ± 0.0	4.9 ± 0.2	1.1 ± 0.03	1.0 ± 0.2*	0.6 ± 0.04
	300	18.0 ± 0.0	20.8 ± 0.3	0.7 ± 0.0	5.2 ± 0.1	1.1 ± 0.03	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.03
	2000	18.7 ± 0.3	-	-	-	-	-	-

Media ± E.E.M. (n=3). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo normal en los mismos tiempos. SpEET: extracto etanólico de tallo, SpEEF: extracto etanólico de flor, SpEEH: extracto etanólico de hoja.

8.3. PRUEBAS AGUDAS

8.3.1. Evaluación de SpEET en ratones sanos

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, el extracto de tallo (SpEET) fue elegido por su baja toxicidad. Se tomó en cuenta la dosis de 50 mg/kg que fue administrada en la prueba de toxicidad y se eligieron dosis crecientes (100 y 200 mg/kg) para determinar su efecto sobre las glucemias de ratones sanos. En la **Tabla 7** se muestran los cambios en las concentraciones de glucemia obtenidos al ser comparados contra el grupo control; en donde, la dosis de 200 mg/kg disminuyó significativamente la glucemia de los animales durante todas las mediciones realizadas, efecto que fue similar al observado en los grupos tratados con los fármacos control: acarbosa, un inhibidor de enzimas α -glucosidasa y glibenclamida un hipoglucemiante que se utilizó para demostrar la viabilidad de las células β pancreáticas en los ratones.

Tabla 7. Efecto agudo de SpEET sobre la glucemia de ratones macho sanos.

Grupo	Dosis (mg/kg)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normal	-	175.3 ± 1.4	174 ± 1.8	170.5 ± 2.6	172.8 ± 2	178.5 ± 1.7
GLIB	50	174.7 ± 1.2	152.3 ± 9.6*	125 ± 1.3*	124.3 ± 2.2*	118.3 ± 3.4*
ACAR	50	177.3 ± 3.1	162.8 ± 1.8*	154.3 ± 1.7*	166.5 ± 2.8	174.3 ± 1.1
SpEET	50	174.8 ± 1.5	178.3 ± 1.5	186.3 ± 2.9*	178.8 ± 2.1	172.5 ± 3.4
	100	174 ± 1.9	170.8 ± 3.8	159 ± 3.2*	171.5 ± 2.7	174.3 ± 2.5
	200	174.3 ± 0.6	149.3 ± 1*	138.3 ± 1.3*	129.3 ± 0.6*	141.5 ± 0.6*

Media ± E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo normal a los mismos tiempos. GLIB: glibenclamida; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo.

8.3.2. Evaluación de SpEET en ratones con DME

El siguiente paso consistió en evaluar el extracto en un modelo de DME. Para ello se emplearon las mismas dosis que se administraron en ratones sanos (50, 100 y 200 mg/kg). En la **Tabla 9** se muestran los datos obtenidos, en donde los fármacos glibenclamida y acarbosa disminuyeron significativamente las glucemias en todos los tiempos evaluados. Cuando SpEET fue administrado, la dosis de 100 mg/kg disminuyó significativamente las glucemias a partir de los 30 min (14.4%) de evaluación, efecto que se mantuvo hasta los 120 min (15.9%), efecto comparable al mostrado por glibenclamida. Por otro lado, las dosis de 50 y 200 mg/kg no mostraron disminuciones importantes en la glucemia de los animales.

Tabla 8. Efecto agudo de SpEET sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con DME

Grupo	Dosis (mg/kg)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
DME	-	302.5 ± 5.7	306 ± 3.7	309.4 ± 2.8	311.5 ± 1.5	294.8 ± 0.6
GLIB	50	308.7 ± 1.6	236.8 ± 2.3*	237.8 ± 3.4*	249 ± 1.5*	225 ± 2.5*
ACAR	50	307.6 ± 1.8	243.5 ± 6.2*	247.8 ± 5.4*	268 ± 1.9*	292 ± 2.3*
SpEET	50	295.5 ± 5	310.3 ± 12	290.3 ± 14	300 ± 20	291.8 ± 1
	100	301.8 ± 1	242.3 ± 0.6*	258.3 ± 1.2*	241.3 ± 0.8*	247.3 ± 0.3*
	200	303.3 ± 10	320.4 ± 7.3	307.8 ± 1.3	287 ± 9.5*	313.3 ± 3.5

Media ± E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo normal en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; GLIB: glibenclamida; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo.

8.3.3. Fraccionamiento de SpEET y evaluación en ratones con DME

Siguiendo con el estudio biodirigido, 1 g de SpEET fue fraccionado y fueron obtenidas dos fracciones (**Tabla 9**): la fracción acuosa residual (FrAcR) con un rendimiento del 57.8%, y la fracción de acetato de etilo (FrAcOEt) con un rendimiento del 39.6%.

Tabla 9. Rendimiento de la fracción acuosa residual (FrAcR) y acetato de etilo (FrAcOEt) obtenidas a partir del extracto etanólico de tallo de *S. polystachya* (SpEET).

SpEET	Fraccionamiento de SpEET		
	Clave	Peso	Rendimiento
50 g	FrAcR	28.9 g	57.8%
	FrAcOEt	19.8 g	39.6%

Una vez que se obtuvieron las fracciones, estas fueron evaluadas en el modelo de ratones con DME a dosis de 50 mg/kg. En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos, en donde es posible observar que el fármaco glibenclamida disminuyó en un 22.6% la glucemia de los animales a partir de los 30 min, efecto que se mantuvo hasta los 120 min, con una disminución del 23.7%.

Por otro lado, acarbosa disminuyó significativamente la glucemia en un 19.9% a los 60 min y en un 11.1% a los 90 min. Cuando FrAcR y FrAcOEt fueron administradas se registró una disminución significativa a partir de los 30 min (12.3% y 18.6%, respectivamente) que se mantuvo hasta los 120 min (27.7% y 36.4%, respectivamente). Cabe destacar que FrAcOEt mantuvo un efecto más marcado a partir de los 60 min, por lo que esta fracción fue seleccionada para realizar una prueba subcronica.

Tabla 10. Efecto agudo de FrAcR y FrAcOEt en ratones con DME

Grupo	Dosis (mg/kg)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
DME	-	308.8 ± 3.3	306 ± 1.9	309.4 ± 2.5	301.5 ± 1.5	294.8 ± 0.6
GLIB	50	309 ± 1.5	236.8 ± 2.3*	237.8 ± 3.4*	249 ± 1.5*	225 ± 2.5*
ACAR	50	309.3 ± 1.8	323.5 ± 2.3	247.8 ± 5.4*	268 ± 1.9*	292 ± 2.3
FrAcR	50	309 ± 2.7	268.4 ± 2.8*	231.6 ± 3.5*	218.8 ± 1*	213.3 ± 8*
FrAcOEt	50	303 ± 3.8	249 ± 5.9*	203.3 ± 1.8*	213 ± 4.5*	187.5 ± 0.6*

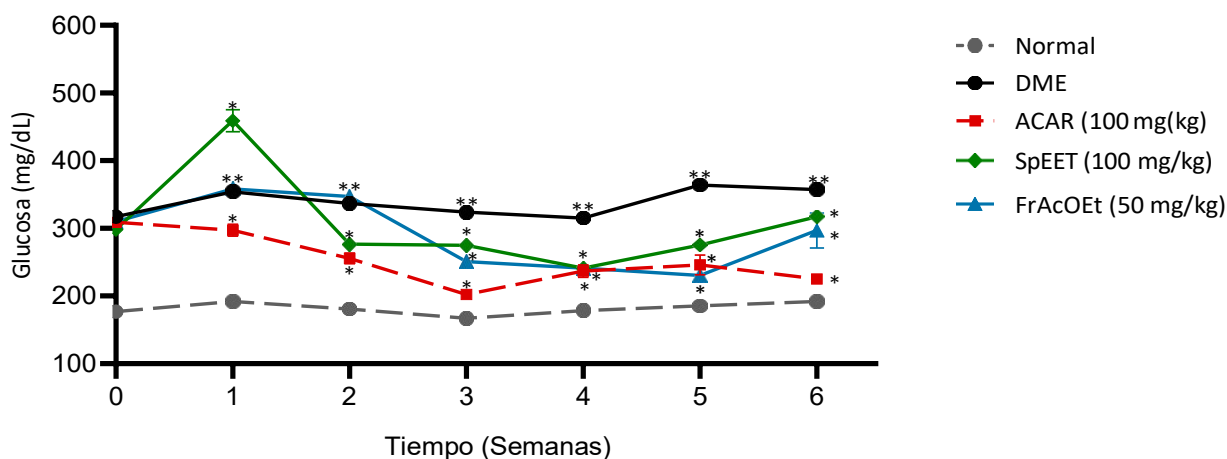
Media ± E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo DME en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; GLIB: glibenclamida; ACAR: acarbosa; FrAcR: fracción acuosa residual; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo.

8.4. Prueba subcrónica con SpEET Y FrAcOEt

8.4.1. Efecto sobre la glucemia

Para determinar si el efecto agudo observado por SpEET y la fracción FrAcOEt sobre las glucemias se mantenía a largo plazo, se realizó la administración subcrónica en ratones con DME. En la **Gráfica 1**, se puede observar el comportamiento de ambos tratamientos, en donde los niveles de glucosa en sangre de los ratones control diabéticos fueron significativamente más altos que los valores determinados en los ratones control diabético (18 a 13.2%). En el caso de FrAcOEt, de la tercera a la sexta semana presentó una reducción de la glucemia en comparación con el grupo DME (22.6 a 16.9 %). El fármaco acarbosa mostró una reducción constante de la glucemia, de 308.8 a 225 mg/dL. Desde la segunda hasta la sexta semana, SpEET mostró una disminución significativa en comparación con el grupo control.

Gráfica 1. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con DME.



Media \pm EEM (n=4). ** $p < 0.05$ vs Normal; * $p < 0.05$ vs DME; Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores de su respectivo grupo control en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo.

8.4.2. Efecto sobre triglicéridos y HDL

Durante la prueba subcrónica se realizaron quincenalmente mediciones de TG y HDL. En la **Tabla 11** se puede observar que el grupo de ratones con DME exhibieron un aumento de TG, mientras que los niveles de HDL permanecieron bajos en comparación con los ratones de control normales, mientras que la administración de SpEET, FrAcOEt y acarbosa redujeron TG, mientras que los niveles de HDL aumentaron.

Tabla 11. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre las concentraciones de triglicéridos y HDL de ratones con DME

Semana	mg/dL	Ratones con DME				
		Normal	DME	ACAR	SpEET	FrAcOEt
0	TG	136 ± 5.7	204 ± 5.3♦	169 ± 5.7	200 ± 8.4	192 ± 4.5
	HDL	58 ± 2.9	65 ± 2.9♦	67 ± 3.7	73 ± 4.9	68 ± 4.1
2	TG	99 ± 10.8	207 ± 4.5♦	184 ± 7.3*	73 ± 3.3*	79 ± 3.3*
	HDL	75 ± 2.0	67 ± 3.3♦	74 ± 5.7	55 ± 2.0	63 ± 4.5
4	TG	94 ± 2.0	211 ± 3.7♦	128 ± 1.6*	81 ± 1.6*	65 ± 4.5*
	HDL	92 ± 7.8	59 ± 1.2♦	90 ± 2.0*	72 ± 2.4*	47 ± 1.6*
6	TG	97 ± 1.6	210 ± 2.0	100 ± 4.1	153 ± 6.9*	90 ± 2.4*
	HDL	80 ± 4.5	41 ± 2.9♦	79 ± 3.3*	65 ± 3.3*	58 ± 2.4*

Media ± E.E.M (n=4). ♦p<0.05 vs Normal; *p<0.05 vs DME. Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores de su respectivo grupo control en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; GLIB: glibenclamida; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo.

8.4.3. Perfil de orina

Al final de la prueba subcrónica, se realizó una prueba general de orina (**Tabla 12**). El grupo control de diabéticos exhibió algunos valores alterados frente a los ratones normales, como glucosa (250 mg/dL), cuerpos cetónicos (5 mg/dL), gravedad específica (1,03) y proteínas (30 mg/dL). Al final de la prueba se observó aumento de glucosa (500 mg/dL) y leucocitos (500 Leu/μL). Acarbosa, EESpS y EtOAcFr no presentaron glucosa elevada en orina en la semana 6. Para los cuerpos cetónicos, un indicador conocido de diabetes, los tratamientos se mantuvieron similares al grupo control de diabetes (5 mg/dL). La gravedad específica, las proteínas y el urobilinógeno no se modificaron por los extractos. Además, en el grupo tratado con acarbosa, los valores de nitritos y leucocitos indicaron una posible infección del tracto urinario. En el caso de los tratamientos con EESpS y FrAcOEt no se observaron alteraciones.

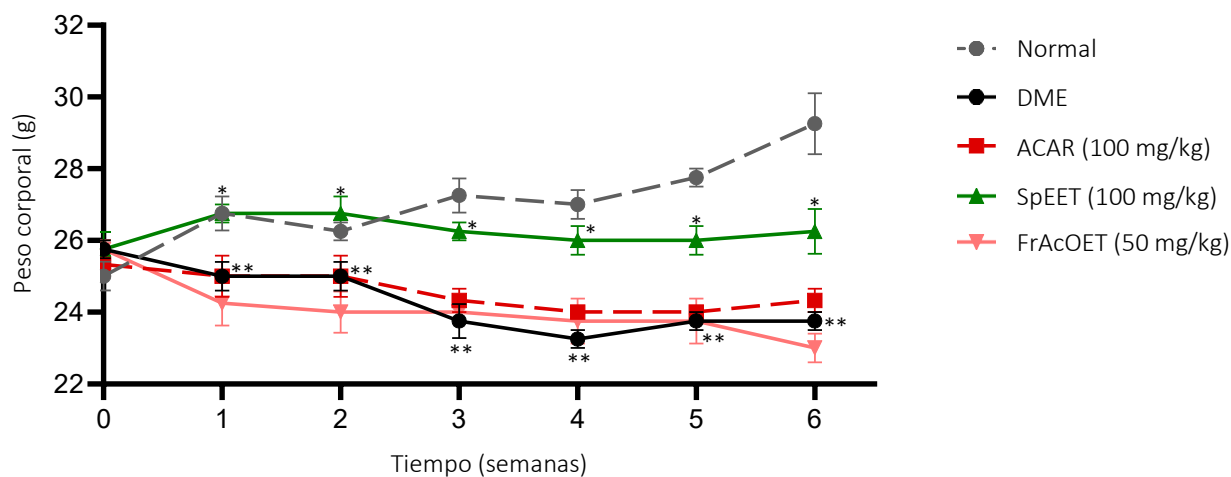
Tabla 12. Perfil de orina de ratones con DME administrados subcrónicamente con SpEET y FrAcOEt.

	Semana	Normal	Ratones Diabéticos			
			Control DME	ACAR	SpEET	FrAcOEt
Glucosa mg/dL (mmol/L)	0	-	250 (15)	500(30)++	500(30)++	500(30)++
	6	-	500(30)++	-	-	-
Bilirrubina mg/dL (μmol/L)	0	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
Cuerpos cetónicos mg/dL (mmol/L)	0	-	5(0.5)±	5(0.5)±	5(0.5)±	5(0.5)±
	6	-	5(0.5)±	5(0.5)±	5(0.5)±	5(0.5)±
Gravedad específica	0	1.015	1.03	1.03	1.03	1.03
	6	1.015	1.03	1.02	1.03	1.03
Sangre (Ery/μL)	0	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
pH	0	6	6	6	6	6
	6	6	6	6.5	6	6
Proteínas mg/dL (g/L)	0	15(0.15)	30(0.3)+	30(0.3)+	30(0.3)+	30(0.3)+
	6	15(0.15)	30(0.3)+	30(0.3)+	15(0.15)+	30(0.3)+
Urobilinógeno mg/dL(μmol/L)	0	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)
	6	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)	0.2(3.5)
Nitritos (mg/dL)	0	-	-	-	-	-
	6	-	-	+	-	-
Leucocitos (Leu/μL)	0	-	-	-	-	-
	6	-	500++	15±	-	-

8.4.4. Efecto sobre el peso corporal

El peso corporal en el grupo de ratones diabéticos control disminuyó significativamente en comparación con los ratones normales (**Gráfica 2**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control de diabéticos y los grupos tratados con acarbose y FrAcOEt. Curiosamente, SpEET aumentó el peso corporal a partir de la segunda semana, permaneciendo constante durante las 6 semanas de la prueba al ser comparado contra el grupo control con DME.

Grafica 2. Efecto de la administración subcrónica de SpEET y FrAcOEt sobre el peso corporal de ratones con DME.



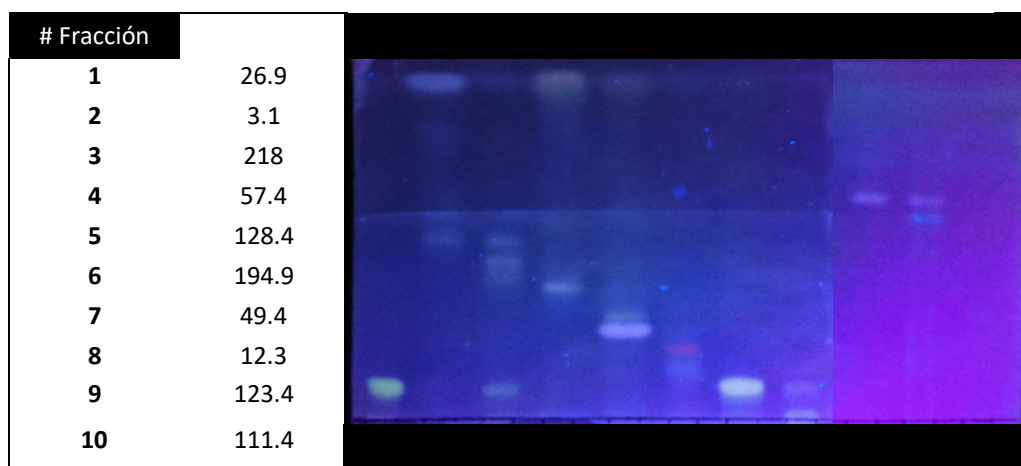
Media \pm E.E.M. (n=4). ** $p > 0.05$ vs Normal; * $p < 0.05$ vs DME; Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores de su respectivo grupo control en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo.

8.5. Fraccionamiento químico e identificación de compuestos por CCF y HPLC-DAD

Tomando el efecto de FrAcOEt en las pruebas agudas y subcrónicas y con el fin de realizar un “screening” fitoquímico preliminar con esta fracción, se realizó un fraccionamiento, obteniendo un total de diez fracciones secundarias (FrSec1–FrSec10) (**Figura 10**), de las cuales, las mayoritarias fueron FrSec3 (218 mg), FrSec6 (194.9 mg) y FrSec5 (128.4 mg).

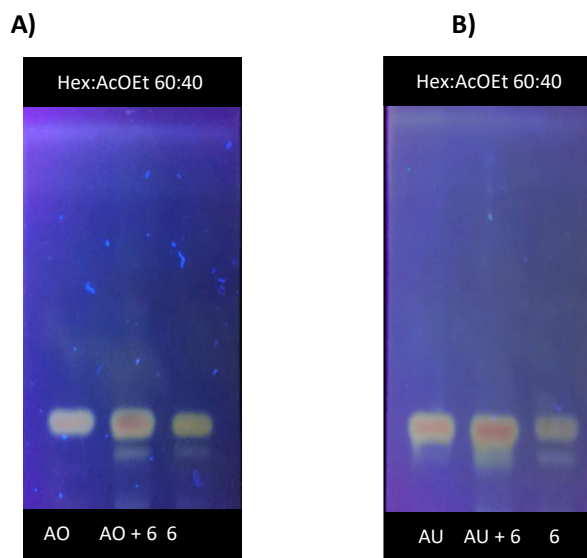
Todas las fracciones se compararon mediante técnicas de cromatografía analítica en capa fina con 42 compuestos estándar de diferentes polaridades que fueron seleccionados en función de compuestos reportados en otras especies de salvia. En FrSec6 se identificó la presencia de la mezcla de los triterpenos ácido oleanólico (AO) y ácido ursólico (AU) (**Figura 11**), presentando un R_f de 2.5 (**Tabla 13**).

Figura 10. Peso (mg) y cromatograma de las fracciones secundarias (FrSec) 1-10 obtenidas de FrAcOEt, revelada con H₂SO₄ al 10% y observada bajo luz UV de onda larga.



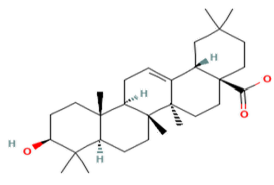
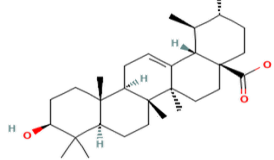
Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; FrAcOEt: fracción acetato de etilo.

Figura 11. Co-cromatograma de **A)** AO: ácido oleanólico vs FrSec6 y **B)** AU: ácido ursólico vs FrSec6, placas reveladas con H₂SO₄ al 10% y observadas bajo luz UV de onda larga.



Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico; 6: fracción secundaria 6.

Tabla 13. Compuestos identificados, sistemas de elución y Rf calculados mediante cromatografía analítica en capa fina de la fracción secundaria FrSec6 obtenida a partir de FrAcOEt.

Fracción	Compuesto identificado	Sistema de elución (vol/vol)	Rf estándar	Rf SeFr6	Estructura química
FrSec6	Ácido oleanólico	Hexano/AcOEt (60:40)	2.5	2.5	
	Ácido ursólico	Hexano/AcOEt (60:40)	2.5	2.5	

Para confirmar la presencia de ambos compuestos se realizó un análisis de FrSec6 mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) y se utilizaron los estándares de ácido oleanólico y ácido ursólico. La **Figura 12** muestra el análisis completo del cromatograma para la fracción de acetato de etilo (**a**) y FrSec2 (**b**), confirmando la presencia de AU a los 8.366 min (47.28 %) y AO a los 8.008 min (17.26 %); estas señales fueron comparadas con los cromatogramas obtenidos de los estándares de AO (**c**) y AU (**d**).

8.6. Evaluación de ácido oleanólico y ácido ursólico en ratones con DME

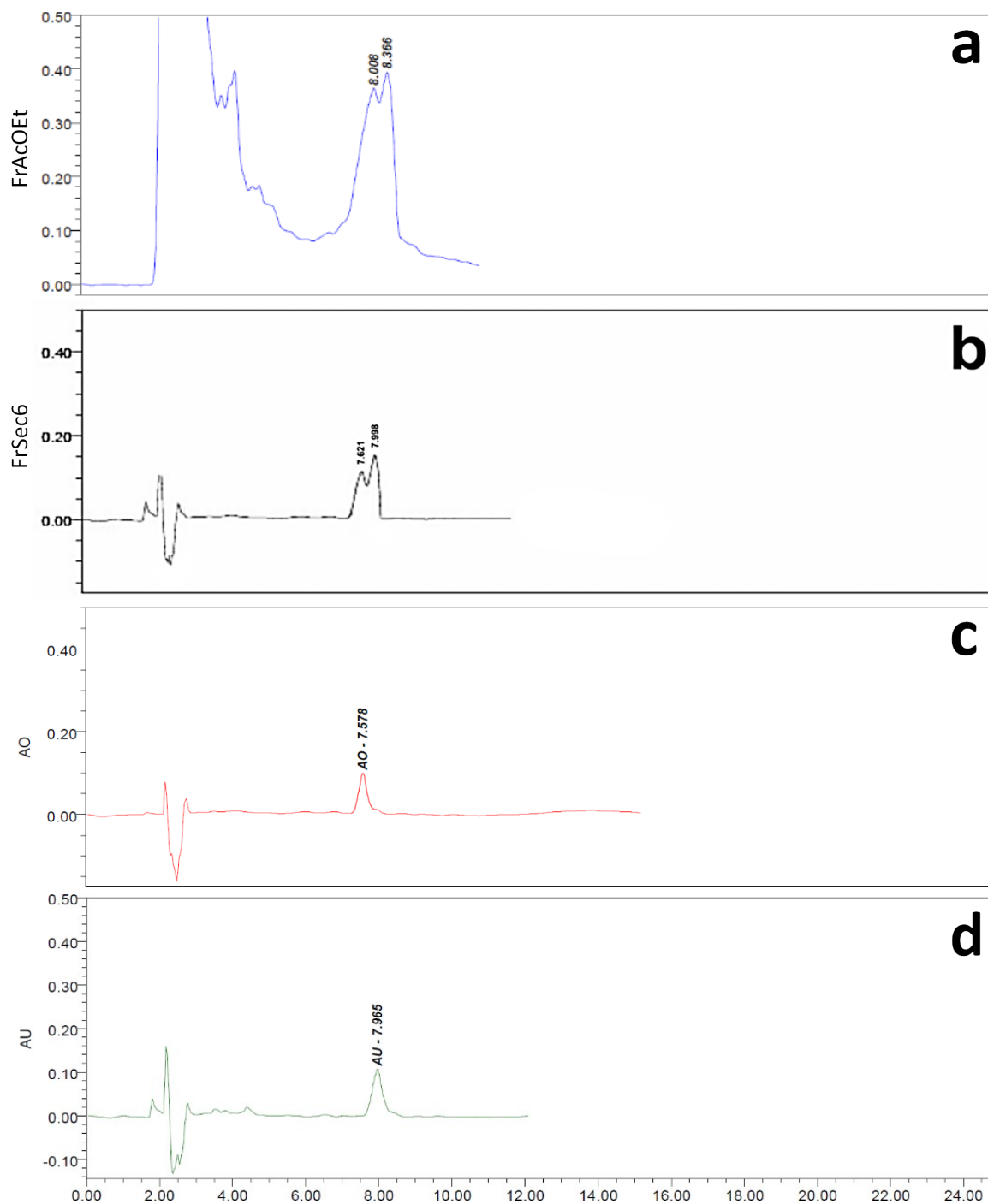
La FrSec6 y los compuestos identificados AO y AU en ella fueron administrados en ratones diabéticos (**Tabla 14**). AO disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre a los 90 y 120 min de evaluación. En el caso de AU, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron a partir de los 30 min, efecto que se mantuvo hasta los 120 min; este efecto fue similar al de glibenclamida.

Tabla 14. Efecto agudo de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre la glucosa de ratones con DME.

Grupo	Dosis (mg/kg ⁻¹)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normal	-	175.3 ± 1.4	174 ± 1.8	170.5 ± 2.6	172.8 ± 2	178.5 ± 1.7
DME	-	302.5 ± 5.7	306 ± 3.7	309.4 ± 2.8	311.5 ± 1.5	294.8 ± 0.6
GLIB	50	307.6 ± 1.8	243.5 ± 6.2*	247.8 ± 5.4*	268 ± 1.9*	292 ± 2.3*
ACAR	50	308.7 ± 1.6	236.8 ± 2.3*	237.8 ± 3.4*	249 ± 1.5*	225 ± 2.5*
FrSec6	50	293.5 ± 2.5	338.8 ± 2.2	386 ± 3.9	330.3 ± 4.2	259.3 ± 5.1*
AO	50	283.2 ± 5.2	302 ± 11.4	302 ± 7.2	239.4 ± 3.1*	252.8 ± 2.9*
AU	50	268.7 ± 4	220.8 ± 5.9*	239 ± 6.6*	259.2 ± 4*	236 ± 5.5*

Media ± E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo DME en los mismos tiempos. DME: diabetes mellitus experimental; GLIB: glibenclamida; ACAR: acarbose; FrSec6: fracción secundaria 6; AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico.

Figura 12. Cromatogramas HPLC-DAD de: a) FrAcOEt; b) FrSec6; c) ácido oleanólico y d) ácido ursólico.

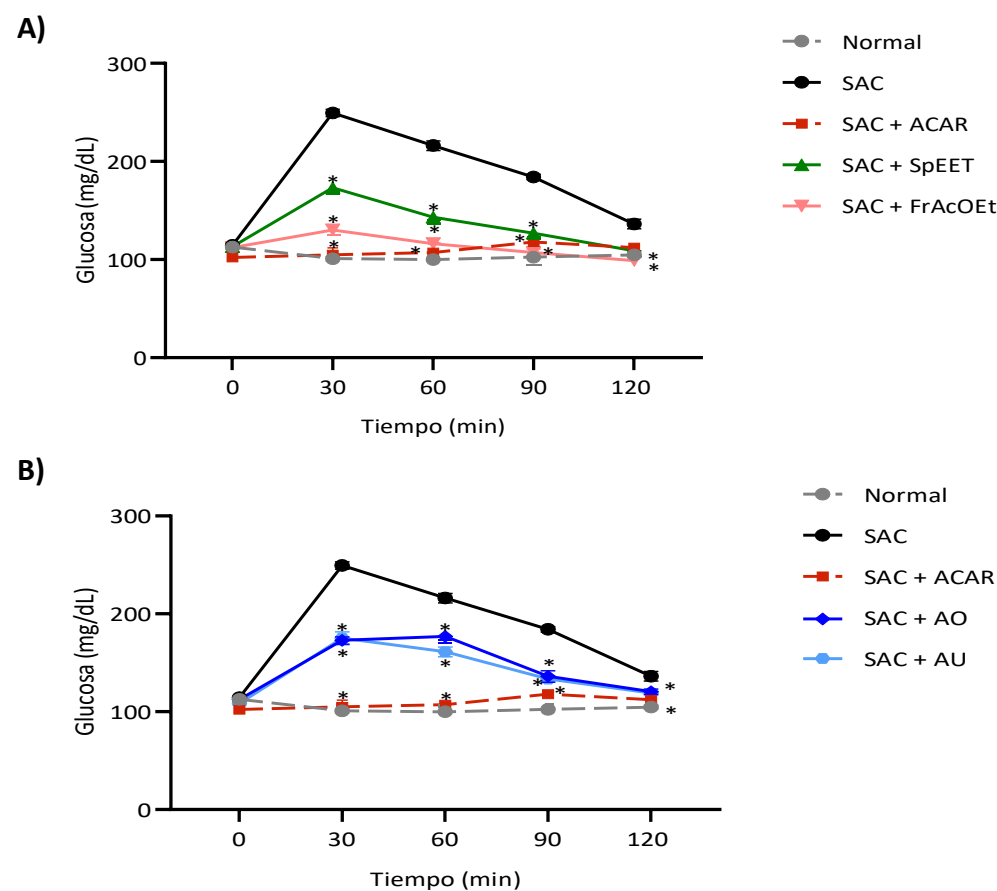


8.7. Pruebas de tolerancia oral a carbohidratos

8.7.1. Prueba de tolerancia oral a sacarosa (PTOS) y almidón (PTOA) de los productos obtenidos de SpEET

Durante el ensayo de PTOS, todos los tratamientos redujeron el pico de glucosa posprandial. Es importante mencionar que SpEET, FrAcOEt (**Gráfica 3A**), OA y UA (**Gráfica 3B**) redujeron significativamente el pico de hiperglucemia, observado 30 minutos después de la carga de sacarosa, con porcentajes de inhibición del pico de 30.6, 47.8, 29.8 y 30.7%, respectivamente. El efecto demostrado por los productos obtenidos a partir de los tallos de *S. polystachya* fue menor que el efecto observado tras la administración del fármaco control acarbosa, un inhibidor de la α -glucosidasa, que redujo significativamente el pico posprandial con una inhibición del 100% a los 30 minutos.

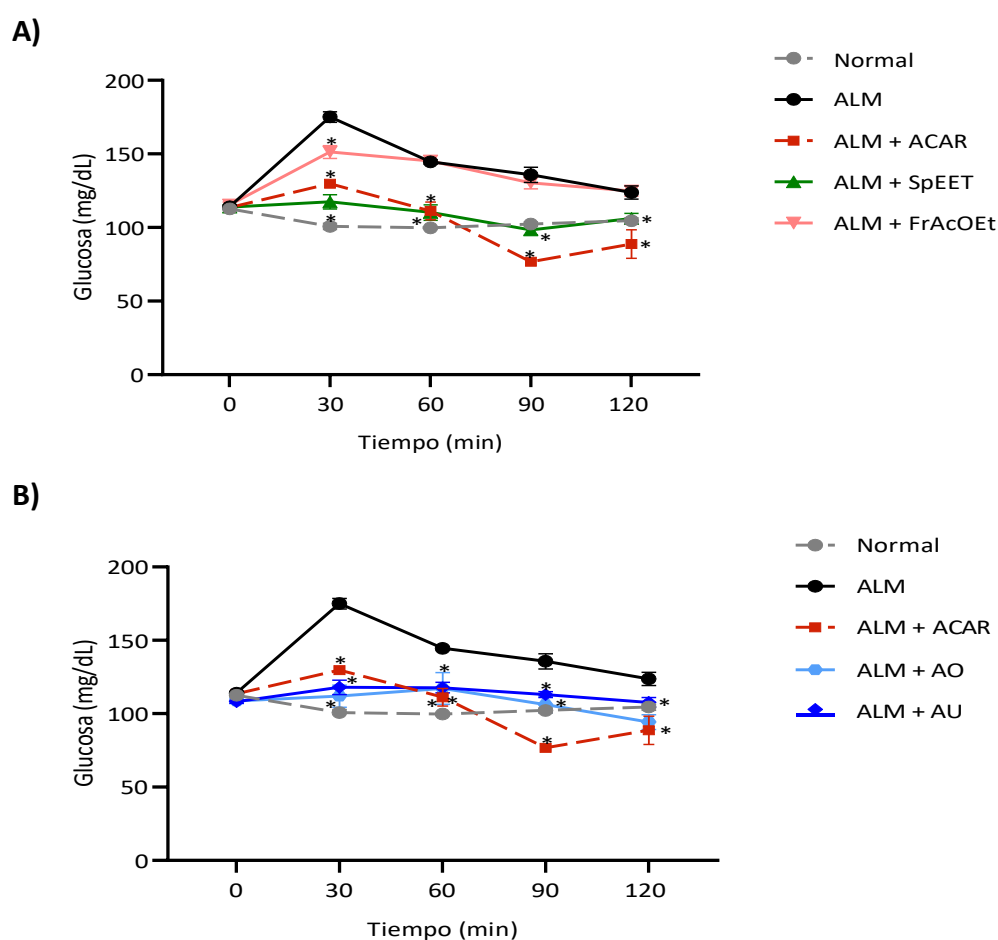
Gráfica 3. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de *S. polystachya* en la prueba de tolerancia oral a sacarosa de grupos tratados con **A)** SpEET y FrAcOEt y **B)** AO y AU.



Media \pm E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo SAC, en los mismos tiempos. SAC: sacarosa; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico y AU: ácido ursólico.

En PTOA, se observó un efecto similar en donde SpEET redujo significativamente el pico posprandial de almidón durante el ensayo con una reducción del 32.9% a los 30 min. En el caso de FrAcOEt hubo una reducción significativa a los 30 min del 13.6% (**Gráfica 4A**), en comparación con el grupo de almidón. Cuando se administraron AO y AU, se observó una reducción en el pico posprandial con todos los tratamientos, con una reducción del 32.6 y 36% respectivamente a los 30 min. El fármaco acarbosa, también redujo el pico posprandial, con una reducción del 25.9 % a los 30 min. Es importante mencionar que AO y AU mostraron un mayor efecto inhibitorio que el fármaco control a los 30 min (**Gráfica 4B**).

Gráfica 4. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de *S. polystachya* en la prueba de tolerancia oral a almidón de grupos tratados con **A)** SpEET y FrAcOEt y **B)** AO y AU.

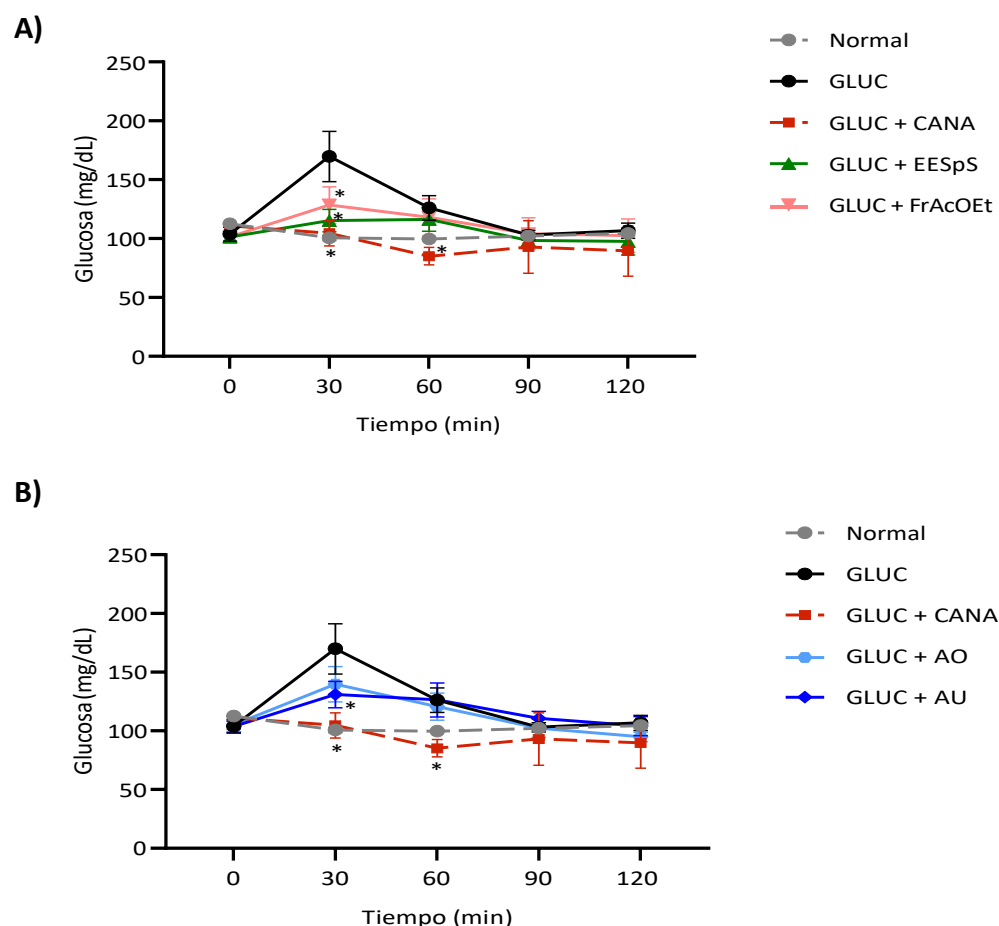


Media \pm E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo ALM en los mismos tiempos. ALM: almidón; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico y AU: ácido ursólico.

8.7.2. Prueba de tolerancia oral a glucosa (PTOG) y galactosa (PTOGaT) de los productos obtenidos de SpEET

SpEET, FrAcOEt, AO y AU se evaluaron en PTOG y PTOGaT, utilizando canagliflozina, un inhibidor de los cotransportadores SGLT1/2, como fármaco control. SpEET y FrAcOEt redujeron significativamente el pico posprandial de glucosa a los 30 minutos. Su efecto fue similar al observado en el fármaco de control canagliflozina (**Gráfica 5A**). Cuando se administró AO y AU, se observó una reducción significativa en el pico posprandial a los 30 min en comparación con el grupo de glucosa. Sin embargo, este efecto fue inferior al observado tras la administración de canagliflozina (**Gráfica 5B**).

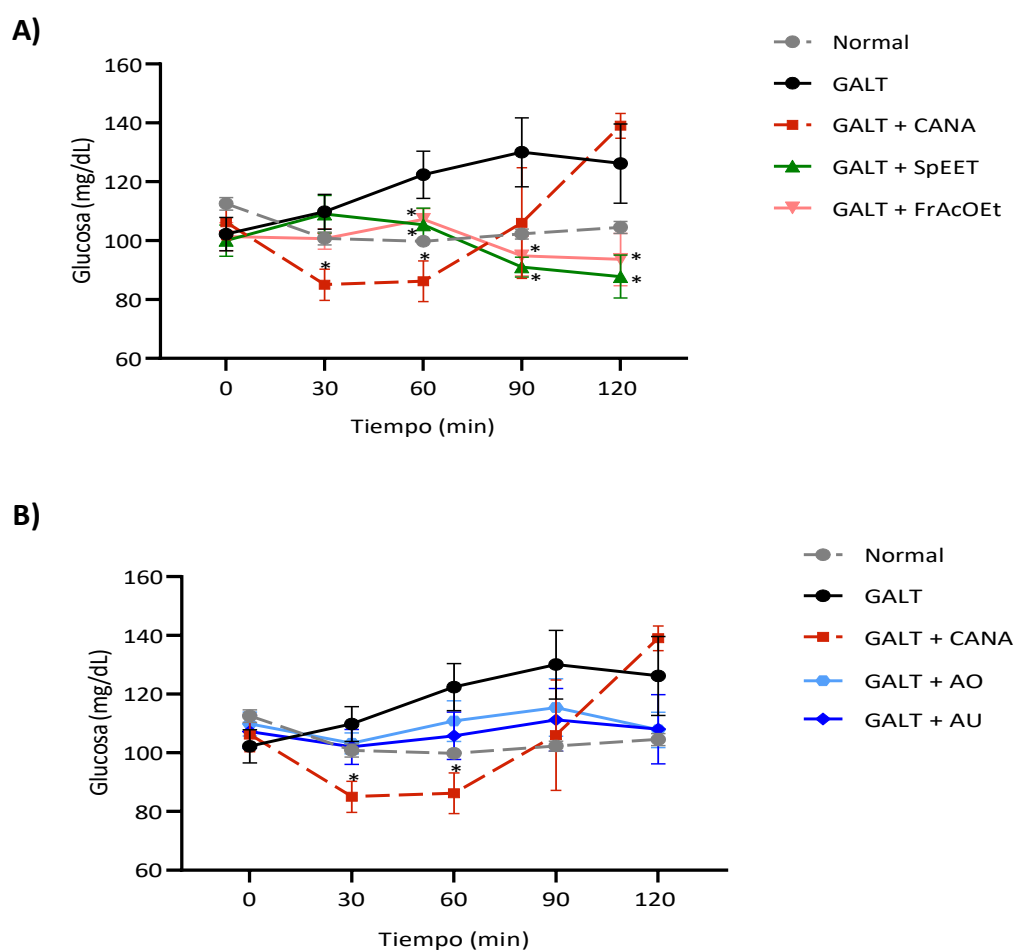
Gráfica 5. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de *S. polystachya* en la prueba de tolerancia oral a glucosa de grupos tratados con **A)** SpEET y FrAcOEt y **B)** AO y AU.



Media \pm E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo GLUC en los mismos tiempos. GLUC: glucosa; ACAR: acarbose; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico y AU: ácido ursólico.

Cuando se realizó el PTOGaT, el grupo tratado con este carbohidrato presentó un pico posprandial a partir de los 30 min y hasta el final del ensayo. Los grupos tratados con SpEET y FrAcOEt mostraron una reducción significativa en el pico posprandial a partir de los 60 min hasta los 120 min (**Gráfica 6A**). Además, AO y AU redujeron significativamente el pico posprandial desde los 60 min hasta el final del ensayo (**Gráfica 6B**). En todos los tratamientos, los efectos observados fueron menores que en el grupo tratado con canagliflozina.

Gráfica 6. Efecto de los productos obtenidos de los tallos de *S. polystachya* en la prueba de tolerancia oral a galactosa de grupos tratados con **A)** SpEET y FrAcOEt y **B)** AO y AU.



Media \pm E.E.M. (n=4). *p<0.05 Significativamente diferente (ANOVA *post hoc* Dunnett) en comparación con los valores del grupo GALT en los mismos tiempos. GALT: galactosa; ACAR: acarbosa; SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico y AU: ácido ursólico.

8.8. Pruebas *ex vivo*

Una vez evaluados, los productos en los ensayos *in vivo* se evaluaron en ensayos *ex vivo* para determinar si la actividad antidiabética estaba relacionada con una reducción en la hidrólisis intestinal de sacarosa, así como con la absorción intestinal de glucosa.

8.8.1. Inhibición de la hidrólisis intestinal de sacarosa de los productos obtenidos de SpEET

Luego de la adición de los tratamientos en las porciones de intestino SpEET, FrAcOEt y AU mostraron una reducción significativa en la glucosa absorbida a concentraciones de 200, 400 y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 734.3, 573.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 739.9 μM , respectivamente. Cuando se evaluó AO se observó una reducción significativa en la glucosa absorbida a 400 y 800 μM con un CI_{50} de 726.3 μM . Finalmente, acarbosa mostró una reducción significativa en la glucosa absorbida a 200, 400 y 800 μM , y la IC_{50} calculada fue de 173 μM (Tabla 15).

Tabla 15. Inhibición de la hidrólisis intestinal de sacarosa (HIS). Glucosa medida en el medio acuoso externo, porcentaje de inhibición y CI_{50} calculado después de la adición de tratamientos.

Tratamiento	Glucosa	Glucosa	% de inhibición	CI_{50}
	(mg/dL) 0 h	(mg/dL) 2h		
Sacarosa (15 %)	0 \pm 0	90.6 \pm 5.8	-	-
Acarbosa [200 μM]	0 \pm 0	38.2 \pm 1.22*	57.8 \pm 1.3	173 μM
Acarbosa [400 μM]	0 \pm 0	13.1 \pm 0.75 *	85.5 \pm 0.8	
Acarbosa [800 μM]	0 \pm 0	7 \pm 0.4 *	96.7 \pm 0.18	
SpEET [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	71.6 \pm 1.6*	20.8 \pm 1.8	734.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SpEET [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	55 \pm 2*	39.2 \pm 2.2	
SpEET [800 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	44 \pm 1.8*	51.4 \pm 2	
FrAcOEt [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	65.6 \pm 1.2 *	27.5 \pm 1.3	573.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
FrAcOEt [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	51 \pm 1.4 *	43.7 \pm 1.6	
FrAcOEt [800 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	35 \pm 1.7 *	61.3 \pm 1.8	
AO [200 μM]	0 \pm 0	87 \pm 3.9	3.9 \pm 1.6	726.3 μM
AO [400 μM]	0 \pm 0	77.3 \pm 1.2 *	14.6 \pm 1.3	
AO [800 μM]	0 \pm 0	50 \pm 3.6 *	44.8 \pm 4	
AU [200 μM]	0 \pm 0	59.3 \pm 1.8*	34.5 \pm 2	739.9 μM
AU [400 μM]	0 \pm 0	48.3 \pm 1.2*	46.6 \pm 1.3	
AU [800 μM]	0 \pm 0	45.3 \pm 1.9*	49.9 \pm 2.1	

Media \pm SEM (n=6). *p < 0,05 Valores significativamente diferentes frente al grupo de sacarosa. (ANOVA *post hoc* Dunnett). SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico; CI_{50} : concentración inhibitoria máxima media.

8.8.2. Inhibición de la hidrólisis intestinal de glucosa de los productos obtenidos de SpEET

Cuando los tratamientos se agregaron a las porciones de intestino en AIG, el SpEET redujo significativamente la cantidad de glucosa absorbida a 400 y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un CI_{50} de 1536.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de FrAcOEt, mostró una reducción significativa de la glucosa absorbida a concentraciones de 200, 400 y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CI_{50} calculada de 697.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso del ácido ursólico, mostró una reducción significativa de la glucosa absorbida a 400 y 800 μM con una CI_{50} de 966.6 μM . El ácido oleanólico mostró una reducción significativa de la glucosa absorbida a 200, 400 y 800 μM , y los valores de CI_{50} calculados fueron 849.3 y 834.5 μM , respectivamente. Finalmente, canagliflozina mostró una reducción significativa de la glucosa absorbida a 400 y 800 μM , con una CI_{50} calculada de 834.5 μM (**Tabla 16**).

Tabla 16. Prueba de inhibición de la absorción intestinal de glucosa (AIG). Glucosa medida en el medio acuoso externo, porcentaje de inhibición y CI_{50} calculado después de la adición de tratamientos.

Tratamiento	Glucosa	Glucosa	% de inhibición	CI_{50}
	(mg/dL) 0 h	(mg/dL) 1h		
Glucosa (5 %)	0 \pm 0	217.3 \pm 6.1	-	-
Canagliflozina [200 μM]	0 \pm 0	230 \pm 13.3	0	
Canagliflozina [400 μM]	0 \pm 0	113.5 \pm 7.4 *	49 \pm 3.1	834.5 μM
Canagliflozina [800 μM]	0 \pm 0	124 \pm 5.7 *	40.5 \pm 1.3	
SpEET [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	216 \pm 8.1	0.5 \pm 3.7	
SpEET [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	192.5 \pm 3.7*	11.4 \pm 1.4	1536.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SpEET [800 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	167.7 \pm 9 *	22.8 \pm 4.1	
FrAcOEt [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	175.3 \pm 19 *	19.3 \pm 8.7	
FrAcOEt [400 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	162.7 \pm 1.8 *	25.1 \pm 0.8	697.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$
FrAcOEt [800 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 \pm 0	176.5 \pm 7.1 *	18.7 \pm 7.7	
AO [200 μM]	0 \pm 0	189.3 \pm 4*	12.8 \pm 1.8	
AO [400 μM]	0 \pm 0	132.3 \pm 2.2 *	39.1 \pm 1	849.3 μM
AO [800 μM]	0 \pm 0	121 \pm 6.5 *	44.3 \pm 3	
AU [200 μM]	0 \pm 0	270 \pm 31.3	0	
AU [400 μM]	0 \pm 0	188.3 \pm 4 *	13.3 \pm 1.8	966.6 μM
AU [800 μM]	0 \pm 0	132.3 \pm 5.3 *	39.1 \pm 2.4	

Media \pm SEM (n=6). *p < 0,05 Valores significativamente diferentes frente al grupo de sacarosa. (ANOVA *post hoc* Dunnett) SpEET: extracto etanólico de tallo; FrAcOEt: fracción de acetato de etilo; AO: ácido oleanólico; AU: ácido ursólico y; CI_{50} : concentración inhibitoria máxima media.

Los resultados obtenidos en estas pruebas son consistentes con los de las evaluaciones *in vivo* de PTOS, PTOA, PTOG, y PTOGaT de ácido oleanólico y ácido ursólico. Estos resultados sugieren la inhibición de las enzimas α -glucosidasas, así como en la reducción en la absorción de glucosa mediada por la inhibición de SGLT-1.

8.9. Pruebas *in silico*

8.9.1. Docking molecular de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre α -glucosidasa

Para mostrar la posible interacción de AO y AU, se realizó un estudio de acoplamiento molecular utilizando como diana a la enzima α -glucosidasa, la cual interviene en el control de la hidrólisis de carbohidratos complejos utilizando acarbosa como control, en donde, su sitio de unión se comparó con los sitios de unión de AO y AU. De acuerdo con los resultados obtenidos (**Tabla 17**), AO tiene una mayor afinidad por el sitio de unión que la mostrada por AU, en donde, los valores de ΔG fueron: -6.41 kcal/mol y -5.48 kcal/mol, respectivamente. Además, ambos compuestos mostraron puentes de hidrogeno con los ligandos: AO con Leu677 y AU con los residuos de Asp518. En el caso de acarbosa esta obtuvo la mayor afinidad con la enzima, con un valor de ΔG de -8.33 kcal/mol y ocho interacciones polares con Arg281, Asp282, Ala284, Arg600, Asp616, Gly651, Ser676 y Leu678. Es importante mencionar que los tres ligandos mostraron el mismo sitio de unión; en el caso de acarbosa y AO se observó una posición de unión similar, mientras que AU muestra una posición diferente (**Figura 13**).

8.9.2. Docking molecular de ácido oleanólico y ácido ursólico sobre SGLT1

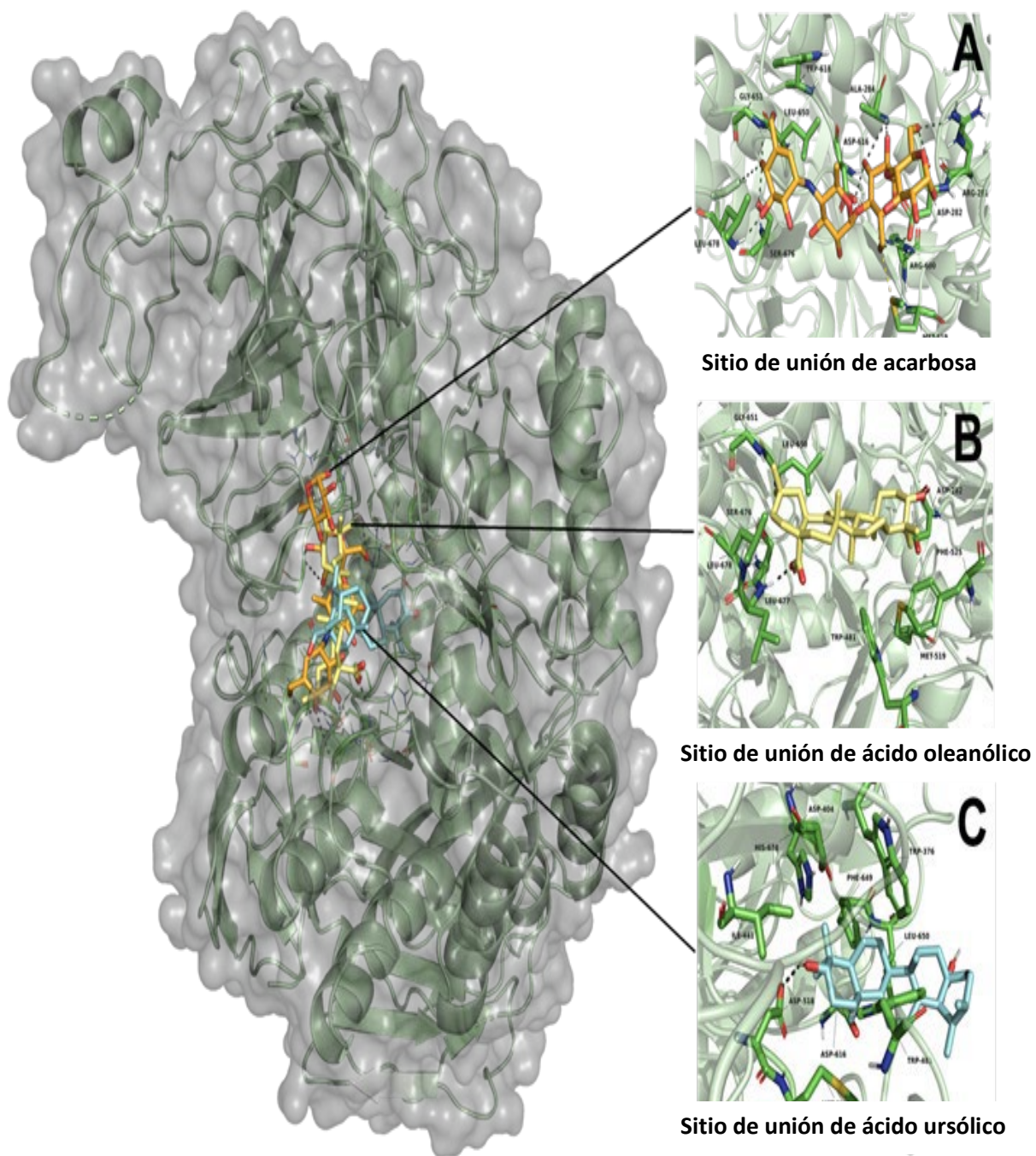
El segundo estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el cotransportador SGLT1 como diana. SGLT1 participa en el control de la absorción de glucosa utilizando al fármaco canagliflozina como control para comparar el sitio de unión. En los resultados (**Tabla 17**) se puede observar que AO obtuvo un ΔG de -10.55 kcal/mol con solo una interacción polar con Gln451 mientras que AU mostró un ΔG de -9.65 kcal/mol y dos interacciones polares con Gln451 y Gly523, en el caso de canagliflozina mostró la mejor afinidad con SGLT1 con un ΔG de -11.04 kcal/mol y cinco interacciones polares con Met283, Thr287, Tyr290, Trp291 y Gln457. Por otro lado, AU y AO mostraron el mismo sitio de unión el cual fue diferente al de canagliflozina (**Figura 14**).

Tabla 17. Interacciones de ácido oleanólico, ácido ursólico, acarbosa y canagliflozina con los residuos en los sitios de unión de las enzimas α -glucosidasa y SGLT1.

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	α -glucosidasa			ΔG (kcal/mol)	SGLT1		
		H-BR	NPI	RMSD		H-BR	NPI	RMSD
Acarbosa	-8.33	Arg281, Asp282, Ala284, Arg600, Asp616, Gly651, Ser676, Leu678	Met519, Trp618, Leu650	1.87	-	-	-	-
Canagliflozina	-	-	-	-	-11.04	Met283, Thr287, Tyr290, Trp291, Gln 457	Asn78, His83, Phe101	1.44
Ácido oleanólico	-6.41	Leu677	Asp282, Met519, Phe525, Leu650, Gly651, Ser676, Leu678	-	-10.55	Gln451	Gly272, Ala447, Gln448, Ser449, Asp454, Tyr455, Glu503, Thr508, Cys522, Gly523, Val524, His525, Tyr526	-
Ácido ursólico	-5.48	Asp518	Trp376, Trp481, Met519, Asp616, Phe649, Leu650, His674	-	-9.65	Gln451, Gly523	Asp273, Ala447, Gln448, Ser449, Asp454, Tyr455, Ser458, Thr508, Cys522	-

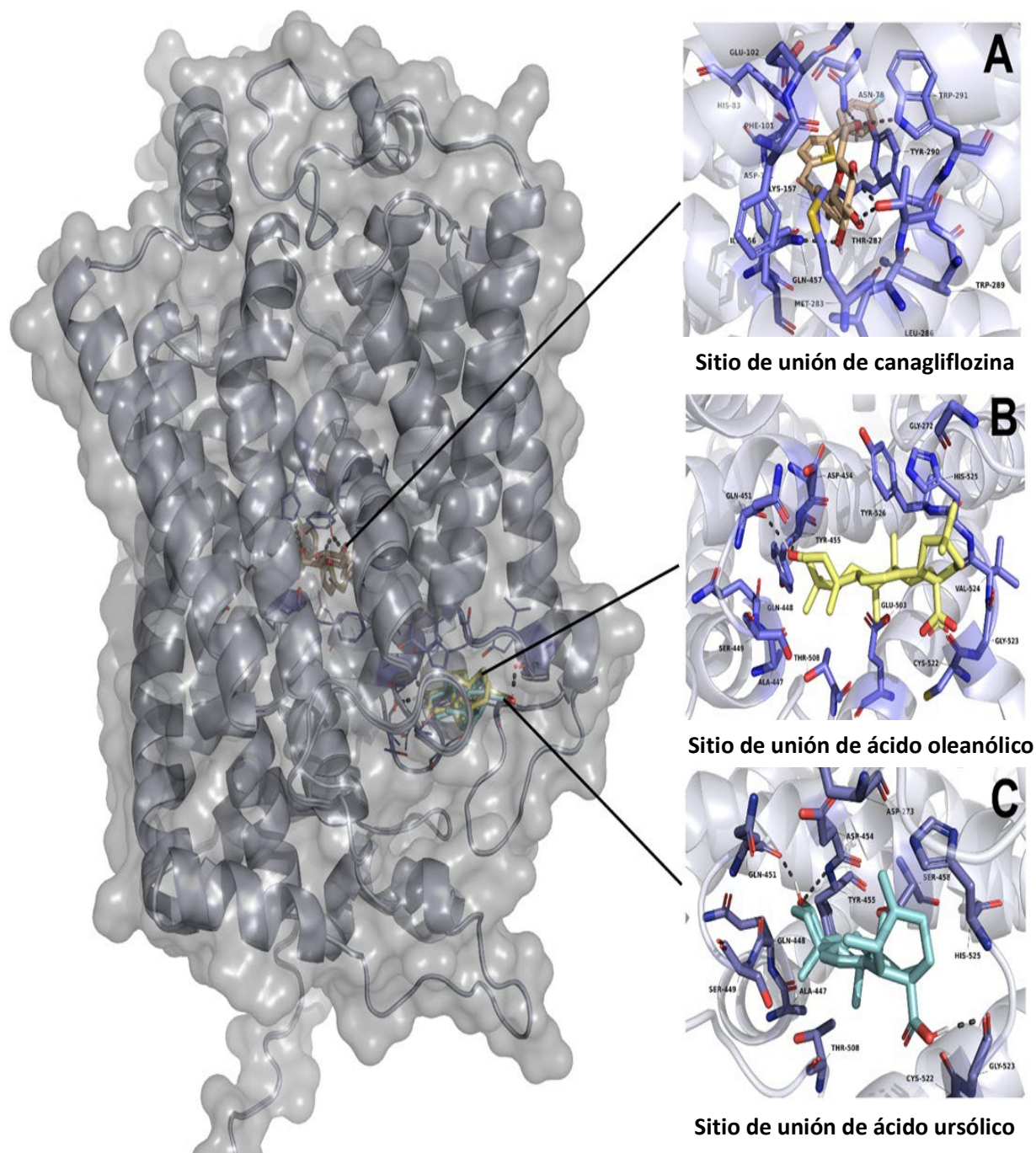
ΔG : Energía de unión (kcal/mol); H-BR: residuos de unión a H; NPI: interacciones no polares; Asp: aspartato; Asn: asparagina; Arg: arginina; Gln: glutamina; Lys: lisina; Thr: treonina; Ser: serina; Trp: triptófano; Leu: leucina; His: histidina; Gly: Glicina; Glu: ácido glutámico; Ile: isoleucina; Tyr: tirosina; Phe: fenilalanina.

Figura 13. Modelo estructural 3D del acoplamiento molecular sobre la enzima α -glucosidasa y sus posiciones con el sitio de unión con: acarbosa, ácido oleanólico y ácido ursólico.



Los compuestos se muestran en un modelo de bastones en donde: acarbosa (A) se muestra en color naranja; ácido oleanólico (B) en color amarillo y ácido ursólico (C) en color azul. La red de enlaces de hidrogeno para cada uno esta denotada en líneas punteadas.

Figura 14. Modelo estructural 3D del acoplamiento molecular sobre el cotransportador SGLT1 y sus posiciones con el sitio de unión con canagliflozina, ácido oleanólico y ácido ursólico.



Los compuestos se muestran en un modelo de bastones en donde: Acarbosa (A) se muestra en color naranja; ácido oleanólico (B) en color amarillo y ácido ursólico (C) en color azul. La red de enlaces de hidrogeno para cada uno esta denotada en líneas punteadas.

9. DISCUSIÓN

Varias especies de la familia Lamiaceae se han propuesto como plantas con efecto antidiabético, siendo ácido ursólico, ácido oleanólico y β -sitosterol algunos de los productos relacionados con esta actividad [Bautista y col., 2015; Bautista y col., 2016], en donde, ácido oleanólico y ácido ursólico se han descrito como posibles inhibidores de enzimas α -glucosidasas mediante experimentos in vitro e in silico [Maldonado y col., 1996]. Considerando estos antecedentes y teniendo en cuenta la necesidad constante del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la hiperglucemia provocada por la DM; fue tomando el criterio quimiotaxonómico para evaluar el efecto antidiabético del extracto etanólico obtenido de los tallos de *S. polystachya* mediante un estudio biodirigido utilizando ensayos in vivo, ex vivo e in silico.

Se sabe que las plantas pueden presentar un potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, pero también poseen el potencial de producir daño, toxicidad y muerte, por lo que inicialmente se realizó un estudio toxicológico agudo de los extractos obtenidos de las partes aéreas (flores, tallos y hojas) de *S. polystachya*. En donde los extractos no provocaron alteraciones de comportamiento, daño tisular visible, modificación el peso del cuerpo o de los órganos y, de acuerdo con el sistema de clasificación globalmente armonizado para sustancias y mezclas químicas adoptado por la OCDE, el extracto de tallo, al no mostrar mortalidad, fue clasificado como un fármaco no tóxico de clase 5 [OCDE, 2001]. En cuanto a los extractos de flor y de hoja que mostraron mortalidad a la dosis de 2000 mg/kg, fueron clasificados como sustancias de clase 4 o moderadamente tóxicas. En este sentido, se ha demostrado en diferentes estudios fitoquímicos que los compuestos presentes en una especie pueden cambiar dependiendo de la parte considerada de la planta [Verma y col., 2013]; en estas variaciones influye la presencia o ausencia de algún constituyente, o los cambios en su concentración, en donde los metabolitos varían considerablemente en respuesta a la humedad, el tipo de suelo y el clima predominante durante su crecimiento [Pepato y col., 2005].

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad, el extracto de tallo (SpEET) fue elegido para continuar con el estudio por lo que se realizó una evaluación aguda en ratones sanos, mostrando un efecto hipoglucémico a dosis de 200 mg/kg, efecto comparable al del fármaco glibenclamida. Como siguiente paso, el efecto del extracto fue probado en un modelo de ratones diabéticos en el que se empleó el modelo de estreptozocina-nicotinamida (STZ-NA). En la literatura se ha reportado que la administración de STZ induce citotoxicidad selectiva de las células β pancreáticas [Skudelski, 2001; Diab y col., 2015], seguida de la protección de las células β generada por la administración de NA [Chatuphonprasert y col., 2014], el resultado de esta administración es un modelo en donde se observa una inhibición parcial de la secreción de insulina [Ovalle-Magallanes y col., 2015]. Este modelo de diabetes se caracteriza por hiperglucemia e intolerancia a

la glucosa, como ocurre en la DMT2 por lo que es considerado un modelo valioso para el estudio de posibles fármacos antidiabéticos, incluidas las plantas medicinales [Flores-Bocanegra y col., 2017; Esquivel y col., 1991]. La administración SpEET generó una reducción significativa de la hiperglucemia en los animales con diabetes experimental, resultados que son similares a los reportados para otras especies de la familia Lamiaceae [Bautista y col., 2015; Bautista., 2016; Esquivel y col., 1991; Aydoğmuş y col., 2066; Maldonado y col., 1996; Jaeger y Cuny, 2016], en donde, los autores describen la disminución de la hiperglucemia tras la administración aguda de los extractos etanólicos de otras especies, y en el caso de *S. amarissima* se ha reportado que la administración subcrónica del extracto controla la hiperglucemia que se ve acompañada de una reducción en el porcentaje de hemoglobina glucosilada [Solares-Pascasio y col., 2021].

Una vez demostrado el efecto sobre la glucemia de ratones diabéticos, SpEET fue fraccionado y las fracciones obtenidas fueron evaluadas en ratones diabéticos para demostrar si la separación de metabolitos afectaba el efecto observado por el extracto completo. Los resultados mostraron que ambas fracciones redujeron significativamente la hiperglucemia de los ratones con diabetes experimental, y fue la fracción de acetato de etilo (FrAcOEt) la que mostro un mejor efecto.

Además de hiperglicemia descontrolada, la DMT2 está estrechamente relacionada con alteraciones asociadas con disminución de insulina y adiponectina, lo que provoca reducción en la actividad de la lipoproteína lipasa, resultando en niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG), así como niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esta dislipidemia contribuye significativamente a las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes, provocando un mayor riesgo de enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebrovascular [Kumar, 2019; Kidwai y col., 2020]. Para determinar si la administración sostenida de SpEET y FrAcOEt, mejoraba estas alteraciones se realizó un ensayo subcrónico en donde se observó un perfil lipídico anormal en el grupo diabético control, sin embargo, en la segunda y tercera semana de tratamiento con SpEET (100 mg/kg) y FrAcOEt (100 mg/kg) se observó que disminuyeron los niveles de glucosa en sangre, los niveles de TG, y un aumento en HDL, estos resultados sugieren la presencia de sustancias activas en SpEET y FrAcOEt que podrían tener utilidad en el control de la diabetes mellitus a largo plazo y en consecuencia la prevención de dislipidemias.

En cuanto al peso corporal, el grupo de control normal mantuvo una ganancia de peso constante, mientras que el grupo de diabéticos mostró una disminución de 25.8 a 23.8 g, lo que es consistente con informes previos de otros autores [Pepato y col., 2005; El-Hilaly y col., 2006]. En este estudio, la administración diaria de SpEET mostró protección en la diabetes inducida por NA-STZ, manteniendo el peso corporal constante y

mostrando la posibilidad de recuperar la normalidad de las vías metabólicas características de la diabetes [Pottathil y col., 2020], adicionalmente los parámetros medidos en orina aportan información sobre un buen control y aparición de posibles complicaciones en la DMT2 [Prasad y col., 2016], en donde, los ratones diabéticos control mostraron alteración en los cuerpos cetónicos y glucosuria, parámetros que normalmente están alterados en pacientes con DMT2; la administración de SpEET y FrAcOEt no mostró alteraciones hepáticas (urobilinógeno y bilirrubina) ni renales (proteínas y SG). Estos datos permiten proponer que los tratamientos administrados durante seis semanas no causan daño en órganos, sin embargo, estos datos deben ser corroborados con un análisis histológico.

Una vez corroborado el efecto de FrAcOEt en las pruebas agudas y subcrónicas se realizó un fraccionamiento secundario de esta fracción mediante cromatografía en columna abierta para aislar a algunos de los posibles compuestos responsables de los efectos observados en el extracto de tallo de *S. polystachya*. Para identificar a estos compuestos se realizó una selección fitoquímica basada en reportes de otras especies de *Salvia*, en donde se incluyó a linearolactona y a las polistaquinas A, B y D, compuestos previamente aislados en *S. polystachya*. Se realizaron múltiples comparaciones utilizando cromatografía en capa fina y fue identificada la presencia de: ácido oleanólico y ácido ursólico en FrSec6, dos terpenoides que se han descrito como inhibidores de enzimas α -glucosidasas [Maldonado y col., 1996], la presencia de estos compuestos se confirmó mediante HPLC. Es importante mencionar que hasta este momento no se había reportado la presencia de estos compuestos en esta especie vegetal. Continuando con el estudio biodirigido, los compuestos se evaluaron en el modelo de DME, mostrando reducciones significativas en los niveles de glucosa en sangre. Algunos autores han reportado que AU actúa como insulinomimético y como un sensibilizador de la insulina [Jang y col., 2009], aumentando la translocación de vesículas de insulina, la secreción de insulina y el contenido de glucógeno aumentado [Castro y col., 2015], por lo que el efecto observado en SpEET podría ser explicado parcialmente.

Para continuar con el estudio, se abordó el efecto de estos compuestos sobre la hidrólisis de carbohidratos complejos y la absorción de carbohidratos simples mediado por las enzimas α -glucosidasas y el cotransportador SGLT1. Sabemos que la inhibición de las enzimas α -glucosidasas pueden retrasar la hidrólisis de los carbohidratos complejos de la dieta, y retrasando la absorción de glucosa reflejado en una disminución del pico posprandial de glucosa en sangre [Jhong y col., 2015]. En la presente investigación, la inhibición de estas enzimas se evaluó realizando pruebas de tolerancia oral a sacarosa y almidón, midiendo el pico de glucosa posprandial en sangre, de esta manera se determinó la posible inhibición de las enzimas implicadas en la hidrólisis de diferentes tipos de enlaces glucosídicos (sacarosa: α -1,2; almidón: α -1,4). Con los resultados

obtenidos fue posible determinar que SpEET, FrAcOEt, AO y AU redujeron significativamente el pico posprandial después de la administración de sacarosa o almidón, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas.

El segundo mecanismo de acción evaluado fue la inhibición del cotransportador SGLT1, el cual es parte de un subgrupo del grupo de transportadores de solutos (SLC5), en los que se incluye a seis miembros que se diferencian entre sí, por su sitio de unión con el azúcar. Los transportadores de esta familia utilizan el gradiente electroquímico de sodio para transportar a las moléculas de azúcar al interior de las células. Entre los más estudiados de la familia SLC5, destacan SGLT1 y SGLT2. SGLT2 se expresa principalmente en los túbulos renales proximales iniciales y es responsable de >90% de la reabsorción renal de glucosa filtrada (160-180 g/día) mientras que SGLT1 participa en la absorción de glucosa desde la luz intestinal hacia las células epiteliales del intestino delgado [Kuroda y col., 2018], se expresa en la membrana de los enterocitos, que son los responsables de mediar la absorción intestinal de glucosa [Yoshikawa y col., 2011; Röder y col., 2014]. Para determinar la posible inhibición de SGLT1 por parte de los tratamientos se realizaron pruebas de tolerancia oral a la glucosa y galactosa. Es posible que la reducción del pico posprandial de glucosa después de la carga de los carbohidratos observada cuando se administran SpEET, FrAcOEt, AO y AU funcionen en conjunto con la inhibición de las enzimas α -glucosidasas mostrada en los ensayos anteriores. Además, en el caso de SpEET y FrAcOEt, uno o más compuestos podrían inhibir algunos de los transportadores de glucosa implicados en su absorción, siendo AO y AU parcialmente responsables de los efectos observados. Es necesario realizar estudios adicionales para identificar otros compuestos y determinar su posible acción sinérgica. Con estos resultados se puede proponer la presencia de compuestos con la capacidad de inhibir a las enzimas α -glucosidasas, presentes en *S. polystachya*.

El siguiente paso fue realizar ensayos ex vivo con el objetivo de corroborar la actividad demostrada en los ensayos in vivo por parte de los productos aislado AO y AU. Primero se realizó un ensayo de hidrólisis intestinal de sacarosa (HIS), en el cual ambos productos redujeron significativamente la cantidad de glucosa en el medio externo acuoso. Estos resultados pueden interpretarse como una posible inhibición de las enzimas α -glucosidasas presentes en la porción de intestino utilizada, en donde la CI50 calculada para los tratamientos mostró el potencial en el efecto inhibitorio de la hidrólisis de carbohidratos complejos mediada por las enzimas α -glucosidasas. A pesar de que acarbosa mostró un valor de CI50 menor, los resultados mostrados por los productos aislados son importantes. Se ha descrito que AO y AU aislados de *S. africana-lutea* mostraron actividad inhibitoria de enzimas α -glucosidasas, al realizar un análisis cinético de inhibición,

en donde, los valores de CI50 se mantuvieron en un rango de 24.7 – 188.7 μM en comparación con acarbosa (945.5 μM).

En la evaluación de absorción de glucosa intestinal, los productos mostraron una reducción significativa en la glucosa total absorbida, corroborando la actividad observada en PTOG y PTOGaT. La CI50 calculada para AO y AU fue de 849.3 y 966.6 μM , respectivamente, que fue similar a la CI50 obtenida para el fármaco control canagliflozina (834.5 μM). Estos resultados *in vivo* y *ex vivo* sugieren que la actividad antihiper glucémica observada tras la administración de los productos obtenidos a partir de los tallos de *S. polystachya* puede estar mediada, tanto por la inhibición de la hidrólisis de carbohidratos complejos como por la absorción de carbohidratos simples.

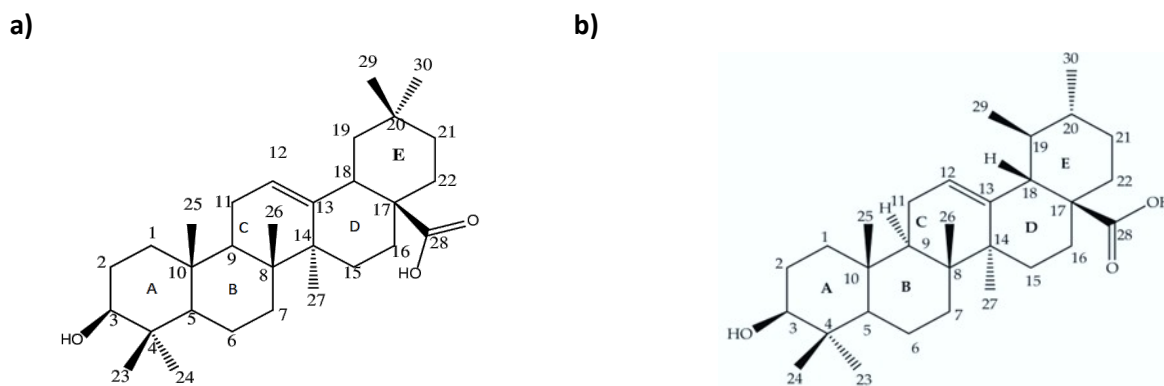
Finalmente, se realizaron estudios *in silico* para determinar el posible sitio de unión de AO y AU en el cotransportador de α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1. En el caso de las enzimas α -glucosidasas, AU mostró un valor de ΔG de -5.48 kcal/mol; además mostró dos residuos de aminoácidos (Asp616 y Leu650) que comparte con acarbosa. A pesar de que la posición de unión no es la misma, esta posición puede ayudar a inhibir la actividad de la enzima α -glucosidasa. Quizás, como describen algunos autores, el grupo metilo en la posición C-19 puede estar involucrado en la posición de unión [Dirir y col., 2021] por lo que es necesario realizar estudios de dinámica molecular para observar si esta posición evita la interacción entre la sacarosa y la enzima α -glucosidasa. Por otro lado, AO mostró un ΔG de -6.41 kcal/mol, compartiendo seis residuos de aminoácidos (Asp282, Met519, Leu650, Gly651, Ser676 y Leu678) con acarbosa, además la posición de unión es muy similar a la de acarbosa. Estos datos son congruentes con los resultados obtenidos durante los ensayos previos, en donde AO redujo el pico posprandial de glucosa, la cantidad de glucosa absorbida en HIS y un CI50 más bajo (726.3 μM) que el obtenido para AU (739.9 μM).

Con respecto a los estudios de acoplamiento molecular con SGLT1, AU (ΔG de -9.65 kcal/mol) y AO (ΔG de -10.51 kcal/mol) mostraron valores de unión importantes; sin embargo, la posición de acoplamiento a SGLT1 no fue similar a la obtenida por canagliflozina (ΔG de -11.04 kcal/mol). De acuerdo con los resultados obtenidos durante los estudios previos *in vivo* y *ex vivo*, AO y AU redujeron el pico posprandial de glucosa en PTOG y PTOGaT, y mostraron un CI50 importante (966.6 y 849.3 μM , respectivamente), existiendo la posibilidad de que inhiban la actividad del cotransportador SGLT1 en un sitio alostérico, sin embargo, el siguiente paso de la investigación será realizar estudios de dinámica molecular acompañados de estudios de inhibición enzimática para confirmar los resultados obtenidos.

AO y AU son triterpenoides pentacíclicos, isómeros que difieren en la posición de un residuo de metilo conectado al C-19 o C-20 en el anillo E (Figura 15 a, b). Estas modificaciones dan como resultado, diferentes

triterpenos; el primero un oleanano, mientras que el segundo es un ursano [Jäger y col., 2009; Ding y col., 2018]. Cabe mencionar que estos compuestos se encuentran en muchas especies; en particular, del género *Salvia* y se ha reportado que AO aislado de *S. moorcraftiana* tiene el potencial de reducir la hiperglucemia y las complicaciones de la diabetes [Rzedowski & Rzedowski, 2001; Ortega & Maldonado, 2006; Castellano y col., 2013; Flores-Bocanegra y col., 2017], así como una gran permeabilidad en el intestino delgado [Topçu, 2006; Prasad y col., 2016; Šulniūtė y col., 2017; Abd Rashed & Rathi, 2021], por lo que fue propuesto como inhibidor de enzimas α -glucosidasas [Khan y col., 2002; Nickavar & Abolhasani, 2013; Guzmán-Ávila y col., 2018; Mahdizadeh y col., 2018], datos que son consistentes con lo observado en nuestros resultados. El presente estudio demuestra por primera vez el aislamiento de AO y AO en *S. polystachya*. Además, en este estudio se evaluó el efecto antihiperglucémico con un posible efecto inhibidor dual sobre las enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1.

Figura 15. Estructura química de los terpenos identificados en *S. polystachya*



Estructura química de: **a)** ácido oleanólico y **b)** ácido ursólico

10. CONCLUSIÓN

SpEET, FrAcOEt, FrSec6, AO y AU redujeron los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos. Parte de este efecto se confirmó mediante estudios *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*. Los resultados completos del análisis sugieren que la actividad antidiabética de los productos obtenidos de los tallos de *S. polystachya* está mediada en parte por su acción en la inhibición de las enzimas α -glucosidasas y del cotransportador SGLT1 en donde AO y AU son en parte responsables de este efecto y se han reportado por primera vez en esta especie. Estos resultados aportan las bases fitoquímicas y farmacológicas para el uso de *S. polystachya* como fuente de nuevos agentes antidiabéticos para el control de la DMT2.

11. PERSPECTIVAS

- Identificar el efecto sobre glucosa en sangre y parámetros bioquímicos de la administración subcrónica de AO y AU en ratones con DME y realizar un análisis histológico
- Realizar estudios de dinámica molecular acompañados de estudios de inhibición enzimática para confirmar los resultados obtenidos.
- Identificar y evaluar los compuestos mayoritarios presentes en FrAcOEt.

12. Referencias

1. Abd Rashed A & Rathi DNG. (2021). Bioactive Components of *Salvia* and Their Potential Antidiabetic Properties: A Review. *Molecules*, 26(10), 3042. <https://doi.org/10.3390/molecules26103042>
2. Abreu GOA & Cuéllar CA. (2008). Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(3), 0-0.
3. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Información Etnobotánica*, México, 107.
4. Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Aguirre-Garcia F. (2002). Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res.*, 6(4):383-386. <https://doi.org/10.1002/ptr.914>
5. Argumedo DR, Parra-Delgado H, Ramírez AM, Nieto CA, Martínez-Vázquez M. (2003). Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 47(2), 167-172.
6. Aydoğmuş Z; Yeşilyurt V; Topcu G. (2006). Constituents of *Salvia microphylla*. *Nat. Prod. Res.*, 20, 775–781. <https://doi.org/10.1080/14786410500462843>
7. Aylwin, C. G. (2016). Nuevos fármacos en diabetes mellitus. *Rev Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 235-256
8. Bassil M, Daher CF, Mroueh M, Zeeni N. (2015). *Salvia libanotica* improves glycemia and serum lipid profile in rats fed a high fat diet. *BMC Complementary and Alternative medicine*, 15(1): s/p. DOI 10.1186/s12906-015-0917-8
9. Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas C. A, De la Cruz-Góngora V, Rivera-Dommarco J, Barrientos-Gutiérrez, T. (2021): Prevalencia de diabetes y control glucémico en México: resultados nacionales 2018 y 2020. *Salud Pública de México*, 63(6), 725-733.
10. Baque GCC, Escobar LCN, Campoverde MBG, León LDS, Mera JCT, Ponce SSA. (2019). La diabetes como afectación grave se presenta con complicaciones típicas. *Dominio de las Ciencias*, 5(1), 160-198.
11. Bautista E, Fragoso-Serrano M, Ortiz-Pastrana N, Toscano RA, Ortega A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.08.007>
12. Bautista E, Fragoso-Serrano M, Toscano RA, García-Peña, MDR, Ortega A. (2015). Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity

- of multidrug resistance in cancer cells. *Org. Lett.*, 17(13), 3280-3282. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01320>
13. Bautista E, Ortiz-Pastrana N, Pastor-Palacios G, Montoya-Contreras A, Toscano RA, Morales-Jiménez J, Ortega A. (2017). Neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya* stimulate the expression of extracellular matrix components in human dermal fibroblasts. *J. Nat. Prod.*, 80(11), 3003-3009. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00591>
 14. Bedolla-García BY, Lara-Cabrera SI, Zamudio S. (2011). Dos nuevas especies de *Salvia* (Lamiaceae) del centro occidente de México. *Acta Bot Mex*, (95), 51-63.
 15. Behradmanesh S, Derees F, Rafieian-kopaei M. (2013). Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. *J Renal Inj Prev.*,2(2):51-54. DOI:10.12861/jrip.2013.18
 16. Bougherara L., Hanssens S, Subtil D, Vambergue A, Deruelle P. (2018): Diabetes gestacional. EMC - Ginecología-Obstetricia, 54(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(18\)88086-9](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(18)88086-9)
 17. Bushway AA, Belyea PR, Bushway RJ. (1981) Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *J. Food Sci.*,46(5):1349-1350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb04171.x>
 18. Calzada F, Yepez-Mulia L, Tapia-Contreras A, Bautista E, Maldonado E, Ortega A. (2012). Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Phytother Res*,24(5):662-665. <https://doi.org/10.1002/ptr.2938>
 19. Casas A, Valiente-banuet A, Viveros JL, Caballero J, Córtes L, Davila P, Lira R, Rodríguez I. (2001): Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán valley, México. *Economic Botany*, 55(1), 129-166.
 20. Castellano JM, Guinda A, Delgado T, Rada M, Cayuela JA. (2013). Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*. 62, 1791–1799. <https://doi.org/10.2337/db12-1215>
 21. Castro AJG, Frederico MJS, Cazarolli LH, Mendes CP, Bretanha LC, Schmidt ÉC, Bouzon ZL, De Medeiros PVA, Da Fonte RC, Pizzolatti MG, Silva FRMB. (2015). The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.001>
 22. Chatuphonprasert W, Lao-Ong, T, Jarukamjorn, K. (2014). Improvement of superoxide dismutase and catalase in streptozotocin–nicotinamide-induced type 2-diabetes in mice by berberine and glibenclamide. *Pharm Biol*, 52(4), 419-427. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.839714>

23. Cornejo-Tenorio G, Ibarra-Manríquez G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Rev. Mex. Biodiv.*, 82(4):1279-1296.
24. de la Torre, M. L. La diabetes Mellitus Complicaciones. Recuperado de <http://www.elendocrino.com/linked/Archivos%20profesionales/Complicaciones%20Diabetes.pdf>.
25. Diab H, Fares M, Abdei-Valugardi M, Kumagai-Baresch M, Holgersson, Hassan M. (2015). Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan *in vitro* and *in vivo* studies. *Immunol. Lett.*, 163, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.12.006>
26. Diabetes, O. M. S. (2016): Informe mundial sobre la diabetes. Ginebra. [<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=3E61C1EDD8D1A89571582C20F68F51B0?sequence=1>].
27. Dieringer G, Ramamoorthy TP, Lezama PT. (1991). Floral visitors and their behavior to sympatric *Salvia* species (Lamiaceae) in Mexico. *Acta Bot Mex*, (13), 75-83. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm13.1991.609>
28. Ding H, Hu X, Xu X, Zhang G, Gong D. (2018). Inhibitory mechanism of two allosteric inhibitors, oleanolic acid and ursolic acid on α -glucosidase. *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.040>
29. Dirir AM, Daou M, Yousef AF, Yousef LF. (2021). A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochem Rev.* 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09773-1>
30. Egan AM, & Dinneen SF. (2019): What is diabetes? *Medicine*, 47(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.002>
31. El-Hilaly J, Sahraoui A, Israeli ZH, Lyoussi B. (2006). Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*, 105, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.023>
32. Esquivel B, Esquivel O, Cárdenas J, Sánchez AA, Ramamoorthy TP, Toscano RA, Rodríguez-Hahn L. (1991). Clerodane and seco-clerodane diterpenoids from *Salvia reptans*. *Phytochemistry*, 30(7), 2335-2338. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83644-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83644-Z)
33. Farhat GN, Affara NI, Gali-Muhtasib HU. (2001). Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicol.* 39(10):1601-1605. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00143-X)
34. Fernández-Nava R, Ramos-Rivera P. (2017). Computarización del Herbario ENCB. Fase I (Base de datos de los ejemplares del Valle de México). Versión 1.4. Comisión nacional para el conocimiento y

- uso de la biodiversidad. Occurrence Dataset <https://doi.org/10.15468/uxmws5> accessed via GBIF.org on 2017-12-13
35. Flores-Bocanegra L, González-Andrade M, Bye R, Linares E, Mata R. (2017). α -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.*, 80(5), 1584-1593. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00155>
 36. García PMR, Martínez GMJ, Fragoso MI. (2016). Labiadas (Lamiaceae) En: Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO) y secretaria del Medio Ambiente del Distrito Federal (SEDEMA). La biodiversidad en la ciudad de México Volumen II. CONABIO/SEDEMA. México
 37. Gómez AR. (2012): Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Rev. Fitotec. Mex.*, 35(1):43-49.
 38. González MÁB, Garciglia RS. (2013). Plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 9(1), 126-138
 39. González-Sánchez A, Ortiz-Andrade R. (2012): ¿Qué sabe usted acerca de... los antidiabéticos orales (ADO's)? *Rev Mex Cienc Farm*, 43(1), 79-84.
 40. Gordillo CG, Negrón LP, Zúñiga TH, Flores E, Moreyra R, Fuertes C, Guerra GA, Apestegia A, Quintana MA. (2012). Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de las hojas de *Smalanthus sonchifolius* (yacón) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Ciencia e Investigación*, 15(1):42-47.
 41. Gutiérrez ERE, Cisneros RN, González MAB, Molina AS, Garciglia RS. (2013): Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1):45-52.
 42. Guzmán-Ávila R, Flores-Morales V, Paoli P, Camici G, Ramírez-Espinosa JJ, Cerón-Romero L, Navarrete-Vázquez G, Hidalgo-Figueroa S, Rios MY, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto, S. (2018). Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: *In vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Drug. Dev. Res.* 79, 70–80. <https://doi.org/10.1002/ddr.21422>
 43. Hagopian WA, Lernmark A, Rewers MJ, Simell OG, She JX, Ziegler AG, Krischer JP, Akolkar B. (2006): TEDDY-The Environmental Determinants of Diabetes in the Young: an observational clinical trial. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1079, 320-6. <https://doi.org/10.1196/annals.1375.049>
 44. Hernández T, Canales M, Caballero J, Durán A, Liras R. (2005): Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Interciencia*, 30(9):17-27.

-
45. IMSS (2018): Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México, Instituto Mexicano del Seguro Social.
 46. Jaeger R, Cuny E. (2016). Terpenoids with special pharmacological significance: A review. *Nat. Prod. Commun.*, 11, 1373-1390. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100946>
 47. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*. 14, 2016–2031. <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>
 48. Jang, SM, Yee ST, Choi J, Choi MS, Do GM, Jeon SM, Yeo J, Kim MJ, Seo Kil, Lee MK. (2009). Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *Int. Immunopharmacol.* 9, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.013>
 49. Jash SK, Gorai D, Roy R. (2016). *Salvia* genus and triterpenoids. *Int J Pharm Sci Res*, 7(12), 4710.
 50. Jhong CH, Riyaphan J, Lin SH, Chia YC, Weng CF. (2015). Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking *in silico*. *BioFactors*. 41, 242–251. <https://doi.org/10.1002/biof.1219>
 51. Khan T, Zahid M, Asim M, Iqbal Z, Choudhary MI, Ahmad VU. (2002). Pharmacological activities of crude acetone extract and purified constituents of *Salvia moorcraftiana* Wall. *Phytomedicine*. 9, 749–752. <https://doi.org/10.1078/094471102321621386>
 52. Khawandanah, J. (2019). Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. *Nutrition & Diabetes*, 9(1). DOI:10.1038/s41387-019-0101-1
 53. Kidwai SS, Nageen A, Bashir F, Ara J. (2020). HbA1c – a predictor of dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Pakistan J. Med. Sci.* 36, 1339–1343. <https://doi.org/10.12669/pjms.36.6.2000>
 54. Kumar A, Bharti SK, Kumar A. (2017): Therapeutic molecules against type 2 diabetes: What we have and what are we expecting? *Pharmacol Rep*, 69(5), 959-970. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.04.003>
 55. Kumar D. (2019). Molecular medicine of diabetes mellitus. In *Clinical Molecular Medicine: Principles and Practice*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809356-6.00015-0>
 56. Kumar PM, Sasmal D, Mazumder PM. (2010). The antihyperglycemic effect of aerial parts of *Salvia splendens* (scarlet sage) in streptozotocin-induced diabetic-rats. *Pharmacognosy Res*, 2(3), 190-199. DOI: 10.4103/0974-8490.65520
-

57. Kuroda S, Kobashi Y, Oi T, Amada H, Okumura-Kitajima L, Lo F; Yamamoto K, Kakinuma H. (2018). Discovery of a potent, low-absorbable sodium-dependent glucose cotransporter 1 (SGLT1) inhibitor (TP0438836) for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 28, 3534–3539. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.09.035>
58. Libman IM. (2009). Epidemiología de la diabetes mellitus en la infancia y adolescencia: tipo 1, tipo 2 y ¿diabetes" doble"? *Rev Argent Endocrinol Metab*, 46(3), 22-36.
59. Mahdizadeh R, Moein S, Soltani N, Malekzadeh K, Mahmoodreza M. (2018). Study the molecular mechanism of *Salvia* species in prevention of diabetes. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 9,4512–4521.
60. Maldonado E, Cárdenas J, Bojórquez H, Escamilla EM, Ortega A. (1996). Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry*, 42(4), 1105-1108. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00147-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00147-1)
61. Martínez-Gordillo M & Lozada-Pérez L. (2011). Una nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) de Guerrero, México. *Brittonia*, 63(2), 211-214.
62. Masharani U, German MS. (2012). Hormonas pancreáticas y diabetes mellitus. En: *Endocrinología básica y clínica*. 9ª ed. México: Mc-Graw-Hill; pp. 573-655.
63. Mata R, Cristians S, Escandón-Rivera S, Juárez-Reyes K, Rivero-Cruz I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J. Nat. Prod.*, 76(3):468-483. <https://doi.org/10.1021/np300869g>
64. Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 58(8):1171-1175.
65. Morris G M, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
66. Nanayakkara N, Curtis AJ, Heritier S, Gadowski AM, Pavkov ME, Kenealy T, Owens DR, Thomas RL, Song S, Wong J, Chan JCN, Luk AOY, Penno G, Ji L, Mohan V, Amutha A, Romero-Aroca P, Gasevic D, Magliano DJ, Zoungas S. (2021). Impact of age at type 2 diabetes mellitus diagnosis on mortality and vascular complications: systematic review and meta-analyses. *Diabetologia*, 64(2), 275–287. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05319-w>
67. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. (2018). Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg. Chem.*, 77, 548–567. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.02.009
68. Navarro Pérez LDC, Avendaño Reyes S. (2002). Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México. *Polibotánica*. (14): s/p.

-
69. Nickavar B & Abolhasani L. (2013). Bioactivity-guided separation of an α -amylase inhibitor flavonoid from *Salvia virgata*. *Iran. J. Pharm. Res.*, 12, 57–61.
70. OCDE. Guideline for testing if chemicals. Acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001; PP. 1-14. Disponible online: https://ntp.niehs.nih.gov/lccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl423.pdf
71. Olivares RJA, & Arellano PA. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev Educ Bioquimica*, 27(1):9-18.
72. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J.*, 27(4):269-273. DOI: 10.5001/omj.2012.68
73. Ortega A, Bautista E, Maldonado E. (2006) Polystachyne F, a 5, 10-seco-Neoclerodane from *Salvia polystachya*. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(9):1338-1339. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.1338>
74. Ovalle-Magallanes B, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Mata R. (2015). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of phytopreparations and limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*, 110, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.004>
75. Pepato MT, Mori DM, Baviera AM, Harami JB, Vendramini RC, Brunetti IL. (2005). Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 96, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.029>
76. Pérez LG, González AO, Cano MM. (2010). Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2): de la glucosuria renal familiar al tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología*, 30(6), 618-625.
77. Porwal M, Khan NA, Maheshwari KK. (2017). Evaluation of acute and subacute oral toxicity induced by ethanolic extract of *Marsdenia tenacissima* leaves in experimental rats. *Sci. Pha.*, 2017, 85, 29. <https://doi.org/10.3390/scipharm85030029>
78. Pottathil S, Nain P, Morsy MA, Kaur J, Al-Dhubiab BE, Jaiswal S, Nair AB. (2020). Mechanisms of antidiabetic activity of methanolic extract of *Punica granatum* leaves in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Plants*. 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9111609>
79. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. (2016). Detection of inflammatory biomarkers in *Saliva* and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Exp. Biol. Med.*, 241, 783–799. <https://doi.org/10.1177/1535370216638770>
80. Qaseem A, Barry MJ, Humphrey LL, Forciea MA. (2017). Oral pharmacologic treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical practice guideline update from the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.*, 166(4), 279-290. <https://doi.org/10.7326/M16-1860>
-

81. Ramamoorthy TP. (2001). *Salvia*, L. En: Calderón, G., Rzedowski, J. y. Rzedowski, J. Flora Fanerogámica del Valle de México. 634-635
82. Rizza AR, Vella A. (2010). Diabetes Mellitus. En: Farmacología y terapéutica: principios para la práctica. Manual Moderno; pp. 557-570
83. Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H. (2014). The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One.* 9, 20–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089977>
84. Rodríguez-Rivera NS, Cuautle-Rodríguez P, Molina-Guarneros JA. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Rev Hosp Jua Mex*, 84(4), 203-211.
85. Roig-Zamboni V, Cobucci-Ponzano B, Iacono R, Ferrara MC, Germany S, Bourne Y, Sulzenbacher G. (2017). Structure of human lysosomal acid α -glucosidase—a guide for the treatment of Pompe disease. *Nature communications*, 8(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01263-3>
86. Rzedowski J, De Rzedowski G. (2001). Tres especies mexicanas de *Lobelia* (*Campanulaceae*, *Lobelioideae*), una redescubierta y dos nuevas. *Acta Bot. Mex.* 55, 29-38
87. Sairafianpour M, Bahreininejad B, Witt M, Ziegler HL, Jaroszewski JW, Stærk D. (2003). Terpenoids of *Salvia hydrangea*: two new, rearranged 20-norabietanes and the effect of oleanolic acid on erythrocyte membranes. *Planta Med.* 69(09): 846-850. DOI: 10.1055/s-2003-43212
88. Sanzana MG, Durruty P. (2016). Otros tipos específicos de diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2016.04.005>
89. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L., Rivera-Dommarco J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 171-172.
90. Skudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50, 537-546
91. Solares-Pascasio JI, Ceballos G, Calzada F, Barbosa E, Velazquez C. (2021). Antihyperglycemic and lipid profile effects of *Salvia amarissima* Ortega on streptozocin-induced type 2 diabetic mice. *Molecules*, 26(4), 947. <https://doi.org/10.3390/molecules26040947>
92. Standl E, Schnell O. (2012). Alpha-glucosidase inhibitors 2012—cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diab Vasc Dis Res*, 9(3), 163-169. <https://doi.org/10.1177/1479164112441524>

-
93. Šulniūtė V, Pukalskas A, Venskutonis PR. (2017). Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. *Food Chem.* 224, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.047>
94. Topçu G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69, 482–487. <https://doi.org/10.1021/np0600402>
95. Torres WPR, Juez AEM, González JLG, Barzola CVR, Vélez DGS, Torres DAR, Nájera RDM. (2018). Diabetes gestacional: fisiopatología, diagnóstico, tratamiento y nuevas perspectivas. *Arch. Venez. de Farmacol. y Ter.*, 37(3), 218-226.
96. Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, Thompson EE. (2015). Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications. *Ann Pharmacother*, 49(5), 540-556. <https://doi.org/10.1177/1060028014558289>
97. Valdés M, Calzada F, Mendieta-Wejebe JE, Merlín-Lucas V, Velázquez C, Barbosa E. (2020). Antihyperglycemic effects of *Annona diversifolia* safford and its acyclic terpenoids: α -glucosidase and selective SGLT1 inhibitors. *Molecules*, 25(15), 3361. <https://doi.org/10.3390/molecules25153361>
98. Valdés RE & Bencosme RN. (2010). Las complicaciones macrovasculares y su relación con algunas variables clínicas y bioquímicas en diabéticos tipo 2. *Revista Cubana de Endocrinología*, 21(3), 256-268.
99. Verma S, Rani R, Vashishth E, Basu K, Pant P, Padhi M. (2013). Simple, rapid and precise method for quality assessment of different parts of *Aegle marmelos* L. used in Indian system of medicine. *Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5, 236–243.
100. Villaseñor-Gómez LE, Gómez LEV. (2005). La biodiversidad en Michoacán, estudio de estado (No. 333.950972 B56
101. Vintimilla EPF, Giler YO, Motoche AKE, Ortega FJJ. (2019). Diabetes Mellitus Tipo 2: Incidencias, complicaciones y tratamientos actuales. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, 3(1), 26–37. [https://doi.org/10.26820/recimundo/3.\(1\).enero.2019.26-37](https://doi.org/10.26820/recimundo/3.(1).enero.2019.26-37)
102. Vuorela P, Leinonen M, Saikku P, Tammela P, Rauha JP, Wennberg T, Vuorela H. (2004). Natural products in the process of finding new drug candidates. *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1375-1389. <https://doi.org/10.2174/0929867043365116>
103. Wang L, Liu M, Yin F, Wang Y, Li X, Wu Y, Liu J. (2019). Trilobatin, a novel SGLT1/2 inhibitor, selectively induces the proliferation of human hepatoblastoma cells. *Molecules*, 24(18), 3390. <https://doi.org/10.3390/molecules24183390>
-

-
104. Wang M, Shao Y, Li J, Zhu N, Rangarajan M, LaVoie EJ, Ho CT. (1999). Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Natural Products*, 62(3), 454-456.
 105. World Health Organization. Classification of diabetes mellitus. (2019). Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 106. Yoshikawa T, Inoue R, Matsumoto M, Yajima T, Ushida K, Iwanaga T. (2011). Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2, and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem. Cell Biol.* 135, 183–194. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0779-1>
 107. Zarei A, Vaezi G, Malekirad AA, Abdollahi M. (2015). Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Salvia hydrangea* in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(4):417.
 108. Zolla C, Argueta A. (2009). Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Landsteiner Scientific, Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, Programa Universitario México Nación Multicultural, Universidad Nacional Autónoma de México, México, en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. Consultado el 15 de octubre de 2017.

Article

Antihyperglycemic Effects of *Salvia polystachya* Cav. and Its Terpenoids: α -Glucosidase and SGLT1 Inhibitors

Rocio Ortega ^{1,2,3,*}, Miguel Valdés ^{3,*}, Francisco J. Alarcón-Aguilar ⁴, Ángeles Fortis-Barrera ⁴, Elizabeth Barbosa ⁵, Claudia Velazquez ⁶ and Fernando Calzada ^{3,*}

- ¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, UAM-I, Mexico City CP 09340, Mexico
- ² Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Sección, Mexico City CP 09340, Mexico
- ³ Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, 2^o Piso CORSE Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Mexico City CP 06725, Mexico
- ⁴ Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, UAM-I, Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Sección, Mexico City CP 09340, Mexico; aaf@xanum.uam.mx (F.J.A.-A.); fortis11_10@yahoo.com.mx (Á.F.-B.)
- ⁵ Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, Mexico City CP 11340, Mexico; reb78@yahoo.com.mx
- ⁶ Área Académica de Farmacia, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Km 4.5, Carretera Pachuca-Tulancingo, Unidad Universitaria, Pachuca CP 42076, Mexico; cvg09@yahoo.com
- * Correspondence: rcortega@hotmail.com (R.O.); valdesguevaramiguel@gmail.com (M.V.); fernando.calzada@imss.gob.mx or fercalber10@gmail.com (F.C.); Tel.: +52-1-55-5627-6900 (ext. 21367) (R.O. & M.V. & F.C.)



Citation: Ortega, R.; Valdés, M.; Alarcón-Aguilar, F.J.; Fortis-Barrera, Á.; Barbosa, E.; Velazquez, C.; Calzada, F. Antihyperglycemic Effects of *Salvia polystachya* Cav. and Its Terpenoids: α -Glucosidase and SGLT1 Inhibitors. *Plants* **2022**, *11*, 575. <https://doi.org/10.3390/plants11050575>

Academic Editors: Stephen O. Amoo and Vanessa Steenkamp

Received: 5 January 2022
Accepted: 17 February 2022
Published: 22 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The antihyperglycemic activity of ethanolic extract from *Salvia polystachya* (EESpS) and its products was evaluated using in vivo, ex vivo and in silico assays; additionally, an acute toxicity assay was evaluated. EESpS was classified as a nontoxic class 5 drug. EESpS, ethyl acetate fraction (EtOAcFr), secondary-6-fraction (SeFr6), ursolic acid (UA), and oleanolic acid (OA) reduced the hyperglycemia in DM2 mice. α -glucosidase inhibition was evaluated with oral sucrose and starch tolerance tests (OSuTT and OSsTT), an intestinal sucrose hydrolysis (ISH) assay and molecular docking studies using acarbose as control. SGLT1 inhibition was evaluated with oral glucose and galactose tolerance tests (OGTT and OGaTT), an intestinal glucose absorption (IGA) assay and molecular docking studies using canagliflozin as the control. During the carbohydrate tolerance tests, all the treatments reduced the postprandial peak, similar to the control drugs. During the ISH, IC₅₀ values of 739.9 and 726.3 μ M for UA and OA, respectively, were calculated. During the IGA, IC₅₀ values of 966.6 and 849.3 for UA, OA respectively, were calculated. Finally, during the molecular docking studies, UA and OA showed Δ G values of -6.41 and -5.48 kcal/mol⁻¹, respectively, on α -glucosidase enzymes. During SGLT1, UA and OA showed Δ G values of -10.55 and -9.65 , respectively.

Keywords: *Salvia polystachya*; antihyperglycemic activity; α -glucosidase inhibitor; SGLT1 inhibitor; acute oral toxicity; docking analysis; ursolic acid; oleanolic acid; diabetes mellitus

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a serious chronic disease that occurs when there is no optimal use of insulin in the organism due to a lack of insulin production or because the organism cannot properly use the insulin that is produced due to insulin resistance [1,2]. This alteration in insulin production and utilization is reflected in an increase in the concentration of blood glucose, known as hyperglycemia [3]. There are several drug families that are used as a treatment for DM, and all drug families are classified according to their mechanism pathway. Drugs classified as secretagogues include sulfonylureas and meglitinides [4],

insulin sensitizers include biguanides and thiazolidinediones [5], and other drugs include glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogues [6], dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors [7], α -glucosidase [8,9], and SGLT inhibitors [10]. However, despite the therapeutic effect that is wanted after the administration of the treatments previously described, all of them have side effects such as hypoglycemia, gastrointestinal disorders, diarrhea, nausea, vomiting, abdominal discomfort, flatulence production, and urinary tract infection, among others [11]. One of the principal approaches for reducing postprandial hyperglycemia in the type 2 diabetes (T2D) population is the prevention of hydrolysis and the absorption of carbohydrates after food uptake. Therefore, the effective reduction of blood glucose levels after food uptake can be a key step in preventing or reversing diabetic complications and improving the life quality of T2D patients [12]. This reduction of hydrolysis and the absorption of carbohydrates can be reached with the inhibition of α -glucosidase and sodium–glucose cotransporter type 1 (SGLT1) enzymes [13]. In the first case, the α -glucosidase enzymes are located in the small bowel brush, and they degrade oligosaccharides such as sucrose and lactose to monosaccharides such as α -glucose by hydrolyzing the glycosidic bonds [14], delaying the absorption of carbohydrates since complex carbohydrates cannot be absorbed; thus, postprandial hyperglycemia can be delayed [14]. SGLT1 is highly expressed on the brush border membrane of enterocytes in the proximal part of the small intestine. It is responsible for glucose absorption. SGLT1 enzymes couple with the entrance of Na⁺ and glucose, facilitating the transport of glucose from the small intestine into the enterocyte; subsequently, the accumulated glucose in the enterocytes is mobilized out of them by glucose transport facilitating systems (GLUTs), and absorbed into the bloodstream [15]. Accordingly, both mechanisms of action are important points to take into account in the search for new molecules that help to reduce hyperglycemia in T2D patients.

One alternative which a major part of the population adopts is the use of medicinal plants; some of them are used for the treatment of several disorders and represent a potential source of valuable drugs in several pathologies, including T2D [16], a disease with the highest rates of prevalence and mortality worldwide [17,18]. Globally, the population uses medicinal plants to treat diabetes symptoms in an empirical way [19]. In this sense, several species of the Lamiaceae family have been proposed as α -glucosidase inhibitors, including *S. amarissima*, *S. urmiensis*, *S. miltiorrhiza*, *S. splendens*, *S. hypoleuca*, *S. fruticosa*, *S. syriaca*, *S. santolinifolia*, *S. moorcraftiana*, *S. limbata*, *S. atropatana*, *S. nemorosa*, and *S. multicaulis* [20–24]. Moreover, the diterpenes amarisolide, teotihuacanin, and amarissinins A and C are reported as the active principles in *S. amarissima* [25,26]. Moreover, in *S. reptans*, *S. microphylla* and *S. amarissima*, the presence of ursolic acid (UA), oleanolic acid (OA) and β -sitosterol [27–29] has been reported, which have shown significant inhibitory activity towards α -glucosidase [29].

The interest in the study of terpenes has increased because several authors have reported this kind of compound to have multiple biological attributes that can be useful for the treatment of several diseases; these biological attributes include antifungal, antibacterial, antiviral, antitumor, antiparasitic, anti-inflammatory, analgesic and hypoglycemic properties [30]. Considering the above, *Salvia polystachya* Cav. (Lamiaceae) is a herbaceous and perennial plant endemic to Mexico, known as “chía” [31,32]. It has been reported to have several properties, such as purgative, antipyretic, antimalarial, antihemorrhagic, and emollient effects, as well as having been reported as an effective treatment for heartburn and dysentery [33,34]. From the leaves, neo-clerodane diterpenes, such as polystachynes A–H, 15-epi-polystachine G, salvifiline A and C, 15-epi-salvifiline A, and linearolactone, and the flavone 3',5,6,7-tetrahydroxy-4'-methoxyflavone, were isolated [33,34]. Among these, the diterpene linearolactone exhibited antiprotozoal activity in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* [35]; moreover, polystachynes B and G, linearolactone and 15-epi-salvifiline A increased the gene expression of elastin and the type I, III, and V of collagens [36]. Although several species of the *Salvia* genus have been reported to have antidiabetic properties, there are no scientific reports that support *S. polystachya*'s effects on hyperglycemia yet. Thus, considering the chemotaxonomical criteria, the aim of our study was to explore the

potential antidiabetic effect of *S. polystachya* and its isolated products, as well to evaluate its effect as an α -glucosidase and SGLT1 inhibitor using activity-guided fractionation as a strategy, using in vivo, ex vivo and in silico assays.

2. Results

2.1. In Vivo Assays

2.1.1. Acute Oral Toxicity of the Ethanolic Extract of the Stems from *S. polystachya*

Acute oral toxicity assays of the extract from *S. polystachya* stems were performed according to Guideline 423 of the OECD [37]. It was found that 4 h after the administration of the treatments, the extract did not generate alterations in the animals. Moreover, EESpS did not generate mortality at the doses evaluated. At the end of the test (14 days), the surviving mice did not display body weight loss compared with normal mice (Table 1).

Table 1. Effect of the acute administration of ethanolic extract of the stems obtained from *S. polystachya* on the body weight and relative organ weight of normal female mice.

Group	Dose (mg/kg)	Pancreas (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Stomach (g)
Normal	-	0.8 ± 0.0	4.9 ± 0.1	1.2 ± 0.05	1.4 ± 0.1
EESpS	50	0.7 ± 0.0	4.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
	300	0.6 ± 0.1	5.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.5
	2000	0.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	1.2 ± 0.0	1.9 ± 0.5

Mean ± SEM of relative organ weight (g) of normal female mice ($n = 3$). (ANOVA followed by Dunnett post hoc test) vs. the normal group values. EESpS: ethanolic extract of the stem.

2.1.2. Acute Effect of Ethanolic Extract of Stems from *S. polystachya* and its Products over Glycemia in Normal and Diabetic Mice

Considering that EESpS did not show toxicity, the acute evaluation in diabetic mice was carried out. The doses selected were 50, 100, and 200 mg/kg⁻¹. The results showed that the dose with the best effect on hyperglycemia was 100 mg/kg⁻¹. This effect was similar to that observed in the groups treated with the control drugs acarbose and glibenclamide (Table 2). Acarbose, an α -glucosidase inhibitor, was used as the comparative control. In the case of glibenclamide, it was used to demonstrate pancreatic β -cell viability in streptozocin-induced diabetic mice in agreement with the T2D model.

Table 2. Acute effect of the ethanolic extract of stems from *S. polystachya* and its products over glycemia.

Group	Dose (mg/kg ⁻¹)	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
NM control	-	175.3 ± 1.4	174 ± 1.8	170.5 ± 2.6	172.8 ± 2	178.5 ± 1.7
DM control	-	302.5 ± 5.7	306 ± 3.7	309.4 ± 2.8	311.5 ± 1.5	294.8 ± 0.6
DM + EESpS	50	295.5 ± 5	310.3 ± 12	290.3 ± 14	300 ± 20	291.8 ± 1
DM + EESpS	100	301.8 ± 1	242.3 ± 0.6 *	258.3 ± 1.2 **	241.3 ± 0.8 ■	247.3 ± 0.3 ■■
DM + EESpS	200	303.3 ± 10	320.4 ± 7.3	307.8 ± 1.3	287 ± 9.5 ■	313.3 ± 3.5
DM + AqRFr	50	309 ± 2.6	268.4 ± 2.7	231.6 ± 3.4	218.8 ± 1	213.3 ± 7.9
DM + EtOAcFr	50	300 ± 4.8	249 ± 5.9 *	203.3 ± 1.8 **	213 ± 4.4 ■	187.5 ± 0.6 ■■
DM + SeFr6	50	293.5 ± 2.5	338.8 ± 2.2	386 ± 3.9	330.3 ± 4.2	259.3 ± 5.1 ■■
DM + Oleanolic acid	50	283.2 ± 5.2	302 ± 11.4	302 ± 7.2	239.4 ± 3.1 ■	252.8 ± 2.9 ■■
DM + Ursolic acid	50	268.7 ± 4	220.8 ± 5.9 *	239 ± 6.6 **	259.2 ± 4 ■	236 ± 5.5 ■■
DM + Acarbose	50	308.7 ± 1.6	236.8 ± 2.3 *	237.8 ± 3.4 **	249 ± 1.5 ■	225 ± 2.5 ■■
DM + Glibenclamide	50	307.6 ± 1.8	243.5 ± 6.2 *	247.8 ± 5.4 **	268 ± 1.9 ■	292 ± 2.3 ■■

Blood glucose levels, mean ± SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. DM control 30 min; ** $p > 0.05$ significantly different vs. DM control 60 min; ■ $p > 0.05$ significantly different vs. DM control 90 min; ■■ $p > 0.05$ significantly different vs. DM control 120 min (ANOVA followed by Dunnett post hoc test). GLIB: glibenclamide; ACAR: acarbose; EESpS: ethanolic extract of the stem from *S. polystachya*.

Once its activity over hyperglycemia was demonstrated, EESpS was subjected to partition, obtaining two fractions, AqRFr and EtOAcFr, which were also evaluated in diabetic mice (Table 2). Both fractions significantly reduced blood glucose from 30 to

120 min; this activity was similar to that of the control drug, acarbose. Nevertheless, EtOAcFr was selected to continue the study because its effect on hyperglycemia was slightly greater compared with the observed effect in AqRFr.

EtOAcFr was subjected to secondary fractionation using column chromatography; ten secondary fractions (SeFr1–SeFr10) were obtained, and they were evaluated in diabetic mice. The secondary fraction SeFr6 was the only one with a significant effect on the hyperglycemic values at 120 min (Table 2). SeFr6 was compared with 42 standard compounds of different polarities including polystachynes A, B, and D, as well as linearolactone, which was previously isolated from *S. polystachya* [35]. The analysis of SeFr6 was performed using high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), and the standards of the ursolic acid and oleanolic acid were used. Figure 1 shows the HPLC chromatograms of EtOAcFr, SeFr6, UA and OA. The complete analysis of the chromatogram of SeFr6 (Figure 1a) showed the presence of UA at 8.008 min (17.26%) and OA at 8.366 min (47.28%); these were compared with the chromatograms of UA and OA standards (Figure 1c and 1d, respectively).

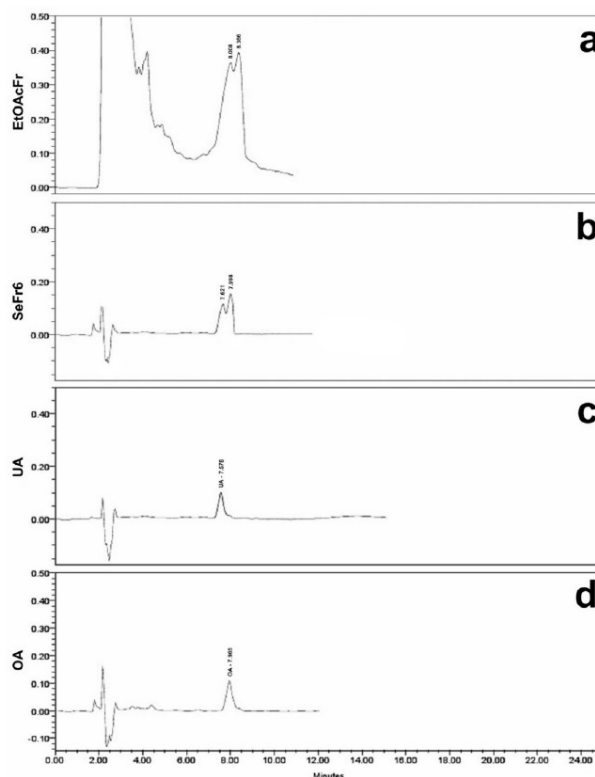


Figure 1. HPLC-DAD chromatograms of EtOAcFr (a), SeFr6 (b), UA (c) and OA (d) standard.

The compounds identified, UA and OA, were evaluated in diabetic mice (Table 2). OA significantly decreased the blood glucose levels after 90 min, until 120 min. In the case of UA, this compound significantly decreased blood glucose levels after 30 min, until 120 min; this effect was similar to glibenclamide.

2.1.3. Oral Sucrose and Starch Tolerance Tests of the Products Obtained from Stems from *S. polystachya*

During the OSuTT assay, all the treatments reduced the postprandial glucose peak. It is important to mention that EESpS, EtOAcFr (Figure 2A), OA, and UA (Figure 2B) significantly reduced the hyperglycemia peak observed 30 min after the sucrose load, with percentages of the inhibition of the peak of 30.6, 47.8, 29.8 and 30.7%, respectively. The activity demonstrated by the products obtained from the stems of *S. polystachya* was less than the activity observed after the administration of the control drug acarbose, an α -glucosidase inhibitor, which significantly reduced the postprandial peak with 100% inhibition at 30 min.

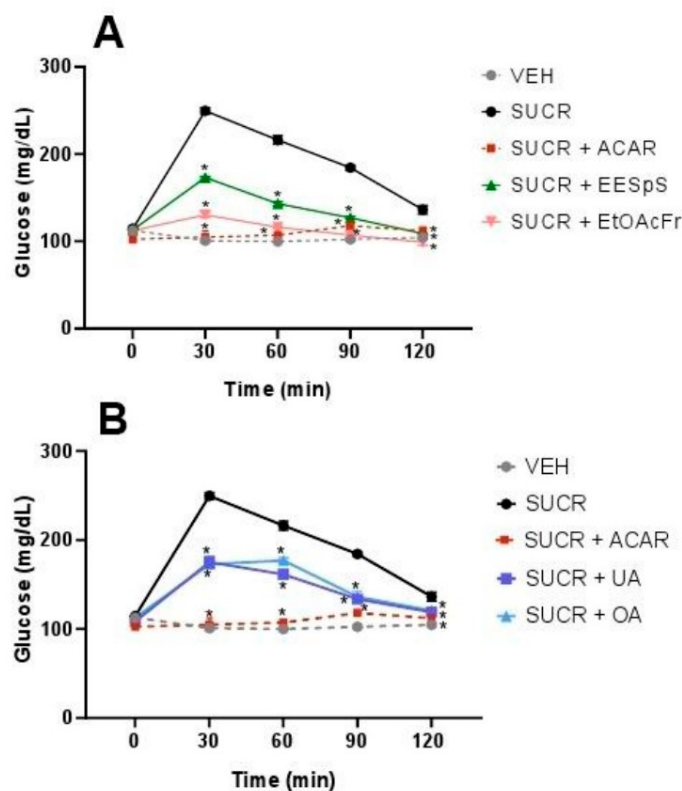


Figure 2. Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* in oral sucrose tolerance test (OSuTT). (A) OSuTT of groups treated with sucrose, acarbose, EESpS and EtOAcFr, as well as vehicle. (B) OSuTT of groups treated with sucrose, acarbose, UA and OA, as well as vehicle. Results shown as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. sucrose group values at the same time. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; SUCR: sucrose; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid.

In OSuTT, a similar effect to OSuTT was observed. EESpS significantly reduced the postprandial peak during the assay with a 32.9% reduction at 30 min. In the case of EtOAcFr, there was only a significant reduction at 30 min with a 13.6% reduction (Figure 3A), in comparison with the starch group. When UA and OA were administered, a significant

reduction in the postprandial peak was observed during all the assays with a 32.6 and 36% reduction at 30 min, respectively. The control drug, acarbose, also reduced the postprandial peak, with a 25.9% reduction at 30 min. It is important to mention that UA and OA showed a greater inhibitory effect than the control drug at 30 min (Figure 3B).

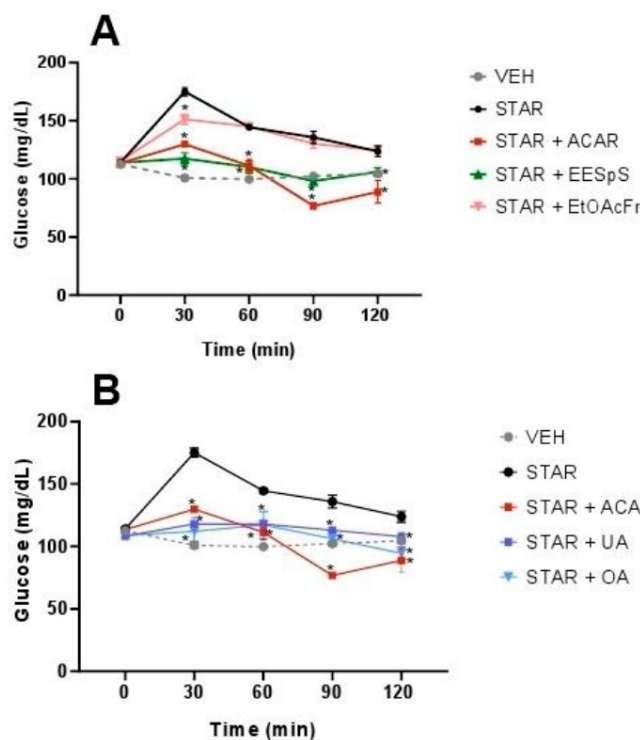


Figure 3. Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* in oral starch tolerance test (OSITT). (A) OSITT of groups treated with starch, acarbose, EESpS and EtOAcFr, as well as vehicle. (B) OSITT of groups treated with starch, acarbose, UA and OA, as well as vehicle. Results shown as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. starch group values at the same time. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; STAR: starch; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid.

2.1.4. Oral Glucose and Galactose Tolerance Tests of the Products Obtained from Stems from *S. polystachya*

EESpS, EtOAcFr, UA and OA were evaluated in oral glucose (OGTT) and galactose (OGaTT) tolerance tests, using canagliflozin, an inhibitor of SGLT1/2 cotransporters, as a control drug. EESpS and EtOAcFr significantly reduced the glucose postprandial peak at 30 min. Their effect was similar to what was observed in the control drug canagliflozin (Figure 4A). When UA and OA were tested in OGTT, a significant reduction in the postprandial peak at 30 min in comparison with the glucose group was observed. However, this effect was lower than what was observed after the administration of canagliflozin (Figure 4B).

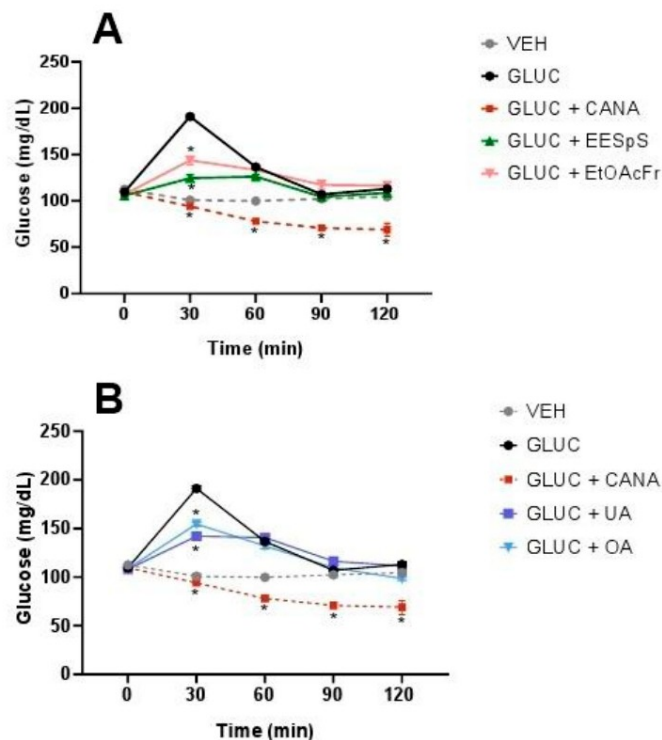


Figure 4. Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* in oral glucose tolerance test (OGTT). (A) OGTT of groups treated with glucose, acarbose, EESpS and EtOAcFr, as well as vehicle. (B) OGTT of groups treated with glucose, acarbose, UA and OA, as well as vehicle. Results shown as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. glucose group values at the same time. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; GLUC: glucose; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid.

When the OGaTT was performed, the group treated with this carbohydrate showed a postprandial peak from 30 min and until the end of assay. The groups treated with EESpS and EtOAcFr showed a significant reduction in the postprandial peak from 60 min until the end of the assay (Figure 5A). Additionally, UA and OA significantly reduced the postprandial peak from 60 min until the end of the assay (Figure 5B). In all the treatments, the effects observed were less than the group treated with canagliflozin.

Once evaluated, the products in the in vivo assays were evaluated in ex vivo assays in order to determine if the antidiabetic activity was related to a reduction in intestinal sucrose hydrolysis as well as intestinal glucose absorption.

2.2. Ex Vivo Assays

2.2.1. Inhibition of Intestinal Sucrose Hydrolysis of the Products Obtained from the Stems from *S. polystachya*

After the addition of the treatments in the intestine portions, the EESpS, EtOAcFr and UA showed a significant reduction in the glucose absorbed at concentrations of 200, 400 and 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculated at 734.3, 573.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and 739.9 μM , respectively. When OA was evaluated, it showed a significant

reduction in glucose absorbed at 400 and 800 μM with an IC_{50} of 726.3 μM . Finally, acarbose showed a significant reduction in glucose absorbed at 200, 400 and 800 μM , and the IC_{50} calculated was 173 μM (Table 3).

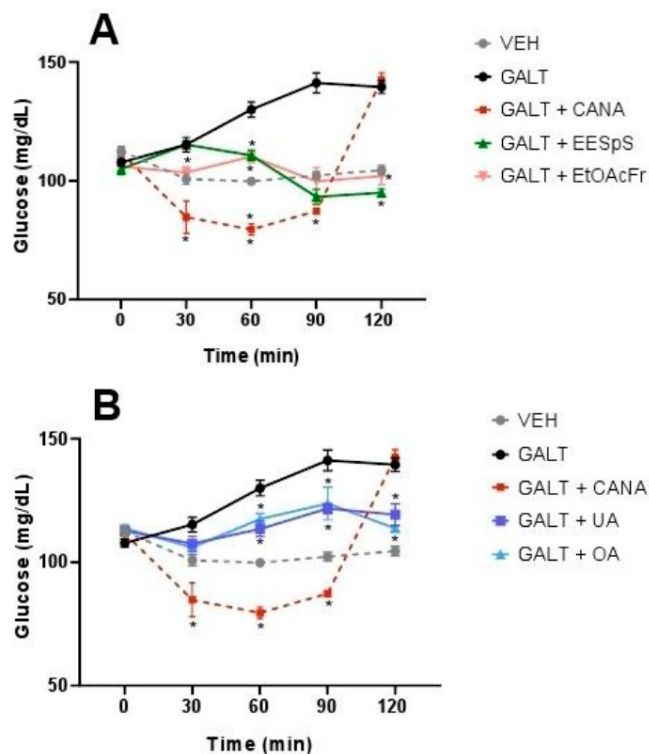


Figure 5. Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* in oral glucose tolerance test (OGaTT). (A) OGaTT of groups treated with galactose, acarbose, EESpS and EtOAcFr, as well as vehicle. (B) OGaTT of groups treated with galactose, acarbose, UA and OA, as well as vehicle. Results shown as mean \pm SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. galactose group values at the same time. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; GALT: galactose; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid.

2.2.2. Inhibition of Intestinal Glucose Absorption of the Products Obtained from the Stems from *S. polystachya*

When the treatments were added to the intestine portions in IGA, the EESpS significantly reduced the quantity of glucose absorbed at 400 and 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a calculated IC_{50} of 1536.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the case of EtOAcFr, it showed a significant reduction in the glucose absorbed at concentrations of 200, 400 and 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a calculated IC_{50} of 697.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the case of ursolic acid, it showed a significant reduction in glucose absorbed at 400 and 800 μM with an IC_{50} of 966.6 μM . The oleanolic acid showed a significant reduction in glucose absorbed at 200, 400 and 800 μM , and the IC_{50} values calculated were 849.3 and 834.5 μM , respectively. Finally, canagliflozin showed a significant reduction in glucose absorbed at 400 and 800 μM , with a calculated IC_{50} of 834.5 μM (Table 4).

Table 3. Quantity of glucose measured in the external aqueous medium, percent inhibition, and CE₅₀ calculated after addition of treatments on intestinal sucrose hydrolysis (ISH) inhibition test.

Treatment	Glucose (mg/dL ⁻¹)	Glucose (mg/dL ⁻¹)	% of Inhibition	IC ₅₀
	0 h	2 h	2 h	
Sucrose (15%)	0 ± 0	90.6 ± 5.8	-	-
EESpS [200 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	71.6 ± 1.6 *	20.8 ± 1.8	734.3 µg/mL ⁻¹
EESpS [400 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	55 ± 2 *	39.2 ± 2.2	
EESpS [800 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	44 ± 1.8 *	51.4 ± 2	
EtOAcFr [200 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	65.6 ± 1.2 *	27.5 ± 1.3	573.5 µg/mL ⁻¹
EtOAcFr [400 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	51 ± 1.4 *	43.7 ± 1.6	
EtOAcFr [800 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	35 ± 1.7 *	61.3 ± 1.8	
UA [200 µM]	0 ± 0	59.3 ± 1.8 *	34.5 ± 2	739.9 µM
UA [400 µM]	0 ± 0	48.3 ± 1.2 *	46.6 ± 1.3	
UA [800 µM]	0 ± 0	45.3 ± 1.9 *	49.9 ± 2.1	
OA [200 µM]	0 ± 0	87 ± 3.9	3.9 ± 1.6	726.3 µM
OA [400 µM]	0 ± 0	77.3 ± 1.2 *	14.6 ± 1.3	
OA [800 µM]	0 ± 0	50 ± 3.6 *	44.8 ± 4	
Acarbose [200 µM]	0 ± 0	38.2 ± 1.22 *	57.8 ± 1.3	173 µM
Acarbose [400 µM]	0 ± 0	13.1 ± 0.75 *	85.5 ± 0.8	
Acarbose [800 µM]	0 ± 0	7 ± 0.4 *	96.7 ± 0.18	

Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* on intestinal sucrose hydrolysis (ISH) inhibition test. Results shown as mean ± SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ significantly different vs. sucrose group values. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

Table 4. Quantity of glucose measured in the external aqueous medium, percent inhibition, and CE₅₀ calculated after addition of treatments on intestinal glucose absorption (IGA) inhibition test.

Treatment	Glucose (mg/dL ⁻¹)	Glucose (mg/dL ⁻¹)	% Of Inhibition	IC ₅₀
	0 h	1 h	1 h	
Glucose (5%)	0 ± 0	217.3 ± 6.1	-	-
EESpS [200 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	216 ± 8.1	0.5 ± 3.7	1536.3 µg/mL
EESpS [400 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	192.5 ± 3.7 *	11.4 ± 1.4	
EESpS [800 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	167.7 ± 9 *	22.8 ± 4.1	
EtOAcFr [200 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	175.3 ± 19 *	19.3 ± 8.7	697.3 µg/mL
EtOAcFr [400 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	162.7 ± 1.8 *	25.1 ± 0.8	
EtOAcFr [800 µg/mL ⁻¹]	0 ± 0	176.5 ± 7.1 *	18.7 ± 7.7	
UA [200 µM]	0 ± 0	270 ± 31.3	0	966.6 µM
UA [400 µM]	0 ± 0	188.3 ± 4 *	13.3 ± 1.8	
UA [800 µM]	0 ± 0	132.3 ± 5.3 *	39.1 ± 2.4	
OA [200 µM]	0 ± 0	189.3 ± 4 *	12.8 ± 1.8	849.3 µM
OA [400 µM]	0 ± 0	132.3 ± 2.2 *	39.1 ± 1	
OA [800 µM]	0 ± 0	121 ± 6.5 *	44.3 ± 3	
Canagliflozin [200 µM]	0 ± 0	230 ± 13.3	0	834.5 µM
Canagliflozin [400 µM]	0 ± 0	113.5 ± 7.4 *	49 ± 3.1	
Canagliflozin [800 µM]	0 ± 0	124 ± 5.7 *	40.5 ± 1.3	

Effect of products obtained from the stems from *S. polystachya* on intestinal glucose absorption (IGA) inhibition test. Results shown as mean ± SEM ($n = 6$). * $p > 0.05$ Significantly different vs. glucose group values. (Two-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test) ACAR: acarbose; EESpS: ethanolic extract of stem; EtOAcFr: ethyl acetate fraction; UA: ursolic acid and OA: oleanolic acid; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

The results obtained are according to the in vivo OSuTT, OStTT, OGTT and OGaTT evaluations of oleanolic acid and ursolic acid that suggest the inhibition of the a-glucosidase enzymes and also a reduction in the glucose absorption mediated by the inhibition of SGLT-1. Additionally, in silico studies were carried out in order to give additional support to the previous in vivo and ex vivo results.

2.3. In Silico Assays

2.3.1. Molecular Docking Studies of Ursolic Acid (UA), Oleanolic Acid (OA) and Acarbose on α -Glucosidase Enzyme

In order to show the possible interaction of UA and OA, a molecular docking study was carried out using as a target the α -glucosidase enzyme, which is involved in the control of complex carbohydrate hydrolysis (the crystal structure of human lysosomal acid- α -glucosidase was used: RCSB, PDB ID: 5NN8). Moreover, acarbose was used as a control, and its binding site was compared with the UA and OA binding sites.

According to the results obtained, OA showed a greater affinity than UA to the binding site, with ΔG values of -6.41 kcal·mol $^{-1}$ and -5.48 kcal·mol $^{-1}$, respectively. OA and UA showed they had one polar interaction with each ligand, OA with Leu677, and UA with Asp518 residues (Table 5). In the case of acarbose, it showed the best affinity to the α -glucosidase enzyme, with a ΔG value of -8.33 kcal·mol $^{-1}$. Moreover, this ligand showed eight polar interactions with Arg281, Asp282, Ala284, Arg600, Asp616, Gly651, Ser676 and Leu678. It is important to mention that the three ligands showed the same binding pocket; in the case of OA and acarbose, it showed a similar binding position. In the case of UA, this ligand binds in a different position than OA and acarbose (Figure 6).

Table 5. Interactions of oleanolic acid (OA), ursolic acid (UA) acarbose and canagliflozin with residues on the binding sites of α -glucosidase and SGLT1 enzymes.

Compound	ΔG (kcal·mol $^{-1}$)	α -Glucosidase			SGLT1			
		H-BR	NPI	RMSD	ΔG (kcal·mol $^{-1}$)	H-BR	NPI	RMSD
Oleanolic acid	-6.41	Leu677	Asp282, Met519, Phe525, Leu650, Gly651, Ser676, Leu678	-	-10.55	Gln451	Gly272, Ala447, Gln448, Ser449, Asp454, Tyr455, Glu503, Thr508, Cys522, Gly523, Val524, His525, Tyr526	-
Ursolic acid	-5.48	Asp518	Trp376, Trp481, Met519, Asp616, Phe649, Leu650, His674	-	-9.65	Gln451, Gly523	Asp273, Ala447, Gln448, Ser449, Asp454, Tyr455, Ser458, Thr508, Cys522	-
Acarbose	-8.33	Arg281, Asp282, Ala284, Arg600, Asp616, Gly651, Ser676, Leu678	Met519, Trp618, Leu650	1.87	-	-	-	-
Canagliflozin	-	-	-	-	-11.04	Met283, Thr287, Tyr290, Trp291, Gln 457	Asn78, His83, Phe101	1.44

ΔG : Binding energy (kcal/mol $^{-1}$); H-BR: H-binding residues; NPI: nonpolar interactions; Asp: aspartate; Asn: asparagine; Arg: arginine; Gln: glutamine; Lys: lysine; Thr: threonine; Ser: serine; Trp: tryptophan; Leu: leucine; His: histidine; Gly: glycine; Glu: glutamic acid; Ile: isoleucine; Tyr: tyrosine; Phe: phenylalanine.

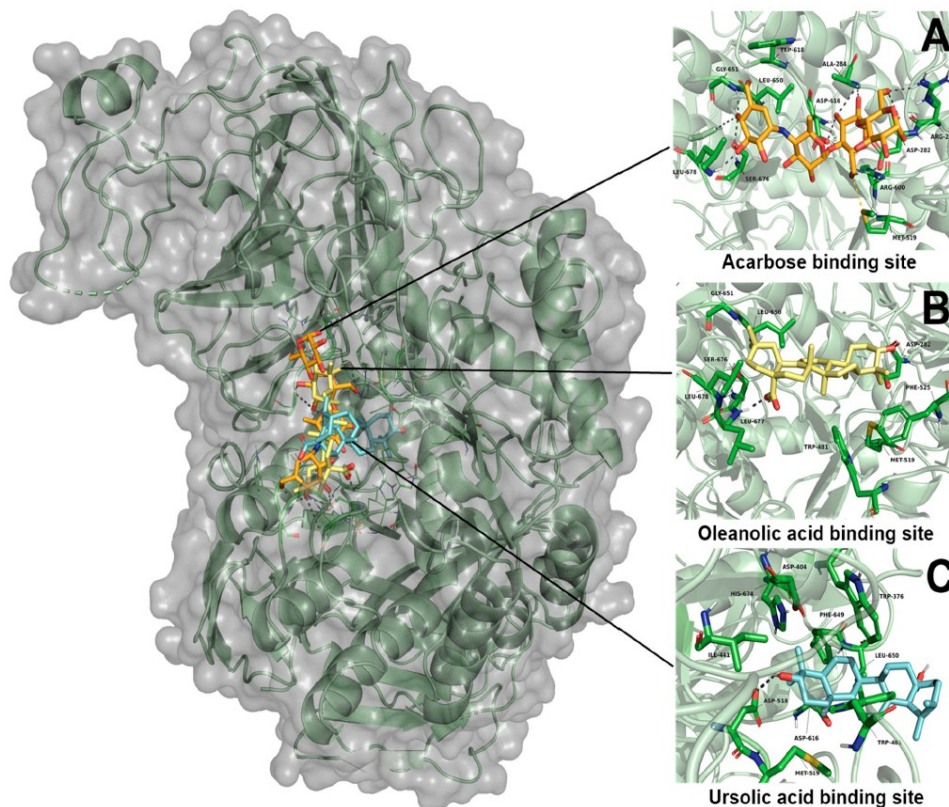


Figure 6. Results of molecular docking on α -glucosidase enzyme. (A) Interaction of acarbose and its binding site position; (B) interaction of oleanolic acid and its binding site position; (C) interaction of ursolic acid and its binding site position.

2.3.2. Molecular Docking Studies of Ursolic Acid (UA), Oleanolic Acid (OA) and Canagliflozin on SGLT1 Cotransporter

The second molecular docking study was carried out using the SGLT1 cotransporter as a target. SGLT1 is involved in the control of glucose absorption (the crystal structure of human sodium/glucose cotransporter, UniProt ID: P13866). Canagliflozin was used as a control in order to compare the binding site with UA and OA.

UA showed an affinity in a different site than canagliflozin (Figure 7), with a ΔG of $-9.65 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The interaction of UA with this binding site showed two polar interactions with Gln451 and Gly523. In the case of OA, this ligand showed the same binding position as UA. Additionally, OA had a ΔG of $-10.55 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ with only one polar interaction with Gln 451. On the other hand, canagliflozin showed the best affinity to SGLT1 with a ΔG of $-11.04 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; this ligand showed five polar interactions with Met283, Thr287, Tyr290, Trp291 and Gln 457 (Table 5).

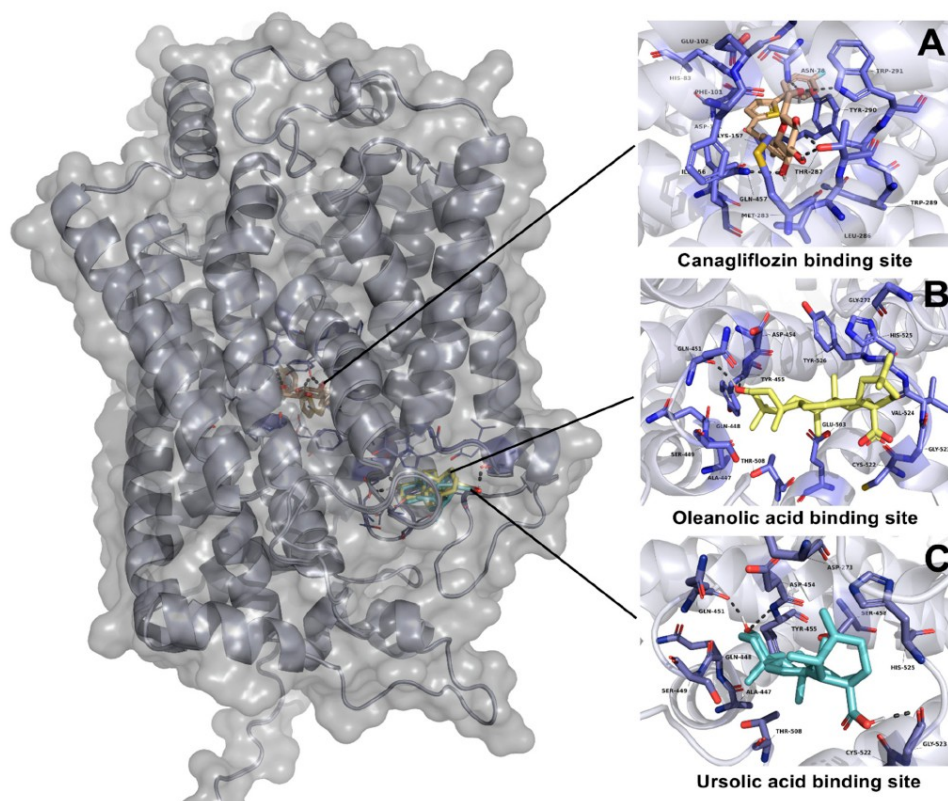


Figure 7. Results of molecular docking on SGLT1 cotransporter. (A) Interaction of canagliflozin and its binding site position; (B) interaction of oleanolic acid and its binding site position; (C) interaction of ursolic acid and its binding site position.

3. Discussion

Several species from the Lamiaceae family have been proposed to have an antidiabetic effect, ursolic acid, oleanolic acid and β -sitosterol being the products related with this activity [25,26]. In the case of ursolic acid and oleanolic acid, they have been described as potential α -glucosidase inhibitors using in vitro and in silico experiments [29]. Considering the above and taking into account the constant need for the development of new drugs to treat the hyperglycemia caused by diabetes mellitus, the potential antidiabetic effect of *S. polystachya* (a species that belongs to the Lamiaceae family) was evaluated, in consideration of a chemotaxonomic criterion. The evaluation of the ethanolic extract obtained from the stems of *S. polystachya* was carried out using activity-guided fractionation as a strategy, with in vivo, ex vivo and in silico assays.

Initially, the toxicological study (according to the OCDE's Guideline 423) of the extract obtained was carried out, and the results showed that the ethanolic extract of the stem from *S. polystachya* did not cause behavior alterations, visible tissue damage, modifications in the body or organ weight. According to the Globally Harmonized Classification System for chemical substances and mixtures (GSH) adopted by the OECD [37], the extract is classified as a nontoxic class 5 drug, and is considered a nontoxic substance [37].

Once the toxicity of our sample was evaluated, the evaluation in diabetic mice was carried out. The experimental diabetes mellitus type 2 (DM2) was induced using the streptozocin–nicotinamide (STZ–NA) model [13]. The administration of STZ–NA induces diabetes due to selective pancreatic β -cell cytotoxicity by STZ [38,39], followed by β -cell protection generated by the administration of NA [40]. Finally, the model results in a partial inhibition of insulin secretion [41]. Therefore, the NA–STZ-induced diabetes model is characterized by hyperglycemia and glucose intolerance, such as in T2D. It is a valuable model for the study of potential antidiabetic drugs, including medicinal plants [23,27,42]. The administration of the extract from the stems from *S. polystachya* (EESpS) generated a significant reduction in hyperglycemia in the animals with experimental DM2. These results are similar to those reported in other vegetal species from the Lamiaceae family [25–30], where the authors describe the diminution of hyperglycemia after a single administration of ethanolic extracts from the leaves of other Lamiaceae species. Moreover, in some studies, a subchronic administration of extracts results in an adequate control of hyperglycemia accompanied by a reduction in the glycated hemoglobin percentage [20].

EESpS was fractionated and the obtained fractions were also evaluated in diabetic mice, with the result that EtOAcFr significantly reduced the hyperglycemia in the DM2 model. Thus, this fraction was submitted to a secondary fractionation resulting in ten secondary fractions, of which SeFr6 was the most active. To identify the compounds responsible for the observed effects of the *S. polystachya* stem extract, a phytochemical screening from EtOAcFr was performed. HPLC–diode array detection (DAD) allowed us to determine the presence of ursolic and oleanolic acid, two terpenoids that have been described as α -glucosidase inhibitors in in vitro and in silico diabetic models [29]. In this sense, 42 terpenoids previously reported in *Salvia* species were checked in EtOAcFr and SeFr6, including polystachynes A, B, and D, as well as linearolactone, which was previously isolated from *S. polystachya* [35]; however, only the presence of ursolic acid and oleanolic acid (UA and OA, respectively) was identified. It is important to mention that the isolation of UA and OA in this vegetal species has not been reported yet. When these products were evaluated in the DM2 model, they showed significant reductions in blood glucose levels. Some authors have reported that UA acted as an effective insulin mimetic and as an insulin sensitizer [43], increasing insulin vesicle translocation, insulin secretion and augmented glycogen content [44]. Based on these reports, the effect observed in EESpS could be partially explained. To continue the study, the reduction of complex carbohydrate hydrolysis and the absorption of simple carbohydrates mediated by α -glucosidases and SGLT1, respectively were addressed.

The α -glucosidase inhibitors can delay the liberation of glucose from dietary complex carbohydrates, retarding glucose absorption and lowering the postprandial blood glucose peak [45]. In the present research, the α -glucosidase inhibitory effect was studied using oral sucrose and starch tolerance tests (OSuTT and OstTT, respectively). In these assays, the postprandial glucose peak after the complex carbohydrate load was measured to determine the possible inhibition of these enzymes which are involved in the hydrolysis of different types of glycosidic bonds (sucrose: α -1,2; starch: α -1,4) then EESpS EtOAcFr. UA and OA significantly reduced the postprandial peak after sucrose or starch administration, possibly due to an inhibitory effect on α -glucosidase, preventing hyperglycemia. However, to corroborate the results obtained, ex vivo and in silico studies were carried out.

The second mechanism of action evaluated was that of the type 1 inhibitor of sodium–glucose cotransporters (SGLT). These cotransporters are part of a subgroup of the solute carrier group (SLC5), which includes six members that differ in their preferences for sugar binding, and all the members of this family use the electromechanical gradient of sodium to transport sugar molecules against a chemical gradient into cells. Among the most studied of the SLC5 family, SGLT1 and 2 are highlighted. SGLT2 is expressed mostly in early renal proximal tubules and is responsible for >90% of the renal reabsorption of filtered glucose (160–180 g/day) and SGLT1 plays an important role in glucose absorption from the intestinal lumen into the epithelial cells of the small intestine [46]. In order to determine the

effect of the products isolated from the stems of *S. polystachya*, oral glucose and galactose tolerance tests were carried out (OGTT and OGaTT, respectively) with the objective of determining whether the treatments inhibited the SGLT1 expressed in the membrane of enterocytes, which are responsible for mediating intestinal glucose absorption [47–49]. It is possible that the reduction of the postprandial peak after the carbohydrate load observed in EESpS, EtOAcFr, UA and OA treatments works in conjunction with the inhibition of α -glucosidases shown in the previous assays. Moreover, in the case of EESpS and EtOAcFr, one or more compounds might inhibit some of the glucose transporters involved in its absorption, with UA and OA being partly responsible for the effects observed. Additional studies to identify other compounds and determine their possible synergic action are mandatory. These results support that *S. polystachya* contains compounds with the capacity to inhibit α -glucosidases.

The next step was conducting the ex vivo assays. These studies were carried out with the objective of corroborating the activity demonstrated in the in vivo assays. First, in the intestinal sucrose hydrolysis assay (ISH), all the products significantly reduced the quantity of glucose in the aqueous external medium. This can be interpreted as a possible inhibition of the α -glucosidases present in the portion of intestine used. The IC₅₀ calculated in all the treatments showed the potential inhibitory effect of the hydrolysis of complex carbohydrates mediated by α -glucosidases. Despite acarbose showing a minor IC₅₀ value, the results shown by the products isolated from the stems of *S. polystachya* are important. Authors describe that UA and OA isolated from *Salvia africana-lutea* exhibited promising α -glucosidase inhibitory activity, and the inhibition kinetic analysis showed IC₅₀ values in the range of 24.7–188.7 μ M compared to 945.5 μ M for acarbose. It has been proposed that the presence of a methyl group at the C-19 position had a positive effect on the inhibitory activity of UA [50].

The absorption of simple carbohydrates was evaluated with the intestinal glucose absorption assay (IGA). After the addition, all the products showed a significant reduction in the total glucose absorbed. This result corroborates the activity observed in OGTT and OGaTT. In regard to the IC₅₀ obtained for all the treatments, UA and OA (966.6 and 849.3 μ M, respectively) were similar to the IC₅₀ obtained with the control drug canagliflozin (834.5 μ M). The in vivo and ex vivo results suggest that the antihyperglycemic activity observed after the administration of the products obtained from the stems of *S. polystachya* can be mediated by the inhibition of the hydrolysis of complex carbohydrates and the absorption of simple carbohydrates.

Finally, in silico studies were carried out with the objective of determining the possible binding site of UA and OA in the α -glucosidases and SGLT1 cotransporter. In the case of the enzyme α -glucosidase, UA showed a Δ G value of -5.48 kcal·mol⁻¹; moreover, this product shares some binding amino acid residues (Asp616 and Leu650) with acarbose. Despite the binding position not being the same (Figure 6), this position may help to avoid α -glucosidase activity. Perhaps, as some authors describe, the methyl group at the C-19 position could be involved in the binding position [50]. Molecular dynamic studies need to be carried out to observe if this binding position avoids the interaction between sucrose and the α -glucosidase enzyme. In the case of OA, it showed a Δ G of -6.41 kcal·mol⁻¹, and shares six binding amino acid residues (Asp282, Met519, Leu650, Gly651, Ser676 and Leu678) with acarbose. It is important to mention that the binding position is very similar to acarbose. This may explain the results obtained during the in vivo OSTT and OSTTT and the ex vivo ISH assays, where OA reduced the postprandial peak of glucose, and also reduced the quantity of glucose absorbed in ISH with a lower CE₅₀ (726.3 μ M) than that obtained in UA (739.9 μ M).

In regard to molecular docking studies with SGLT1, UA (Δ G of -9.65 kcal·mol⁻¹) and OA (Δ G of -10.51 kcal·mol⁻¹), each showed important binding values; however, the binding position was not similar to that obtained in the molecular docking of canagliflozin (Δ G of -11.04 kcal·mol⁻¹), which was shown to bind in a different place in the SGLT1 cotransporter. According to the results obtained during the in vivo and ex vivo studies, AU

and OA reduced the postprandial peak of glucose in OGTT and OGaTT, and also showed an important CE_{50} (966.6 and 849.3 μ M, respectively). There is the possibility that they inhibit the SGLT1 activity in an allosteric site. However, the next step of the investigation is to perform molecular dynamic studies accompanied by enzyme inhibition studies in order to confirm the results obtained.

UA and OA are pentacyclic triterpenoids, isomers that differ in the position of a methyl residue connected to the C-19 or C-20 in the E ring. These modifications result in different pentacyclic triterpenes; the former is oleanane, whereas the latter is ursane [51,52]. These compounds naturally occur in many species of plants; in particular, they have been reported in some plants of the *Salvia* genus. The OA from the *S. moorcraftiana* has been reported to have the potential to reduce hyperglycemia and the complications of diabetes [23,31,53,54], and have great permeability in the small bowel [55–58], which were proposed as α -glucosidase inhibitors [59–62]. The present study demonstrates for the first time the isolation of UA and OA in *S. polystachya*. In addition, this study evaluates their antihyperglycemic activity with a possible dual inhibitory activity effect over α -glucosidase enzymes and the SGLT1 cotransporter.

4. Materials and Methods

4.1. General Information

Ethanol anhydrous (CC:15568604) and ethyl acetate (CC:10382681) were purchased from J.T. Baker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Streptozotocin ($\geq 75\%$ α -anomer basis, PN: S0130-5G), nicotinamide ($\geq 99.5\%$, PN: 47865-U), ursolic acid ($\geq 90\%$, PN: U6753-500MG), oleanolic acid ($\geq 97\%$, PN: O5504-500MG), sucrose ($\geq 99.5\%$ GC, PN: S9378-1Kg), acetonitrile HPLC gradient grade (≥ 99.9 , PN: 34851-1L) and ethanol HPLC gradient grade (100%, PN: 459828-1L) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA). Acarbose (Glucobay, tablets of 50 mg, Bayer Mexico S.A. DE C.V.), canagliflozin (Invokana, tablets of 300 mg, Janssen-Ortho LLC, Puerto Rico) and glibenclamide (Glibenclamide, tablets of 5 mg, Silanes, Mexico) were purchased from the local pharmacy. Buffer solution (citric acid/sodium hydroxide/hydrogen chloride, pH 4.00, CC: 109445). Saline solution 0.9% (solution 1000 mL) and DX-5 glucose solution 5% (solution 500 mL) were purchased from PISA Pharmaceuticals (Pisa, Mexico City, Mexico).

4.2. Plant Material

S. polystachya stems were collected in San Gregorio Atlapulco, Xochimilco (19° 14' 9.919" N 99° 2' 53.879" W), Mexico City, Mexico. The plant was identified by the M.Sc. Santiago Xolalpa in the Herbarium of the Mexican Institute of Social Security (IMSSM-Herbarium), with voucher specimen number 16386. The sample was cleaned and air-dried at ambient temperature, and finally, the dried samples were ground using a laboratory grinder (model M-22-RW, Fundición Torrey, Apodaca, Nuevo León, México).

4.3. Preparation of Ethanolic Extracts, Fractionation, and Characterization of Ursolic and Oleanolic Acid

The stems (695.1 g) from *S. polystachya* were extracted with EtOH (6 L \times 3) for one week, and filtered (Whatman No.1). The extract filtered was evaporated to dryness using a rotary evaporator at 35 °C (Buchi, Flawil, Switzerland), to obtain 16.9 g of ethanolic extract from stems (EESpS, 2.4% yield); this was subjected to biological assays. Once the antihyperglycemic activity of EESpS was examined, it was submitted for partitioning. Briefly, a portion of EESpS (50 g) was suspended in 10% EtOH–water (100 mL) and successively partitioned with EtOAc (150 mL \times 2) to obtain 19.8 g of EtOAc fraction (EtOAcFr). The aqueous residual layer was collected to obtain 28.9 g of aqueous residual fraction (AqRFR).

The antihyperglycemic activity was associated with EtOAcFr, then a portion (450 mg) was submitted for separation by open column chromatography (2 cm \times 34.5 cm), packed with silica gel 60 (70–230 mesh), and eluted with solvents of crescent polarity: hexane, hexane/ethyl acetate, and ethyl acetate/methanol. Ten secondary fractions were obtained:

SeFr1 (26.9 mg), SeFr2 (13.1 mg), SeFr3 (218 mg), SeFr4 (57.4 mg), SeFr5 (128.4 mg), SeFr6 (194.9 mg), SeFr7 (49.4 mg), SeFr8 (12.3 mg), SeFr9 (123.4 mg), and SeFr10 (111.4 mg).

SeFr6 was the fraction with the best antihyperglycemic activity. It was then analyzed using HPLC-diode array detection (DAD) (Waters Agilent, 5301 Stevens Creek Blvd Santa Clara, CA 95051, USA). The analysis was performed using an HPLC-DAD Waters 2795 liquid chromatograph system coupled with a Waters 996 photodiode array detector and an analytical Millennium 3.1 workstation equipped with a C18 analytical column (Waters, Mexico City, Mexico) with dimensions of 250 mm × 4.6 mm and a particle size of 5 μm (Spherisorb S50D52, Waters Corporation, Milford, MA, USA). For the analysis, 50 mg of the SeFr6 was dissolved in 10 mL of EtOH, and 20 μL of the sample was injected. For elution, a system comprising a binary mobile phase of acetonitrile 100% (solvent A) and acetic acid 2% (solvent B) in water was used. The chromatograph's operating conditions were programmed to give the following linear gradient of 80 (A)/20 (B) for 15 min with a flow rate of 0.8 mLmin⁻¹ of the mobile phase. The detections were made at a wavelength (λ) from 200 to 400 nm at room temperature and a total elution time of 25 min. At the end, the data collected were plotted, and the chromatograms shown in the results section show an absorbance of 220 nm, due to the samples only showing an absorbance at this wavelength. The presence of substances in the SeFr6 fraction was confirmed by comparing the retention times with the standards library. The reference standards of the ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA) used had a purity degree of 90 and 97, respectively. These were prepared and analyzed separately under the same conditions described above. In all cases, the water used was of HPLC quality and purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.4. Experimental Animals

Male and female BALB/c mice (21 ± 3 g) provided by the animal center at the 21st Century National Medical Center laboratory at the Mexican Institute of Social Security (CMN-SXXI-IMSS) were used. The animals were maintained at 22 ± 1 °C, with light/dark cycles of 12 h, and free access to water and food (standard rodent diet, LabDiet Formulab Diet 5008). The studies in rodents were performed in conformity with the Mexican Official Rule for Animal Care and Handling NOM-062-ZOO-1999 [63]. All investigations were conducted with the approval of the Specialty Hospital Ethics Committee of Centro Médico Nacional Siglo XX at IMSS (register: R-2020-3601-007).

4.5. In Vivo Assays

4.5.1. Acute Toxicity Study

The acute oral toxicity study of the extract from the stems from *S. polystachya* was conducted in compliance with OECD's Guideline 423 (Organization for Economic Cooperation and Development) [37]. BALB/c female mice (20–30 g), with free access to water and that were fasted overnight, were used. Animals were grouped as follows: the control group, which was treated with the vehicle (2% Tween 80 in water), and three groups treated with EESpS at 50, 300 and 200 mg/kg⁻¹. The extract was dissolved in 2% Tween 80 in water, and all treatments were administered per os with an esophageal cannula. After the administration of the treatments, the animals were observed for 4 h and then for 14 days in order to record possible toxic effects, such as changes in behavior, body weight, urination, food intake, water intake, respiration, temperature, and eye and skin color, as well as convulsions, tremors, constipation, among others. At the end of the study (day 14), the animals were sacrificed, and the internal organs (stomach, gut, kidney, liver, and pancreas) were extracted, weighed, observed macroscopically and compared against the control group. The organs' relative weights (ORW) were measured in accordance with the ORW formula [64].

$$\text{Organ Relative Weight} = \frac{\text{Absolute weight (g)}}{\text{Mouse body weight at day 14}} \times 100$$

4.5.2. Induction of Experimental Type 2 Diabetes

Experimental diabetes was induced by the streptozocin–nicotinamide (STZ–NA) model [12,13,20]. On the first day, mice fasted overnight (16 h) were used, and they intraperitoneally received (IP) 100 mg/kg⁻¹ of STZ dissolved in a cold pH 4 buffer solution, and 30 min later, 240 mg/kg⁻¹ of NA dissolved in saline solution were administered IP. Once STZ and NA were administered, the animal food was put out. On day 3, fasted mice (16 h) were administered a second dose of 100 mg/kg⁻¹ STZ. After administration, the animal food was put out and a 10% sucrose solution was used over two days. On day 5, the sucrose solution was withdrawn and substituted with water ad libitum. Then, 72 h later, the glycemia was measured by an enzymatic glucose oxidase method, using a glucometer (Evolution, Infopia USA, LLC, Titusville, FL, USA) [20]. Those animals with blood glucose levels between 250–350 mg/dL were considered for experiments.

4.5.3. Acute Effect of Ethanol Extract from Stems of *S. polystachya* and Its Products over Glycemia

This assay was conducted in diabetic mice (DM), and the animals were randomly divided into 12 groups ($n = 6$), as follows: normal mice (NM) and DM control groups, both treated with the vehicle, (2% Tween 80 in water); and ten groups treated with EESpS (50, 100 and 200 mg/kg⁻¹), AqRfR, EtOAcFr, SeFr6, ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA) (50 mg/kg⁻¹). In order to compare the antihyperglycemic activities of the products isolated from *S. polystachya*, the control drugs glibenclamide and acarbose (50 mg/kg⁻¹) were used. All treatments were dissolved in Tween 80 (2% in water) as the vehicle and given in a single oral administration. Blood samples were obtained by puncturing the vein caudal before, and 0, 30, 60, 90 and 120 min after the administration of the treatments. Blood glucose levels (mg/dL) were determined by the enzymatic glucose oxidase method (Evolution, Infopia USA, LLC) [20].

4.5.4. Oral Sucrose and Starch Tolerance Tests of the Products Obtained from Stems from *S. polystachya*

Oral sucrose and starch tolerance tests (OSuTT and OSfTT, respectively) were conducted in male normoglycemic fasted mice. These were randomly divided into seven groups ($n = 6$), as follows: the vehicle group treated with the vehicle (2% Tween 80 in water); the sucrose group treated with the vehicle + sucrose (3 g/kg⁻¹); five groups treated with EESpS (300 mg/kg⁻¹), EtOAcFr (200 mg/kg⁻¹), OA and UA (50 mg/kg⁻¹); and a group treated with acarbose (50 mg/kg⁻¹), an α -glucosidase inhibitor, used as the pharmacological control. All samples were solubilized with 2% Tween 80 in water and administered orally. Thirteen minutes after the administration of treatments, a sucrose load (3 g/kg⁻¹) was administered to the groups. Once administered, the animals were maintained in metabolic cages during the assay. Blood glucose levels were measured by puncturing the caudal vein before the administration of treatments (0 h), and 30, 60, 90, and 120 min after administration. Blood glucose levels (mg/dL) were determined by the enzymatic glucose oxidase method (Evolution, Infopia USA, LLC) [20].

4.5.5. Oral Glucose and Galactose Tolerance Tests of the Products Obtained from the Stems from *S. polystachya*

Oral glucose and galactose tolerance tests (OGTT and OGaTT, respectively) were carried out in the same conditions as the OSuTT and OSfTT. The grouping was the same, with the exception that in OGTT and OGaTT, canagliflozin (50 mg/kg⁻¹) was used as the pharmacological control, and a glucose load (1.5 g/kg⁻¹) was used. The blood collection and measurement were carried out following the same conditions as OSuTT and OSfTT.

4.6. Ex Vivo Assays

Determination of the Inhibition of Intestinal Sucrose Hydrolysis and Glucose Absorption of the Products Obtained from the Stems from *S. polystachya* Cav. and Its Products

The intestinal sucrose hydrolysis (ISH) and intestinal glucose absorption (IGA) assays were conducted according to Valdes et al. [13]. Male Sprague–Dawley rats were used for the assays. The rats were sacrificed according to NOM0062-ZOO-1999. The proximal small intestine (SI) was removed and the first portions of the SI (jejunum and duodenum) were cut into 3 cm portions. These portions were tied on their ends with a nonabsorbable silk suture (Ethicon, Johnson & Johnson, Somerville, MA, USA). For the ISH assay, the group treatments ($n = 6$) were prepared as follows: EESpS, EtOAcFr (200, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), ursolic acid, oleanolic acid, and acarbose (200, 400 and 800 μM). The samples were dissolved in 1.5 mL of 15% sucrose solution as a vehicle. Additionally, a control group was treated only with the vehicle. All the treatments were injected with an insulin syringe inside the 3 cm SI portions previously made in a 0.5 mL volume. Immediately, SI portions were placed in a Petri dish with 15 mL of distilled water as the external aqueous medium (EAM) and incubated for 2 h at 37 °C with constant agitation. The quantities of glucose absorbed in the SI were measured in the EAM 1 h after adding the treatments using the glucose oxidase method.

In the case of the IGA assay, it was conducted under similar conditions to the ISH test, with the exception that canagliflozin (200, 400 and 800 μM) was used as the pharmacological control, the samples were dissolved in 1.5 mL of 5% glucose solution, and the measurements were carried out 1h after the incubation of the intestines. Finally, during the ISH and IGA assays, the results were compared and normalized with the control group at the different measurement times and the half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were calculated.

4.7. In Silico Assays

The chemical structure of the ligands ursolic acid (CID: 64945), oleanolic acid (CID: 10494) canagliflozin (CID: 24812758) and acarbose (CID: 41774) were retrieved from the chemical library PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (accessed on 6 November 2021); these were optimized and submitted to energetic and geometrical minimization using the Avogadro software [65]. Two different targets involved in the control of hyperglycemia were used, α -glucosidase (crystal structure of human lysosomal acid- α -glucosidase was used (RCSB, PDB ID: 5NN8)) and the SGLT-1 (crystal structure of human sodium/glucose cotransporter, UniProt ID: P13866) enzyme. These were retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) (accessed on 29 November 2021)) and UniProt database (<https://www.uniprot.org/>) (accessed on 6 November 2021). The total molecules of water and ions that were not needed for catalytic activity were stripped to preserve the entire protein. All polar hydrogen atoms were added, ionized in a basic environment (pH = 7.4), and Gasteiger charges were assigned. The computed output topologies from the previous steps were used as input files for docking simulations.

The molecular docking experiments were carried out using AutoDock 4.2 software [66], and the search parameters were as follows: a grid-base procedure was employed to generate the affinity maps delimiting a grid box of $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}^3$ in each space coordinate, with a grid point spacing of 0.375 \AA . The Lamarckian genetic algorithm was employed as a scoring function with a randomized initial population of 100 individuals and a maximum number of energy evaluations of 1×10^7 cycles. The analysis of the interactions in the enzyme/inhibitor complex was visualized with PyMOL software (the PyMOL Molecular Graphics System, Ver 2.0, Schrödinger, LLC). The validation of the molecular docking was carried out by re-docking the co-crystallized ligand in the receptors. The lowest energy pose of the co-crystallized ligands was superimposed and it was observed whether it maintained the same binding position. The RMSD were calculated and a reliable range within 2 \AA is reported.

4.8. Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analyses were determined using GraphPad Prism software (version 8.0.2, GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). One-way ANOVA evaluations were carried out followed by a post hoc Dunnett test. In all the cases, $p < 0.05$ was considered a statistically significant difference between the mean groups.

5. Conclusions

EESpS of *S. polystachya*, EtOAcFr, SeFr6 and the UA and OA identified from EtOAcFr reduced blood glucose levels in diabetic mice. This activity was confirmed through in vivo, ex vivo and in silico studies. The complete results of the analysis suggest that the antidiabetic activity of the products from the stems from *S. polystachya* is mediated in part by α -glucosidase enzyme inhibition and SGLT1 cotransporter inhibition. This research supports the phytochemical and pharmacological bases of *S. polystachya* and its use as a source of potential antidiabetic agents for T2D control.

Author Contributions: Conceptualization, R.O. and F.C.; methodology, R.O., M.V., F.J.A.-A., Á.F.-B., C.V. and E.B.; validation and formal analysis, R.O., M.V., F.J.A.-A., Á.F.-B., C.V., E.B. and F.C.; investigation resources F.C. and F.J.A.-A.; writing—original draft preparation, F.C., R.O. and M.V.; supervision, Á.F.-B., C.V. and F.C.; project administration, F.J.A.-A. and F.C.; funding acquisition, F.J.A.-A. and F.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics approved by the National Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social, protocol code (Approval No: R-2020-3601-007 and R-2019-3601-004).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented or additional data in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: This work was submitted as part of the requirements for Rocio Ortega Gomez to obtain the Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud (UAM-I). Rocio Ortega Gomez received financial support from CONACyT (593902). Fernando Calzada Bermejo received financial support for this project from FIS/IMSS (FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/110; Project No. R-2020-3601-007 and R-2019-3601-004). The funders had no participation in the study's design, collection, and analysis of data, decision to publish, or preparation of the manuscript. ROG is grateful to MSc. Jesús Iván Solares Pascacio for the facilities and his help to obtain the plant material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Diabetes. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed on 23 November 2021).
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Available online: <http://archives.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/?loc=globalnav> (accessed on 23 November 2021).
3. Guthrie, R.A.; Guthrie, D.A. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Crit. Care Nurs. Q.* **2004**, *27*, 113–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Maritin, A.; Sanders, R.; Watkins, J. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2003**, *17*, 24–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wada, J.; Makino, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin. Sci.* **2013**, *124*, 139–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Halimi, S. DPP-4 inhibitors and GLP-1 analogues: For whom? Which place for incretins in the management of type 2 diabetic patients? *Diabetes Metab.* **2008**, *34*, S91–S95. [[CrossRef](#)]
7. Lambeir, A.; Scharpé, S.; Meester, I. DPP4 inhibitors for diabetes—What next? *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1637–1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tasnuva, S.; Qamar, U.; Ghafoor, K.; Sahena, F.; Jahurul, M.; Rukshana, A.; Juliana, M.; Al-Juhaimi, F.; Jalifah, L.; Jalal, K.; et al. α -glucosidase inhibitors isolated from *Mimosa pudica* L. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *33*, 1495–1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Furman, B. Acarbose. In *Elsevier Strathclyde Institute of Pharmacy and biomedical Sciences*, 1st ed.; Elsevier: Glasgow, UK, 2017; pp. 1–3.

10. Aftab, S.; Surhesh, R.; Sherali, N.; Daniyal, M.; Tsouklidis, N. Sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitors: Benefits in diabetic with cardiovascular disease. *Cureus* **2020**, *12*, e10783. [CrossRef] [PubMed]
11. Alam, U.; Asghar, O.; Azmi, S.; Malik, R. General aspects of diabetes mellitus. *Handb. Clin. Neurol.* **2014**, *126*, 211–222.
12. Valdés, M.; Calzada, F.; Mendieta-Wejebe, J. Structure-activity relationship of acyclic terpenes in blood glucose levels: Potential α -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors. *Molecules* **2019**, *24*, 4020. [CrossRef]
13. Valdés, M.; Calzada, F.; Mendieta-Wejebe, J.; Merlin-Lucas, V.; Velázquez, C.; Barbosa, E. Antihyperglycemic effects of *Ammonia diversifolia* Safford and its acyclic terpenoids: α -glucosidase and selective SGLT1 inhibitors. *Molecules* **2020**, *25*, 3361. [CrossRef]
14. De Melo, E.B.; da Silveira, A.G.; Carvalho, I. α - and β -glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277–10302. [CrossRef]
15. Castrejón, V.; Carbó, R.; Martínez, M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Rev. Ed. Bioq.* **2007**, *368*, 85–97.
16. Asante, D.; Effah-Yeboah, E.; Barnes, P.; Abban, H.A.; Ameyaw, E.O.; Boampong, J.N.; Ofori, E.G.; Dadzie, J. Antidiabetic effect of young and old ethanolic leaf extracts of *Vernonia amygdalina*: A comparative study. *J. Diabetes Res.* **2016**, *2016*, 8252741. [CrossRef]
17. Salinas-Arellano, E.; Pérez-Vásquez, A.; Rivero-Cruz, I.; Torres-Colin, R.; González-Andrade, M.; Rangel-Grimaldo, M.; Mata, R. Flavonoids and terpenoids with PTP-1B inhibitory properties from the infusion of *Salvia amarissima* Ortega. *Molecules* **2020**, *25*, 3530. [CrossRef] [PubMed]
18. IDF. *Diabetes Atlas*, 9th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2019. Available online: <https://www.diabetesatlas.org/> (accessed on 29 November 2021).
19. Brindis, F.; Rodríguez, R.; Bye, R.; González-Andrade, M.; Mata, R. (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 314–320. [CrossRef]
20. Solares-Pascasio, J.I.; Ceballos, G.; Calzada, F.; Barbosa, E.; Velázquez, C. Antihyperglycemic and lipid profile effects of *Salvia amarissima* Ortega on Streptozotocin-Induced Type 2 diabetic mice. *Molecules* **2021**, *26*, 947. [CrossRef]
21. Zarei, A.; Vaezi, G.; Malekirad, A.A.; Abdollahi, M. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Salvia hydrangea* in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2015**, *18*, 417–422.
22. Sairafianpour, M.; Bahreininejad, B.; Witt, M.; Ziegler, H.L.; Jaroszewski, J.W.; Staerk, D. Terpenoids of *Salvia hydrangea*: Two new, rearranged 20-norabietanes and the effect of oleonic acid on erythrocyte membranes. *Planta Med.* **2003**, *69*, 846–850.
23. Flores-Bocanegra, L.; González-Andrade, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. α -glucosidase inhibitors from *Salvia circinata*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1584–1593. [CrossRef]
24. Bahadori, M.B.; Salehi, P.; Sonboli, A. Comparative study of the essential oil composition of *Salvia urmiensis* and its enzyme inhibitory activities linked to diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, 2974–2981. [CrossRef]
25. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Ortiz-Pastrana, N.; Toscano, R.; Ortega, A. Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoquímica* **2016**, *114*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
26. Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Toscano, R.; García-Peña, M.; Ortega, A. Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3280–3282. [CrossRef] [PubMed]
27. Esquivel, B.; Esquivel, O.; Cárdenas, J.; Adela Sánchez, A.; Ramamoorthy, T.P.; Alfredo Toscano, R.; Rodríguez-Hahn, L. Clerodane and seco-clerodane diterpenoids from *Salvia reptans*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2335–2338. [CrossRef]
28. Aydoğmuş, Z.; Yeşilyurt, V.; Topcu, G. Constituents of *Salvia microphylla*. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 775–781. [CrossRef]
29. Maldonado, E.; Cárdenas, J.; Bojórquez, H.; Escamilla, E.M.; Ortega, A. Amarisolid, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1105–1108. [CrossRef]
30. Jaeger, R.; Cuny, E. Terpenoids with special pharmacological significance: A review. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1373–1390. [CrossRef]
31. Rzedowski, J.; de Rzedowski, G. Tres especies mexicanas de *Lobelia* (*Campanulaceae*, *Lobelioideae*), una redescubierta y dos nuevas. *Acta Bot. Mex.* **2001**, *55*, 29–38. [CrossRef]
32. Ríos, J.V.; García, F.E. *Catálogo de malezas de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario*; Universidad Nacional Autónoma de México: Mexico City, Mexico, 1998.
33. Ortega, A.; Bautista, E.; Maldonado, E. Polystachyne F, a 5,10-seco-neoclerodane from *Salvia polystachya*. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1338–1339. [CrossRef]
34. Bushway, A.; Belyea, R.; Bushway, J. Chia seed as a source of oil, polysaccharide. *Food Sci.* **1981**, *46*, 1349–1350. [CrossRef]
35. Calzada, F.; Yepez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A. Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Phyther. Res.* **2010**, *24*, 662–665.
36. Bautista, E.; Ortiz-Pastrana, N.; Pastor-Palacios, G.; Montoya-Contreras, A.; Toscano, R.A.; Morales-Jiménez, J.; Salazar-Olivo, L.A.; Ortega, A. Neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya* stimulate the expression of extracellular matrix components in human dermal fibroblasts. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 3003–3009. [CrossRef]
37. OCDE. Guideline for Testing if Chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. 2001; pp. 1–14. Available online: https://ntp.niehs.nih.gov/1cvcam/suppdocs/1eddocus/occd/occd_g1423.pdf (accessed on 26 November 2021).
38. Skudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* **2001**, *50*, 537–546.
39. Diab, H.; Fares, M.; Abdei-Valugardi, M.; Kumagai-Baresch, M.; Holgersson, J.; Hassan, M. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan in vitro and in vivo studies. *Immunol. Lett.* **2015**, *163*, 193–198. [CrossRef] [PubMed]



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00128

Matrícula: 2173801871

Estudio fitoquímico y actividad antihiper glucémica e hipolipidémica de *Salvia polystachya* Ort. en ratones con diabetes experimental

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA
DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ
DRA. CLAUDIA VELAZQUEZ GONZALEZ
DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

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

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ROCIO ORTEGA GOMEZ

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

APROBAR

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



ROCIO ORTEGA GOMEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

VOCAL

DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ

VOCAL

DRA. CLAUDIA VELAZQUEZ GONZALEZ

SECRETARIO

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO