



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Estudio *in vivo* e *in vitro* del efecto  
antidiabético de un extracto de hojas de  
*Passiflora ligularis***

**Diana Patricia Rey Padilla**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia  
Bogotá D.C, Colombia

2023



# **Estudio in vivo e in vitro del efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis***

**Diana Patricia Rey Padilla**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctora en Ciencias farmacéuticas**

Director:

Doctor en Farmacia, Luis Fernando Ospina Giraldo  
Profesor Titular. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias.  
Universidad Nacional de Colombia

Codirectora:

DSc Fátima Regina Mena Barreto Silva  
Profesora Titular. Departamento de Bioquímica. Centro de Ciencias Biológicas,  
Universidad Federal de Santa Catarina - Brasil

Línea de Investigación:

Farmacología Experimental

Grupo de Investigación:

Principios Bioactivos en Plantas Medicinales

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia  
Bogotá D.C, Colombia

2023



## Declaración de obra original

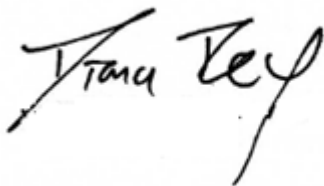
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Diana Patricia Rey Padilla

Fecha 18/04/2023

## Agradecimientos

A Dios, por su infinito amor y que me dio la fortaleza para sobrevivir los momentos más oscuros y estar siempre agradecida con su presencia y bondad.

A mi familia, en especial a mi madre, quienes me dieron todo su amor incondicional, la infinita paciencia, la energía y motivación para seguir adelante.

A mi pareja por brindarme su apoyo absoluto y estar a mi lado en todo los buenos y malos momentos.

A la Universidad Nacional de Colombia y el departamento de Farmacia, especialmente a los docentes que guiaron y acompañaron este camino.

A la Universidad Federal de Santa Catarina, departamento de Bioquímica y posgrado en Farmacia, en Florianópolis - Brasil por la oportunidad de desarrollar parte de los experimentos de la tesis en Brasil.

Al programa

A los profesores Luis Fernando Ospina Giraldo y Fátima Regina Mena Barreto Silva, directores, por hacer parte de este camino por todas sus observaciones, correcciones y orientación inconmensurable.

A la profesora Marcela Aragón quien me acompañó, incentivó, colaboró y realizó pertinentes observaciones en todo el proceso.

A los grupos de investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales (TECPRONA) y el Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, todos y cada uno de sus integrantes que hicieron parte de este largo proceso y con quienes compartí experimentos y experiencias.

A todas las personas con las que compartí un momento acompañado de alegrías, tristezas y especialmente ese *Philia* que es lo que nos une y nos hace ser mejores humanos.

## Resumen

**Introducción:** La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad de alta prevalencia e incidencia a nivel mundial, se estima que la población afectada por esta enfermedad siga en aumento en el transcurso de los próximos años, esta patología se caracteriza por una hiperglicemia crónica que si no es controlada conlleva a complicaciones cardiovasculares, neuropáticas, neurológicas, entre otras. Aunque actualmente se cuenta con varios tratamientos para el control de la glicemia y prevenir la aparición de las complicaciones asociadas a la misma, se sigue en búsqueda de nuevos tratamientos. Gran parte de la población mundial acude a la utilización de plantas medicinales para el tratamiento de sus enfermedades y aunque se ha reportado en la literatura el efecto antidiabético de varias plantas medicinales, es necesario profundizar en estudios que permitan establecer su actividad terapéutica, una de las especies en las que se ha evidenciado esta actividad, es la *Passiflora ligularis*, sin embargo se desconoce los metabolitos asociados a este efecto y su mecanismo de acción por ello se plantearon los siguientes objetivos.

**Los objetivos planteados fueron:** evaluar el efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis* (*P. ligularis*), identificar los metabolitos responsables de la actividad antidiabética de dicho extracto y la dilucidar un posible mecanismo de acción de los metabolitos responsables de dicha actividad antidiabética.

**Metodología:** se realizó la preparación tanto del extracto acuoso como de la fracción etanólica de hojas de *Passiflora ligularis*, luego, se cuantificaron los flavonoides presentes en tanto en estos dos, mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), en un sistema LC Agilent 1260 Infinity acoplado a un detector de matriz de diodos (DAD). Posteriormente se evaluó la actividad antidiabética en ratones con diabetes inducida por dieta rica en grasa y dosis baja de estreptozotocina, se determinó la glicemia a los 7, 14 y 21 días de tratamiento y luego de los 21 días se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG), la determinación de insulina sérica y el sacrificio de los animales.

Posterior al sacrificio se realizó un análisis histopatológico en páncreas, hígado y riñón y se determinaron los parámetros de estrés oxidativo y perfil lipídico de los animales diabéticos tratados y no tratados. Posteriormente en ratas normoglicémicas se efectuó un TTOG para determinar el efecto antihiperглиcemiante y el contenido de glucógeno hepático y muscular de diferentes dosis de la fracción etanólica, por último, se evaluó el efecto y el posible mecanismo de acción de la isoquercetina y astragalina en la captación de glucosa en músculo sóleo aislado y en el aumento del calcio intracelular en islotes  $\beta$ -pancreáticos aislados para aumentar la secreción de insulina.

**Resultados y discusión:** En comparación con el vehículo los ratones que recibieron tratamientos con hojas de *P. ligularis* durante 21 días disminuyeron los niveles de glucosa en sangre después de una sobrecarga oral de glucosa y aumentaron la sensibilidad a insulina. Del análisis del estrés oxidativo se obtuvo que, la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) aumentó en el hígado por los tratamientos administrados por 21 días, la actividad de CAT fue mayor en el riñón en los grupos tratados con la fracción etanólica de *P. ligularis*. Por otra parte, los niveles de malondialdehído (MDA) disminuyeron en los grupos tratados con el extracto y la fracción.

El análisis histopatológico mostró que el extracto acuoso y la fracción etanólica de *P. ligularis* tienen una conservación notable de los islotes pancreáticos, glomérulos renales y estructura hepática a diferencia de los animales no tratados. Los niveles de triglicéridos (TG), colesterol total (CT) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) disminuyeron, mientras que los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) aumentaron significativamente en los animales que recibieron tratamientos con *P. ligularis*.

El análisis fitoquímico demostró la presencia de flavonoides, mayoritariamente isoquercetina, astragalina, los cuales se presentan en mayor proporción en la fracción etanólica. Dado que en todos los ensayos mencionados anteriormente la fracción etanólica demostró mejores valores que el extracto acuoso se puede deducir que dichos compuestos son los responsables de la actividad antidiabética.

En el test de tolerancia a la glucosa en ratas normoglicémicas se observó que, tanto el extracto acuoso como la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* (125 mg/Kg o 500 mg/Kg) redujeron la glicemia y aumentaron el contenido de glucógeno hepático y muscular. La isoquercetina, uno de sus metabolitos mayoritarios, reguló el efecto estimulante sobre la captación de glucosa independientemente de la activación del receptor de insulina, pero



se evidenció que lo realiza por medio de las vías PI3K, MAPK, MEK/ERK y la síntesis de proteínas que regulan la traslocación de GLUT-4.

Con respecto a la astragalina, otro de los emtabolitos mayoritarios d ela fracción, se determinó que 10 mg/Kg disminuyeron la glicemia y aumentó significativamente la secreción de insulina a los 15 a 180 min, respectivamente, en la prueba de tolerancia a la glucosa. En células pancreáticas aisladas, 100  $\mu$ M de astragalina estimuló la entrada de calcio a través de un mecanismo que involucra canales de potasio dependientes de ATP, canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, la ATPasa transportadora de calcio del retículo sarcoendoplásmico (SERCA), PKC y PKA.

**Conclusiones:** Los hallazgos generales revelaron que el extracto acuoso y la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* tienen efecto antidiabético y sus metabolitos mayoritarios, isoquercetina y astragalina, tienen un efecto insulinoimético y secretagogo de insulina respectivamente, por lo que serían útiles como coadyuvantes en el tratamiento o la prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

**Palabras clave:** *Passiflora ligularis* Juss; diabetes mellitus tipo 2, dieta rica en grasa/estrepotocina, astragalina, isoquercetina, GLUT-4; señalización de calcio.

## Abstract

### ***In vivo* and *in vitro* study of the antidiabetic effect of an extract of *Passiflora ligularis* leaves**

**Introduction:** Type 2 diabetes mellitus is a disease of high prevalence and incidence worldwide, it is estimated that the population affected by this disease will continue to increase in the coming years, this pathology is characterized by chronic hyperglycemia that if not controlled leads to cardiovascular, neuropathic, neurological complications, among others. Although there are currently several treatments to control glycemia and prevent the appearance of complications associated with it, the search for new treatments continues. A large part of the world population resorts to the use of medicinal plants for the treatment of their diseases and although the antidiabetic effect of various medicinal plants has been reported in the literature, it is necessary to deepen studies that allow establishing their therapeutic activity, one of the species in which this activity has been evidenced, is *Passiflora ligularis*, however the metabolites associated with this effect and its mechanism of action are unknown, therefore the following objectives were set.

**The proposed objectives were:** evaluate the antidiabetic effect of an extract of *Passiflora ligularis* (*P. ligularis*) leaves, to identify the metabolites responsible for the antidiabetic activity of said extract and to elucidate a possible mechanism of action of the metabolites responsible for said antidiabetic activity.

**Methodology:** the aqueous extract and the ethanolic fraction of *Passiflora ligularis* leaves were prepared, then the flavonoids present in both these two were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC), in an Agilent 1260 Infinity LC system coupled to a diode array detector (DAD). Subsequently, the antidiabetic activity was evaluated in mice with diabetes induced by a high-fat diet and low dose of streptozotocin, glycemia was determined at 7, 14 and 21 days of treatment and after 21 days an oral tolerance test was performed. glucose (OGTT), the determination of serum insulin and the sacrifice of the animals. After sacrifice, a histopathological analysis was carried out in the pancreas, liver

and kidney and the oxidative stress parameters and lipid profile of the treated and untreated diabetic animals were determined. Subsequently, in normoglycemic rats, an OGTT was performed to determine the antihyperglycemic effect and the liver and muscle glycogen content of different doses of the ethanolic fraction, finally, the effect and possible mechanism of action of isoquercetin and astragalín on uptake of glucose in isolated soleus muscle and in the increase of intracellular calcium in isolated  $\beta$ -pancreatic islets to increase insulin secretion.

**Results and discussion:** Compared to vehicle, mice receiving *P. ligularis* leaves treatments for 21 days had decreased blood glucose levels after an oral glucose challenge and increased insulin sensitivity. From the analysis of oxidative stress it was obtained that the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) increased in the liver by the treatments administered for 21 days, the activity of CAT was higher in the kidney in the groups treated with the fraction ethanol from *P. ligularis*. On the other hand, malondialdehyde (MDA) levels decreased in the groups treated with the extract and the fraction.

The histopathological analysis showed that the aqueous extract and the ethanolic fraction of *P. ligularis* have a remarkable preservation of the pancreatic islets, renal glomeruli and liver structure, unlike untreated animals. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein (LDL) levels decreased, while high-density lipoprotein (HDL) levels increased significantly in animals receiving *P. ligularis* treatments.

The phytochemical analysis showed the presence of flavonoids, mainly isoquercetin, astragalín, which are present in a higher proportion in the ethanolic fraction. Given that in all the tests mentioned above, the ethanolic fraction showed better values than the aqueous extract, it can be deduced that these compounds are responsible for the antidiabetic activity.

In the glucose tolerance test in normoglycemic rats, it was observed that both the aqueous extract and the ethanolic fraction of *P. ligularis* leaves (125 mg/Kg or 500 mg/Kg) reduced blood glucose and increased liver glycogen content. and muscular. Isoquercetin, one of its major metabolites, regulated the stimulating effect on glucose uptake independently of insulin receptor activation, but it was shown that it does so through the PI3K, MAPK, MEK/ERK pathways and protein synthesis. that regulate GLUT-4 translocation.

Regarding astragalín, another of the major metabolites of the fraction, it was determined that 10 mg/Kg decreased glycemia and significantly increased insulin secretion at 15 to

180 min, respectively, in the glucose tolerance test. In isolated pancreatic cells, 100  $\mu$ M astragalín stimulated calcium influx through a mechanism involving ATP-gated potassium channels, L-type voltage-gated calcium channels, the sarcoendoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase (SERCA), PKC and P.K.A.

**Conclusions:** The general findings revealed that the aqueous extract and the ethanolic fraction of *P. ligularis* leaves have an antidiabetic effect and its major metabolites, isoquercetin and astragalín, have an insulin mimetic and insulin secretagogue effect respectively, so they would be useful as adjuvants in treatment or prevention of type 2 diabetes mellitus

**Keywords:** *Passiflora ligularis* Juss; type 2 diabetes mellitus, high-fat diet/streptozotocin, astragalín, isoquercetin, GLUT-4; calcium signaling.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VII
Lista de figuras .....	XVI
Lista de tablas .....	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas .....	XIX
Introducción .....	1
Objetivos.....	3
<b>1. Evaluación del efecto antidiabético de un extracto de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> e identificación de los posibles metabolitos responsables.</b> .....	<b>5</b>
1.1 Aspectos teóricos .....	5
1.1.1 Diabetes mellitus tipo 2: definiciones, diagnóstico y tratamiento farmacológico .....	5
1.1.2 Estudios de la diabetes en modelos experimentales en animales de laboratorio.....	10
1.1.3 Plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes mellitus: Género <i>Passiflora</i> .....	13
1.2 Metodología.....	16
1.2.1 Materiales y reactivos.....	16
1.2.2 Obtención del extracto de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> y fracción etanólica... ..	16
1.2.3 Caracterización química y cuantificación de flavonoides del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> .....	17
1.2.4 Animales .....	18
1.2.5 Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en ratas normoglicémicas. ....	18
1.2.6 Modelo de inducción de diabetes tipo 2 por dieta rica en grasa y estreptozotocina (HFD/STZ) en ratones .....	19
1.2.7 Análisis histopatológico .....	20
1.2.8 Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en ratones diabéticos .....	21
1.2.9 Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones diabéticos .....	21
1.2.10 Parámetros de estrés oxidativo.....	22
1.2.11 Análisis estadístico. ....	22
1.3 Resultados y discusión .....	23
1.3.1 Efecto del extracto acuoso, fracción acuosa y etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el ensayo de sobrecarga oral de glucosa.....	23

1.3.2	Caracterización química del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> .....	25
1.3.3	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el peso corporal y consumo de alimento en ratones diabéticos. ....	27
1.3.4	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos. ....	31
1.3.5	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el TTOG en ratones diabéticos. ....	34
1.3.6	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones diabéticos. ....	36
1.3.7	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en la histopatología hepática, renal y pancreática de ratones diabéticos.....	38
1.3.8	Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en parámetros de estrés oxidativo en ratones diabéticos.....	44
1.3.9	Análisis del efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el perfil lipídico sérico en ratones diabéticos. ....	48
1.4	Conclusiones.....	51
1.5	Productos de investigación obtenidos:.....	52
<b>2.</b>	<b>Evaluación de los posibles mecanismos de acción de los flavonoides isoquercetina y astragalina. ....</b>	<b>53</b>
2.1	Aspectos teóricos: Absorción y transporte de glucosa. ....	53
2.1.1	Transportadores de glucosa.....	54
2.1.2	Rol de los canales de potasio y calcio en la secreción de insulina. ....	59
2.1.3	Canales de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ ).....	60
2.1.4	Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV).....	63
2.2	Metabolitos de la <i>Passiflora ligularis</i> Juss.....	66
2.3	Metodología.....	67
2.3.1	Materiales y reactivos.....	68
2.3.2	Preparación del extracto y fracción de <i>Passiflora ligularis</i> Juss. ....	69
2.3.3	Animales.....	69
2.3.4	Test de tolerancia oral a glucosa (TTOG).....	69
2.3.5	Contenido de glucógeno hepático y muscular.....	70
2.3.6	Mediciones de insulina plasmática.....	70
2.3.7	Captación de [ $U-^{14}C$ ] -2-Desoxi-D-glucosa ( $^{14}C$ -DG) en músculo sóleo de rata.....	71
2.3.8	Aislamiento de islotes pancreáticos de rata.....	71
2.3.9	Medición de Insulina basal.....	72
2.3.10	Entrada de calcio en islotes pancreáticos aislados.....	72
2.3.11	Análisis estadístico.....	73
2.4	Resultados y discusión.....	74
2.4.1	Efecto de la fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> en el ensayo de sobrecarga oral de glucosa y la glucogénesis hepática y muscular. ....	74
2.4.2	Curva dosis-respuesta del efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa ( $^{14}C$ -DG) en el músculo sóleo de rata. ....	78
2.4.3	Participación de las rutas de señalización de insulina en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}C$ -DG en el músculo sóleo. ....	80
2.4.4	Participación de receptores de membrana y citoplasma en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}C$ -DG en el músculo sóleo.....	82

2.4.5 Participación del GLUT-4 en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}\text{C}$ -DG en el músculo sóleo .....	85
2.4.6 Participación de la transcripción y traducción en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}\text{C}$ -DG en el músculo sóleo .....	87
2.4.7 Test de tolerancia oral a glucosa (TTOG) y niveles de insulina plasmática. ..	90
2.4.8 Curva dosis-respuesta del efecto de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos. ....	92
2.4.9 Evolución temporal del efecto de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos .....	93
2.4.10 Participación de los canales $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos .....	95
2.4.11 Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos. ....	97
2.4.12 Participación de PKC y PKA en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos. ....	98
2.4.13 Participación del calcio de los depósitos en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos. ....	100
2.4.14 Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal.....	103
2.5 Conclusiones.....	104
2.6 Productos de investigación obtenidos: .....	106
<b>3. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>107</b>
3.1 Conclusiones.....	107
3.2 Recomendaciones .....	109
<b>A. Anexo: Preparación de reactivos .....</b>	<b>111</b>
A.1 Protocolo extracción y medición de Glucógeno por la técnica de Krisman .....	111
A.2 Preparación reactivo de Krebbs .....	112
A.3 Preparación reactivo de Lowry-Folin para determinación de proteína.....	112
A.4 Preparación de cloruro de Lantano ( $\text{LaCl}_3$ ).....	113
<b>Bibliografía .....</b>	<b>115</b>

## Lista de figuras

Pág.

<b>Figura 1-1.</b> Efecto del extracto acuoso de las hojas de <i>P. ligularis</i> y sus fracciones en ratas hiperglicémicas con sobrecarga oral de glucosa.....	24
<b>Figura 1-2.</b> Perfil cromatográfico del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> (azul) y la fracción etanólica de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> (rosa) a 350 nm.....	26
<b>Figura 1-3. A.</b> Niveles de glucosa en sangre (NGS) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento. <b>B.</b> Área bajo la curva de los NGS durante 21 días de tratamiento en ratones diabéticos.	32
<b>Figura 1-4.</b> Prueba de sobrecarga oral de glucosa en ratones diabéticos luego de 21 días de tratamiento.....	35
<b>Figura 1-5.</b> Microfotografías de tejidos de hígado de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.....	38
<b>Figura 1-6.</b> Microfotografías de tejidos de riñón de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.....	41
<b>Figura 1-7.</b> Microfotografías de tejidos de páncreas de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.....	43
<b>Figura 1-8.</b> Efecto de <i>P. ligularis</i> sobre la superóxido dismutasa (SOD) en ratones diabéticos.....	45
<b>Figura 1-9.</b> Efecto de <i>P. ligularis</i> sobre la catalasa (CAT) en ratones diabéticos.....	46
<b>Figura 1-10.</b> Efecto de <i>P. ligularis</i> sobre la peroxidación lipídica (MDA) en ratones diabéticos.....	47
<b>Figura 2-1.</b> Mecanismo de secreción de insulina inducida por glucosa y perfil bifásico de secreción de insulina en células beta pancreáticas.....	56
<b>Figura 2-2.</b> Vía de señalización intracelular del músculo esquelético posterior a la activación del receptor de insulina.....	58
<b>Figura 2-3.</b> Esquema del mecanismo dependiente de los canales $K^+_{ATP}$ , para la secreción de insulina estimulada por glucosa.....	62
<b>Figura 2-4.</b> Señalización de la secreción de insulina en las células $\beta$ – pancreáticas.....	65
<b>Figura 2-5.</b> Efecto de las fracciones etanólicas de <i>P. ligularis</i> en la prueba de tolerancia a la glucosa.....	75
<b>Figura 2-6.</b> Efecto de las fracciones etanólicas de <i>P. ligularis</i> sobre el contenido de glucógeno en el músculo sóleo e hígado.....	76
<b>Figura 2-7.</b> Efecto de la isoquercetina y astragalina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo.....	79



<b>Figura 2-8.</b> Efecto de HNMPA-(AM) <sub>3</sub> y wortmanina sobre la acción estimulante de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup> C-glucosa en el músculo sóleo de rata. ....	81
<b>Figura 2-9.</b> Efecto de la colchicina sobre el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup> C-glucosa en el músculo sóleo. ....	82
<b>Figura 2-10.</b> Efecto de la β-metil-ciclodextrina y la N-etilmaleimida sobre la acción estimuladora de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup> C-glucosa en el músculo sóleo. ....	84
<b>Figura 2-11.</b> Efecto de SB239063 y PD98059 sobre la acción estimulante de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup> C-glucosa en el músculo sóleo de rata. ....	86
<b>Figura 2-12.</b> Efecto de la actinomicina D y la cicloheximida sobre el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup> C-glucosa en el músculo sóleo de rata. ....	88
<b>Figura 2-13.</b> Vías de señalización que utiliza la isoquercetina para la captación de la glucosa en el músculo sóleo. ....	89
<b>Figura 2-14.</b> Efecto de astragalina (1 mg/Kg y 10 mg/Kg) sobre la curva de tolerancia oral a la glucosa en ratas, después de una sobrecarga oral de glucosa (4 g/Kg). ....	91
<b>Figura 2-15.</b> Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina plasmática en ratas hiperglicémicas. ....	92
<b>Figura 2-16.</b> Curva dosis-respuesta del efecto de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en los islotes pancreáticos de ratas de 50 días. ....	93
<b>Figura 2-17.</b> Evolución temporal del efecto de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en islotes pancreáticos de rata aislados. ....	94
<b>Figura 2-18.</b> Participación de los canales de potasio en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en los islotes pancreáticos. ....	96
<b>Figura 2-19.</b> Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje y el calcio intracelular en el efecto de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en los islotes pancreáticos. ....	98
<b>Figura 2-20.</b> Influencia de las proteínas quinasas (PKC y PKA) sobre el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en los islotes pancreáticos. ....	99
<b>Figura 2-21.</b> Participación de la movilización de calcio intracelular en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> en los islotes pancreáticos. ...	101
<b>Figura 2-22.</b> Propuesta del mecanismo de acción de la astragalina sobre el efecto estimulador de la entrada de calcio y la secreción de insulina. ....	103
<b>Figura 2-23.</b> Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal en islotes pancreáticos de rata. ....	104

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Modelos de DM en roedores modificados genéticamente.....	11
<b>Tabla 1-2.</b> Gradiente de elución de la metodología analítica.....	17
<b>Tabla 1-3.</b> Diseño experimental de los grupos, dieta y tratamiento que recibieron.....	20
<b>Tabla 1-4.</b> Composición de la dieta rica en grasa y dieta estándar. ....	20
<b>Tabla 1-5.</b> Diferencia entre la ganancia o pérdida de peso entre la semana 0 a la semana 10 desde el inicio de la administración de la HFD .....	28
<b>Tabla 1-6.</b> Niveles de glucosa en sangre a la semana 0, semana 8 y semana 10 después de iniciar HFD .....	29
<b>Tabla 1-7.</b> Pesos corporales (g) e ingesta de comida (g/día) de los animales desde el inicio de los tratamientos .....	30
<b>Tabla 1-8.</b> Porcentaje de reducción de glicemia respecto al vehículo a los 7, 14 y 21 días de tratamiento en ratones diabéticos inducidos con HFD/STZ. ....	32
<b>Tabla 1-9.</b> Efecto del extracto acuoso y una fracción etanólica de <i>P. ligularis</i> sobre la glucosa e insulina en ayuno y el índice HOMA.....	36
<b>Tabla 1-10.</b> Efecto del extracto acuoso de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg y la fracción etanólica de <i>P. ligularis</i> sobre el perfil lipídico sérico en ratones diabéticos. ....	48
<b>Tabla 1-11.</b> Porcentaje de reducción o aumento de diferentes parámetros bioquímicos después de 21 días de tratamiento con un extracto acuoso o fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> respecto al vehículo.....	50

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (S.I)

Unidad	Término
dL	Decilitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mg	Miligramo
Kg	Kilogramo
nm	Nanómetro
μM	Micromolar
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
μL	Microlitro

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<sup>14</sup> C-DG	[U- <sup>14</sup> C] -2-desoxi-D-glucosa
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
BAPTA-AM	tetraquis (acetoximetil) 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacetato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CaMKII	Quinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CAT	Catalasa
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CCDV-L	Canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L
CEUA	Comité de Ética en Uso Animal
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución

Abreviatura	Término
CMC	Carboximetilcelulosa
CT	Colesterol total
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP IV	Dipeptidil peptidasa IV
E.E.M	Error estándar de la media
ELISA	enzimoinmunoanálisis de adsorción
ER	Retículo endoplásmico
GK	Rata Goto-Kakizaki
GLP-1	Péptido tipo 1 similar al glucagón
GLUT-4	Transportadores de glucosa tipo 4
H-89	N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina N'-(ácido 2-etanosulfónico)
HFD	Dieta rica en grasa
HFD/STZ	Dieta rica en grasa y posterior tratamiento con estreptozotocina
HNMPA(AM) <sub>3</sub>	Éster tris-acetoxi-metilico del ácido hidroxí-2-naftalenil metil fosfónico
HOMA-IR	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H&E	Hematoxilina y eosina
IP3	Inositol trifosfato
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Canales de K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Canales de potasio dependientes de ATP
Canales de K <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio
Kir6	Subunidad tipo canal iónico rectificador de entrada de potasio
KRb	Buffer de Krebs Ringer – bicarbonato
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAPK o MAPK/ERK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
NGS	Niveles de glucosa en sangre
NZO	Ratón obeso de Nueva Zelanda
OLETF	Rata Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. Edulis</i>	<i>Passiflora edulis</i>
<i>P. Incarnata</i>	<i>Passiflora incarnata</i>
<i>P. ligularis</i>	<i>Passiflora ligularis</i>
<i>P. Setacea</i>	<i>Passiflora setacea</i>
<i>P. Suberosa</i>	<i>Passiflora suberosa</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKA	Proteína quinasa A

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
PKC	Proteína quinasa C
RO-318220	3-{3-[4-(1-Metil-1H-indol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-1H-indol-1-il}propil carbamimidotioato
ROS	especies reactivas de oxígeno
SERCA	ATPasas de calcio de retículo sarco/endoplásmico
SGLT	Proteínas de transporte sodio-glucosa
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida
SOD	Superóxido dismutasa
SOG	Sobrecarga oral de glucosa
STZ	Estroptozotocina
SUR	Subunidad receptora de sulfonilúreas
TEA	Tetraetilamonio
TG	Triglicéridos
TTOG	Test de tolerancia oral a la glucosa
WHO	World Health Organization
ZDF	Rata Zucker Diabética Obesa



# Introducción

La diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2) es una enfermedad crónica de alta prevalencia e incidencia a nivel mundial. En 2017, aproximadamente 462 millones de personas presentaban este diagnóstico a nivel mundial y es la novena causa de mortalidad y se prevé que para 2030 la prevalencia aumente en un 17%, se estima que tres de cada cuatro personas con diabetes viven hoy en países de ingresos con tendencia a aumentar en lo que supone una alerta para la salud pública por ello se hace relevante proponer medidas preventivas clínicas para reducir la carga personal y social de diabetes (Khan et al., 2020; Tamayo et al., 2015).

Dentro de los principales signos y síntomas de la DMT2 se encuentra la polidipsia, poliuria, polifagia, debido a una hiperglicemia crónica causada por disminución de la sensibilidad de los tejidos periféricos a las insulina, dicha hiperglicemia conduce a la aparición de complicaciones tales como la nefropatía, retinopatía, neuropatía, insuficiencia renal, entre otras, por lo que el tratamiento no solo incluye controlar la glicemia sino además otras estrategias multifactoriales, el tratamiento de estas complicaciones aumenta los costos sanitarios de la DMT2 (American Diabetes Association (ADA), 2021b; Li et al., 2013).

Actualmente para la DMT2 se tiene como tratamiento el cambio de hábitos alimenticios y de estilo de vida y tratamiento farmacológico, los fármacos utilizados se pueden clasificar en 8 grupos farmacológicos según su mecanismo de acción, sin embargo, el tratamiento de primera elección es la metformina (Ministerio de la Protección Social, 2016). A pesar de contar con numerosas alternativas farmacológicas se han reportado numerosos efectos adversos asociados a su consumo tales como diarrea, distensión abdominal y flatulencia por lo que aún se continúa buscando alternativas de tratamiento. Dado que en los países de ingresos medianos y bajos es común utilizar plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades y que a su vez la metformina viene de la *Galega officinalis*, se han

---

buscado alternativas en plantas medicinales con potencial antidiabético que sean costo-efectivas y con un buen perfil de seguridad (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Unuofin & Lebelo, 2020).

Hoy en día existe una gran incertidumbre sobre la eficacia y seguridad de dichas plantas medicinales antidiabéticas ya que hay pocos estudios clínicos que evalúen estos parámetros, así mismo se hace relevante no solo evaluar dicho efecto sino también conocer los compuestos bioactivos asociados al efecto antidiabético y dilucidar su posible mecanismo de acción para poder considerarlos como una posible alternativa al tratamiento de la DMT2. Algunos autores han reportado 509 plantas de 140 géneros y se han asociado los flavonoides, terpenoides, saponinas, carotenoides y alcaloides como compuestos bioactivos de estas plantas medicinales (Salaj et al., 2021; Salehi et al., 2019).

Uno de los géneros a los cuales se les han hecho estudios para demostrar la actividad antidiabética es el de las *Passifloras*, varios autores ha reportado que especies como *Passiflora nítida*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora incarnata* y *Passiflora edulis*, tienen un efecto antidiabético y este efecto se ha asociado a la presencia de crisina y piceatannol (Salehi et al., 2019), otra especie de este género en la que se ha evidenciado un efecto antidiabético es la *Passiflora ligularis* (*P. ligularis*), ya que un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* demostró tener efecto antidiabético en ratas con diabetes inducida con aloxano, dicho efecto se atribuyó a la presencia de flavonoides y alcaloides. Así mismo, en nuestro grupo de investigación se ha reportado un efecto antihiperlicemiante asociado a la administración de un extracto acuoso y la fracción etanólica de las hojas de *P. ligularis* en ratones normoglicémicos, efecto que puede ser atribuido a la inhibición de las glucosidasas intestinales por parte de flavonoides como la isoquercetina y astragalina (Chippy et al., 2016; Echeverry et al., 2021; Monzón et al., 2021; Sepúlveda et al., 2020).

Sin embargo, aún queda por evaluar el efecto antidiabético del extracto en animales con diabetes inducida, dilucidar los metabolitos asociados a este efecto y esclarecer el posible



mecanismo de acción asociado a estos compuestos bioactivos; por lo que se plantan los siguientes objetivos en este estudio:

## Objetivos

### Objetivo General

Estudiar *in vivo* e *in vitro* el efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis*.

### Objetivos Específicos

- Evaluar en modelos de diabetes experimental
- el efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis*.
- Identificar el o los metabolitos responsables de la actividad antidiabética de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis*.
- Proponer un posible mecanismo de acción del o los metabolitos responsables de la actividad antidiabética de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis*.



# **1. Evaluación del efecto antidiabético de un extracto de hojas de *Passiflora ligularis* e identificación de los posibles metabolitos responsables.**

## **1.1 Aspectos teóricos**

### **1.1.1 Diabetes mellitus tipo 2: definiciones, diagnóstico y tratamiento farmacológico**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica comúnmente padecida en todo el mundo. La prevalencia de esta enfermedad se estimó en 9,3% a nivel mundial (aproximadamente 463 millones de personas) en 2019 (Saeedi et al., 2019). La DM se define como un conjunto de trastornos metabólicos caracterizados principalmente por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia), alteraciones de las lipoproteínas, tasa metabólica basal elevada y aumento del estrés oxidativo.

La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías según su fisiopatología general:

- Diabetes tipo 1 (DMT1): provocada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, que conduce a una deficiencia absoluta de insulina evitando la activación de los transportadores celulares que median el envío de glucosa a los tejidos de acuerdo con los requerimientos energéticos del individuo (American Diabetes Association (ADA), 2021a; Blackman et al., 2013).
- Diabetes tipo 2 (DMT2): ocurre por una pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas relacionada con el no reconocimiento de los

receptores celulares de insulina (resistencia a insulina), disminuyendo la captación y almacenamiento de glucosa periférica (American Diabetes Association (ADA), 2021b; Santilli et al., 2015).

- Tipos específicos de diabetes debido a otras causas: como por ejemplo síndrome de diabetes monogénica, enfermedades del páncreas exocrino o enfermedades inducidas por fármacos o productos químicos como los glucocorticoides (American Diabetes Association (ADA), 2021a; Gulliford et al., 2006).
- Diabetes mellitus gestacional: diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no se había manifestado previamente. (American Diabetes Association (ADA), 2021a)

La diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2) es la de mayor prevalencia e incidencia, es diagnosticada en el 6,28 % de la población mundial y su incidencia y prevalencia va en aumento (Khan et al., 2020) a nivel mundial y tres de cada cuatro personas con diabetes viven hoy en países de ingresos medios y bajos. Por ello, dentro plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no contagiosas que fue iniciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2011, uno de los principales objetivos es desarrollar estrategias para el control de esta ya que estas cifras van en aumento. En Colombia se ha reportado que tiene una prevalencia de 7.3% en hombres y 8.7% en mujeres entre los 30 y 64 años, presentando en la mayoría de los pacientes complicaciones crónicas, lo que implica aumento de los costos sanitarios; por ello se hace relevante proponer intervenciones probadas, procesos y colaboraciones para reducir la carga personal y social de diabetes (Tamayo et al., 2015).

Los principales síntomas asociados a la DMT2 incluyen polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, entre otros. Esta enfermedad puede ser diagnosticada mediante tres pruebas:

- Glucosa en sangre en ayuno: con valores mayores de 126 mg/dL de glicemia confirman el diagnóstico.
- Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG): valores mayores a 200 mg/dL de glicemia después de dos horas de haber tomado la sobrecarga oral glucosada.

- Glicemia a cualquier hora del día: Una prueba de glucosa en sangre por encima de 200 mg/dL y alguno de los síntomas anteriormente mencionados confirma el diagnóstico (American Diabetes Association (ADA), 2021a)

Luego de su diagnóstico se aconseja al paciente que en primera instancia haga una modificación de su estilo de vida el cual incluye un régimen especial alimenticio, actividad física regular y evitar el consumo de tabaco, la principal intervención es el control de la glucosa a través del paraclínico de hemoglobina glicosilada, paraclínico que debe estar por debajo de 5,7% y mide la glucosa que se adhiere a la hemoglobina en un periodo de tres meses (American Diabetes Association (ADA), 2017; Calisti & Tognetti, 2005). También se recomienda hacer periódicamente un control de tensión arterial, cuidados podológicos, pruebas de detección de retinopatía, monitorización de los lípidos de la sangre y pruebas de detección de los signos tempranos de nefropatía (OMS, 2016).

Los controles anteriormente mencionados son recomendados dado que la hiperglicemia crónica (glicemia encima de 6 mM o 108 mg/dL) produce complicaciones principalmente en los sistemas cardiovascular, renal, cardiaco, ocular y nervioso y hace que requiera atención médica continua con estrategias multifactoriales más allá de solo controlar la glicemia (American Diabetes Association (ADA), 2021b; World Health Organization (WHO), 2021). Estos daños ocurren debido a la toxicidad generada por la glucosa que conduce al estrés oxidativo, aterosclerosis, inflamación y lesión cerebral aguda (Giacco & Brownlee, 2010).

Para el tratamiento de la DMT2, se recomienda la adquisición de hábitos de vida saludables como la dieta, ejercicio, reducción de consumo de alcohol y tabaco, entre otros, sin embargo, en estadios más avanzados de la enfermedad el paciente requiere hipoglicemiantes orales o insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre (American Diabetes Association (ADA), 2017; Luna & Feinglos, 2001). De acuerdo con la literatura y Guías Clínicas consultadas, para el tratamiento de la DMT2 existen seis principales familias de antidiabéticos orales y la insulino terapia por vía parenteral. Los antidiabéticos orales se pueden clasificar de acuerdo con su estructura química y a su mecanismo de acción. Las familias más utilizadas en el tratamiento de la DMT2 son:

sulfonilúreas, biguanidas, tiazolidinedionas, gliptinas, entre otras (Aschner et al., 2016; Moon et al., 2017).

Los mecanismos de acción asociados a estos grupos farmacológicos son:

- Sulfonilúreas: reducen la entrada de potasio a la célula al bloquear los receptores de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K^+_{ATP}$ ), lo que produce la despolarización de la membrana, estimula la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) aumentando las concentraciones de calcio intracelulares, lo que induce a su vez la secreción de la insulina, por ello también son llamados secretagogos de insulina. Algunos de los fármacos de este grupo son la glibenclamida o la tolbutamida (Bösenberg & van Zyl, 2008).
- Meglitinidas: presentan un mecanismo de acción similar al de las sulfonilúreas, solo que se unen a un receptor diferente de las células  $\beta$ -pancreáticas. Algunos de los fármacos de este grupo son la repaglinida y nateglinida (Rehani et al., 2019).
- Biguanidas: catalogados como insulino miméticos ya que actúan activando la vía de la adenosín monofosfato proteína quinasa (AMPK), produciendo un aumento de la sensibilidad a insulina en los hepatocitos, donde disminuye la gluconeogénesis y la glucogenólisis y promueve la traslocación de los transportadores de glucosa como los GLUT-4 en tejidos como los adipocitos y músculo esquelético. Los fármacos de este grupo son la metformina, fenformina y buformina (di Magno et al., 2022; Rehani et al., 2019).
- Tiazolidinedionas: son agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), lo cual hace que se aumente la sensibilidad a insulina y captación de glucosa en tejidos como los hepatocitos. Algunos fármacos de este grupo son la rosiglitazona y la pioglitazona (Dowarah & Singh, 2020).
- Análogos del péptido tipo 1 similar al glucagón (GLP-1): El péptido tipo 1 similar al glucagón (GLP-1) es un péptido gastrointestinal (y hormona) que estimula la formación y liberación de insulina de los islotes  $\beta$ -pancreáticos al consumir alimentos por vía oral. Algunos fármacos que pertenecen a esta familia son exenatida, lixisenatida y liraglutida; cabe aclarar que estos medicamentos solo son de administración por vía parenteral (Neumiller, 2009; Rehani et al., 2019).
- Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4): la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) se encarga de degradar e inactivar el polipéptido insulino trópico dependiente

de glucosa (GIP) y el GLP-1, los cuales son secretagogos de insulina, estos fármacos al inhibir esta enzima disminuyen la degradación de GIP y GLP y por tanto promueven la síntesis y exocitosis de insulina. Algunos fármacos que pertenecen a este grupo son: sitagliptina, vildagliptina y linagliptina (Neumiller, 2009).

- Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2): impiden la reabsorción de la glucosa en el túbulo contorneado proximal al inhibir estos transportadores los cuales están asociados a reabsorción de casi el 90% de la glucosa. Los fármacos que pertenecen a esta familia son canagliflozina, ipragliflozina, dapagliflozina y empagliflozina (Hsia et al., 2016).
- Inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas: las glucosidasas son enzimas que se encuentran principalmente en las microvellosidades intestinales y que hidrolizan A monosacáridos los polisacáridos que usualmente consumimos en los alimentos, su inhibición implica el enlentecimiento de la absorción de la glucosa. Los fármacos de este grupo farmacológico son la acarbosa, el miglitol y la voglibosa (Bösenberg & van Zyl, 2008; Rehani et al., 2019).

Actualmente la guía colombiana para el manejo de la DMT2 en mayores de 18 años recomienda comenzar con cambios de hábitos de vida saludable (dieta y ejercicio) y posteriormente iniciar con terapia farmacológica. El fármaco de primera línea es la metformina, si con monoterapia con metformina no se consigue controlar la hiperglicemia combinar metformina con inhibidor del DPP4 o un inhibidor SGLT-2 o una sulfonilúrea y caso tal que no se controle se puede adicionar un tercer agente como agonista del receptor de GLP1, como último tratamiento se recomienda la utilización de insulinas (Ministerio de la Protección Social, 2016).

A pesar de contar con varias alternativas para el control de la DMT2, se ha descrito que en países de escasos recursos no se tiene fácil acceso a estos medicamentos, además muchos de estos presentan notables desventajas tales como reducción de eficiencia, efectos adversos (hipoglicemia) e incluso toxicidad, lo cual no garantiza la adherencia y por tanto el éxito de la terapia (Ranilla et al., 2010; Salehi et al., 2019). Las plantas medicinales forman parte de los sistemas de medicina tradicional y son ampliamente utilizadas por gran parte de la población mundial, el uso para prevenir o tratar la diabetes ha sido ampliamente descrito desde la antigüedad, sin embargo, actualmente aún se

desconoce en su gran mayoría el mecanismo de acción de los fitoconstituyentes de las mismas (Coman et al., 2012; Farzaei et al., 2017).

Las plantas medicinales con actividad antidiabética han jugado un rol importante en el cuidado de la salud en la población de los países de economía emergente y de algunos países desarrollados, por ello la OMS ha recomendado hacer una investigación más intensiva en cuanto a la evaluación científica del uso de las mismas y ampliar la información sobre su eficacia, seguridad y control sobre otras complicaciones tales como la hipertensión arterial o la nefrotoxicidad (Mirhoseini et al., 2013; Ranilla et al., 2010; Salehi et al., 2019). Dado lo anterior, se hace relevante realizar estudios tanto preclínicos como clínicos de alternativas diferentes a la terapia actual, tales como plantas medicinales que tengan potencial antidiabético, así como profundizar en los posibles metabolitos responsables de dicha actividad y su posible mecanismo de acción.

### **1.1.2 Estudios de la diabetes en modelos experimentales en animales de laboratorio**

De manera general, los estudios de actividad antidiabética inician en modelos *in vivo* los cuales se recomienda complementar con modelos *in vitro* para tener un acercamiento al posible mecanismo de acción. La diabetes puede ser inducida por compuestos químicos, quirúrgicamente o por manipulación genética en varias especies; uno de los biomodelos más utilizados es el de los roedores. La selección de este biomodelo depende de muchos factores, pero siempre se debe tener en cuenta que la DMT2 humana es una enfermedad compleja que es difícil replicar con exactitud en un animal (Al-Awar et al., 2016; Fröde & Medeiros, 2008).

La inducción de la diabetes quirúrgicamente se realiza mediante una pancreatectomía en la cual se remueve de 70-90% del páncreas, técnica que se ha aplicado en varias especies tales como cerdos, rata, perros y primates. Sin embargo, este modelo tiene muchas limitantes principalmente el adecuado entrenamiento del cirujano y la posibilidad de



infecciones postoperatorias que conlleven a administración de antibióticos, además se recomienda acompañar del autotrasplante de los islotes pancreáticos extraídos por lo que muy pocos investigadores la utilizan (Choi et al., 2004; Dash et al., 2021).

En la actualidad hay muchos tipos de biomodelos con roedores modificados genéticamente que presentan una fisiopatología similar a la del paciente diabético y pretenden imitar la enfermedad para evaluar aspectos específicos de la enfermedad (Balibrea & Arias-Díaz, 2007). Los modelos de roedores más utilizados y sus características generales lo vemos resumidos en la [tabla 1-1](#).

**Tabla 1-1.** Modelos de DM en roedores modificados genéticamente.

Modelo animal	Tipo de inducción de la diabetes	Utilización
Ratón NOD Rata BB Rata LEW.1AR1/-iddm	Causan destrucción autoinmune de los islotes pancreáticos causando una hipoinsulinemia e hiperglicemia (Dash et al., 2021).	Modelo para DMT1
Ratón Akita	Tienen una mutación en el gen de insulina 2, lo que causa hipoinsulinemia, polidipsia, poliuria e hiperglicemia (Wang et al., 2013).	
Rata Goto-Kakizaki (GK):	Modelo de tipo no obeso, obtenido por endogamia selectiva. Tienen reducción del 60% de islotes de Langerhans y reproduce la hiperproducción de glucosa, reducción de hiperglicemia, aumento de la resistencia periférica a la insulina y alteración en el metabolismo lipídico (Al-Awar et al., 2016; Miralles & Portha, 2001).	Modelo para DMT2
Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO) Ratón Kuo Kondo (KK):	Modelos de tipo obeso, obtenidos por endogamia selectiva, hipertrofia e hiperplasia de adipocitos, hiperglicemia e hiperinsulinemia (Noshahr et al., 2020; Wang et al., 2013).	
Ratón Lep <sup>db/db</sup> : y Lep <sup>ob/ob</sup> Rata Zucker fatty (fa/fa)	Se ocasiona una mutación en el gen de la leptina ocasionando inicialmente obesidad e hiperinsulinemia y posteriormente resistencia a la insulina, hiperglicemia e hiperlipidemia (Noshahr et al., 2020; Wang et al., 2013).	

La inducción de la diabetes puede hacerse químicamente, utilizando aloxano o la estreptozotocina (STZ), este tipo de inducción es el más utilizado y reportado por los autores en la literatura por su fácil adaptación. Estas dos sustancias químicas son diabetogénicas, ya que, al ser análogos de glucosa, se transportan dentro de las células  $\beta$  pancreáticas causando daño celular (Lenzen, 2008).

El Aloxano: es un derivado oxigenado de la pirimidina, que utiliza transportadores de glucosa para llegar a las células  $\beta$ -pancreáticas y forma radicales superóxido, los cuales incrementan el calcio citosólico y causan destrucción de las dichas células, también causa una inhibición de la glucoquinasa lo que conlleva a una inhibición de la secreción de insulina. La inducción de la diabetes con este agente tiene mayor similitud con la fisiopatología de la DMT1 (Al-Awar et al., 2016; Fröde & Medeiros, 2008).

Por otra parte, la estreptozotocina (STZ): Es una nitrosúrea que causa una alquilación del ADN al entrar a las células  $\beta$ -pancreáticas a través de transportadores de glucosa, dicha alquilación induce a una liberación de óxido nítrico y la destrucción de estas por necrosis, presenta menos letalidad que el aloxano y causa complicaciones parecidas a las de la DMT2 como daño renal, estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial (Dash et al., 2021; Lenzen, 2008). Este último modelo ha tenido varias modificaciones para que asemeje más el cuadro metabólico de la DMT2, estas son:

- Diabetes inducida por STZ - nicotinamida (STZ-NIC): dado que la STZ causa una destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, dicha destrucción da como resultado un insulino pancreático e hiperglicemia severa. Para lograr una protección parcial de los efectos citotóxicos de la STZ se propone la utilización de la nicotinamida, o vitamina B3, que actúa como un agente antioxidante y disminuye el daño excesivo causado por la liberación de óxido nítrico. Con este modelo se alcanza una hiperglicemia estable que permite evaluar de mejor forma los antidiabéticos orales, sin embargo, este modelo presenta desventajas en cuanto que no genera como tal una resistencia a insulina, ni variación en los niveles plasmáticos de la misma, la hiperglicemia solo se genera en los estados sin ayuno e incrementa los niveles de triglicéridos plasmáticos hasta en un 40% (Ghasemi et al., 2014).

- Diabetes inducida por una dieta alta en grasa y dosis bajas de STZ: como se mencionó con anterioridad, los modelos en animales con STZ o STZ-NIC producen un déficit de insulina mas no la resistencia, lo cual es característico en los pacientes de DMT2. Este modelo es susceptible a la resistencia a insulina debido a que las células receptoras están bloqueadas por depósitos de grasa, y la acción diabética de una dosis baja de STZ se incrementa. Por lo tanto, varios autores han establecido que el efecto combinatorio de la dieta alta en grasa y dosis baja de STZ puede reflejar el desarrollo de un modelo ideal para la DMT2, además este modelo también replica las complicaciones tales como el estrés oxidativo e hiperlipidemia (Skovsø, 2014; Srinivasan et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Cada vez se hace más imprescindible realizar estudios que no sólo determinen si se tiene o no actividad antidiabética, sino también que eluciden el mecanismo de acción. En especial para los productos naturales, ya que sin ello no se pueden proponer como una alternativa terapéutica ni emplear en el tratamiento de la DMT2. Por ello se recomienda que posterior a los estudios *in vivo* se realicen estudios *in vitro* que permitan comprender el mecanismo de acción de los fitoconstituyentes de las plantas medicinales.

### **1.1.3 Plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes mellitus: Género *Passiflora***

El estudio farmacológico de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional para tratar síntomas o dolencias relacionadas con la DM ha ido en aumento en la última década (Patel et al., 2012; Salehi et al., 2019). Más de 400 especies se utilizan a nivel mundial como alternativa o tratamiento adicional para la DM, en las que se han identificado compuestos de tipo flavonoides, polifenoles, terpenoides, alcaloides como compuestos activos (Salaj et al., 2021; Salehi et al., 2019).

Dentro de la terapia de primera línea para el tratamiento de la DMT2 se encuentra la metformina (una biguanida), que es un derivado de la galegina; una guanidina aislada de la planta *Galega officinalis* L. que ha sido usada desde el medioevo por pacientes diabéticos (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Bailey, 2017); eso despertó el interés hacia la

utilización de plantas medicinales y la investigación fitoterapéutica. Aunque es difícil encontrar entre las plantas el sustituto a insulina, sí es posible que se encuentren moléculas que estimulen la biosíntesis y secreción de insulina endógena o aumenten la absorción de la glucosa en sangre por parte de los tejidos periféricos (Prabhakar & Doble, 2008).

Aunque los géneros asociados a la actividad antidiabética son muy diversos, uno de los géneros más estudiados ha sido el de las *Passifloras* (de Almeida et al., 2021; Kandandapani et al., 2015; Miroddi et al., 2013).

El género *Passiflora* comprende más de 560 especies que están distribuidas ampliamente en la región tropical y subtropical, de las cuales 250 especies se encuentran en Suramérica. En su mayoría, las flores son exóticas que se utilizan de forma ornamental mientras que a los frutos conocidos como “fruto de la pasión” se utilizan para la elaboración de jugos y otros alimentos. La infusión de las hojas se utiliza popularmente en el tratamiento del insomnio, ansiedad, evidenciado efecto depresor del sistema nervioso central. Algunos autores reportan otros usos como antimicrobiano especialmente contra bacterias gram positivas, antihelmíntico y antifúngico (Ramaiya et al., 2014) antioxidante y antihipertensivo. Las flores, hojas y frutos de la mayoría de las especies de este género presentan dentro de su composición fitoquímica C-glicosilflavonoides (orientina, vitexina, isorientina e isovitexina), alcaloides, saponinas, aceites esenciales, carotenoides, minerales, fibra y vitaminas A, C y D, lo que hace a la especie de gran utilidad en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética (Costa et al., 2016; Pacheco et al., 2016).

En Colombia se han encontrado más de 167 especies de este género, estas especies se encuentran distribuidas principalmente en la región Andina y el país se ha convertido en uno de los mayores exportadores de frutos de este género: *Passifloras* tales como el maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Sims.), la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) son enviadas a mercados europeos y se anunció que tanto la exportación como el consumo de estas especies se incrementaría (Miranda et al., 2009). Varias especies de *Passifloras* colombianas han demostrado actividad antioxidante

atribuida a la presencia de varios compuestos fenólicos. Debido al interés que existe en el aprovechamiento de los recursos naturales, el género *Passiflora* se constituye como un género que aporta una enorme riqueza, tanto a nivel económico, como nutricional, farmacéutico y de recursos genéticos (Carvajal de Pabón et al., 2011). En concreto, nuestro grupo de investigación ha centrado su atención en el estudio de *Passiflora ligularis* y su potencial uso en el tratamiento de la DM (Aragón et al., 2021).

La *Passiflora ligularis* (*P. ligularis*), conocida como “granadilla”, es una especie del género *Passiflora* y familia de las pasifloráceas. En Colombia la superficie sembrada de *P. ligularis* se ha incrementado en los últimos años proporcionalmente con su internacionalización, convirtiéndose en el principal exportador de granadilla a nivel mundial. Aunque se cultiva en varios departamentos, Antioquia y Huila son los departamentos con mayores áreas cultivadas (Miranda et al., 2009; Parra et al., 2010).

El efecto antidiabético de un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* ya ha sido descrito en ratas con diabetes inducida con aloxano, dicho efecto se atribuye a la presencia de flavonoides y alcaloides (Chippy et al., 2016). Por otra parte, dentro de nuestro grupo de investigación el efecto antihiperlipémico del extracto acuoso y la fracción etanólica de las hojas de *P. ligularis* se demostró en animales normoglicémicos sometidos a una prueba de tolerancia oral a la glucosa (Echeverry et al., 2021; Sepúlveda et al., 2020). Este efecto se atribuyó a los principales flavonoides O-glicosilados isoquercetina y astragalina presentes en ambos extractos (Monzón et al., 2021). Los flavonoides son los metabolitos secundarios y compuestos bioactivos mayoritariamente presentes en el reino vegetal. Estos compuestos son importantes en la dieta humana y varios estudios han demostrado un amplio rango de efectos beneficiosos, tales como el regular el metabolismo de la glucosa (Cazarolli et al., 2008; Pereira Fontana et al., 2011; Pinent et al., 2008).

Esta investigación tuvo como primer objetivo evaluar la actividad antidiabética del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* y su respectiva fracción etanólica obtenida mediante la resina XAD2. Se seleccionó un modelo crónico de diabetes inducido con una dieta rica en grasa y dosis bajas repetidas de estreptozotocina. Además del monitoreo de los niveles de glucosa en sangre y resistencia a insulina, se realizó una evaluación histopatológica del

páncreas y se determinaron parámetros relacionados con el estrés oxidativo y el perfil lipídico.

## 1.2 Metodología

### 1.2.1 Materiales y reactivos

En el proceso de obtención de la fracción etanólica del extracto de *P. ligularis* se empleó etanol al 99,5% (PanReac AppliChem). Se utilizaron reactivos de ácido fórmico grado 85 % (Carlo Erba), acetonitrilo grado HPLC (Merck) y agua ultrapura (sistema Milli-Q Millipore®) para el análisis de cromatografía líquida. En cuanto a los estándares analíticos, la isoquercetina (Quercetin-3-glucoside,  $\geq 90$  %, HPLC), astragalina (Kaempferol 3-glucoside,  $\geq 97,0$  % HPLC) y crisina ( $\geq 98$  %, HPLC) se adquirieron de Sigma-Aldrich®.

La STZ (572201), la glucosa (G7021), la carboximetilcelulosa-CMC (419273), el kit de ensayo de peroxidación lipídica (MDA) (MAK085), el kit de ensayo de catalasa (CAT100) y el kit de ensayo de SOD (19160) se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU). Se utilizó un kit ELISA, Monobind® (2425-300A) para determinar los niveles de insulina sérica. Kit de colesterol MR (1118005), kit de colesterol HDL (1133010), kit de triglicéridos MR y kit de colesterol LDL (1133105) fueron adquiridos para medir los marcadores de lípidos en Linear Chemicals S.L.U.

El pentobarbital sódico (Eutanex®) se compró en un establecimiento veterinario.

### 1.2.2 Obtención del extracto de hojas de *Passiflora ligularis* y fracción etanólica

Las hojas de *P. ligularis* se colectaron en Anolaima, Cundinamarca-Colombia (Longitud: 74° 29.97' O; Latitud: 4° 50.0172' N; Altitud: 1850 m.s.n.m) mediante el permiso de

recolección de muestras otorgado por el ANLA y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo: "BIOSPROSPECCION DE ESPECIES DE SOLANUM, *PASSIFLORA*, *PHYSALIS*, *HYPERICUM*, *CECROPIA* E *ILEX*", código 38024, resolución 0699 de abril 26 de 2018, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible OtroSi No7 al contrato 121 del 22 de enero del 2016). Un ejemplar comprobante fue depositado en el Herbario Nacional de Colombia (COL 602878). Las hojas se secaron a temperatura ambiente y el tamaño de partícula se redujo utilizando un molino de cuchillas. El extracto de hojas de *P. ligularis* y la fracción etanólica se obtuvo de acuerdo con la metodología reportada previamente por nuestro grupo de investigación. El extracto acuoso se obtuvo por infusión (agua a 90°C), mientras que la fracción de etanol se preparaba colocando el extracto acuoso bajo agitación con resina XAD-2 y posterior lavado con etanol.

### 1.2.3 Caracterización química y cuantificación de flavonoides del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*.

El contenido de flavonoides totales, isoquercetina y astragalina se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) siguiendo la metodología divulgada anteriormente (Echeverry et al., 2021). La CLAR se llevó a cabo en un sistema LC Agilent 1260 Infinity acoplado a un detector de matriz de diodos (DAD). Se trabajó con un gradiente de elución conformado por una fase móvil A de ácido fórmico al 1% y una fase móvil B de acetonitrilo a un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección fue de 10 µL, las condiciones de elución se encuentran en la [tabla 1-2](#).

**Tabla 1-2.** Gradiente de elución de la metodología analítica.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	90	10
20	81	19
33	80	20
43	50	50
45	50	50
50	90	10

55	90	10
----	----	----

Se utilizó como fase estacionaria una columna Phenomenex-Luna® C18 (150 × 4,6 mm × 5 µm) a una temperatura de 45°C. Finalmente, la cuantificación se realizó a 260, 265 y 350 nm de longitud de onda para isoquercetina, astragalina y flavonoides totales, respectivamente. La crisina se identificó y detectó a 267 nm usando crisina ≥98%, grado HPLC como estándar externo.

### 1.2.4 Animales

**Ensayo sobrecarga oral de glucosa:** Ratas Wistar macho de 7 a 10 semanas de edad (160 a 210 g), fueron suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Se mantuvieron en jaulas a temperatura ambiente controlada (aproximadamente 22 ° C ± 2) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los animales recibieron alimento (concentrado LabDiet® 5001) y agua ad libitum.

**Ensayo inducción diabetes:** Ratones Swiss hembra, con 14 a 16 semanas de edad, fueron suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron criados en condiciones óptimas de temperatura (22°C ± 2°C) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Antes y durante el experimento, los animales fueron alimentados con una dieta rica en grasas (Test Diet® DIO Rodent Purified Diet w45% Energy from Fat-Red 58V8) y agua ad libitum. El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron semanalmente. Este estudio también fue avalado en por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta 04/2017).

### 1.2.5 Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en ratas normoglicémicas.

Las ratas en ayuno (12 h) se organizaron en 5 grupos:

- (i) Grupo Control (vehículo)



- (ii) Glibenclamida (50 mg/Kg)
- (iii) Extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (500 mg/Kg)
- (iv) Fracción acuosa del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (500 mg/Kg) y
- (v) Fracción etanólica del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (500 mg/Kg)

Todos los tratamientos se administraron por sonda orogástrica. A continuación, las ratas recibieron el respectivo tratamiento o vehículo y luego de 30 min se administró una sobrecarga de glucosa (4 g/Kg de peso corporal). La prueba de tolerancia a la glucosa se inició inmediatamente después de la sobrecarga de glucosa y los NGS se midieron a los 60, 120 y 180 min utilizando un equipo Accu-Check Performa® (Frederico et al., 2017; Kappel et al., 2013).

### **1.2.6 Modelo de inducción de diabetes tipo 2 por dieta rica en grasa y estreptozotocina (HFD/STZ) en ratones**

Todos los animales fueron alimentados con una dieta rica en grasas (HFD) (ver tablas [1-3](#) y [1-4](#)) durante ocho semanas antes de la inducción de la diabetes por inyección intraperitoneal de dos dosis bajas de estreptozotocina (STZ-40 mg/Kg) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE. UU.) disuelta en tampón citrato (pH 4,5); las dosis se administraron con cinco días de diferencia entre sí. Los animales recibieron una solución de glucosa al 5% durante la noche para superar la hipoglicemia inducida por STZ. Después de tres días de la administración de la segunda dosis de STZ, se midieron los niveles de glucosa en sangre (NGS) utilizando un equipo Accu-Chek Performa®, recolectando las muestras de sangre de la vena lateral de la cola a través de un pequeño corte. Los animales con NGS por encima de 150 mg/dL en ayuno se consideraron como diabéticos para los experimentos posteriores (Furman, 2015). Los ratones diabéticos se separaron aleatoriamente en cuatro grupos (n = 6) para recibir los siguientes tratamientos, adicionalmente se contaba con un grupo que recibió dieta estándar o grupo normoglicémico (n = 6):

**Tabla 1-3.** Diseño experimental de los grupos, dieta y tratamiento que recibieron.

Grupo	Dieta	Tratamiento
i	Dieta rica en grasa (Test Diet® DIO Rodent Purified Diet w45% Energy from Fat-Red 58V8)	Vehículo: Agua con CMC 0,5% y Tween 0,5%
ii		Metformina 250mg/Kg
iii		Extracto acuoso de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg
iv		Fracción etanólica de <i>P. ligularis</i> 250 mg/Kg
v	Dieta estándar LabDiet® 5001	Vehículo: Agua con CMC 0,5% y Tween 0,5%

Todos los grupos fueron tratados durante 21 días mediante sonda orogástrica.

Las composiciones de las dietas se detallan a continuación:

**Tabla 1-4.** Composición de la dieta rica en grasa y dieta estándar.

Dieta	Dieta rica en grasa (Test Diet® DIO Rodent Purified Diet w45% Energy from Fat-Red 58V8)	Dieta estándar LabDiet® 5001
<b>Composición</b>		
Proteína (%)	20,8	24,1
Grasa (%)	23,6	6,4
Fibra (%)	5,8	5,3
Carbohidratos (%)	41,2	25,2
Energía (kcal <sup>2</sup> /g <sup>2</sup> )	4,6	3,4

Al final del experimento, los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p) con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) y luego sacrificados por dislocación cervical (Janssen et al., 2004). Una vez obtenidas las muestras de sangre, estas se centrifugaron (3500 rpm / 10 min / 4 °C) y se recogió el sobrenadante de suero, se aislaron el hígado, riñón y páncreas. Las muestras de suero recolectadas y órganos aislados se conservaron a -80°C hasta el análisis del perfil lipídico y la medición de la insulina sérica.

### 1.2.7 Análisis histopatológico

El hígado, riñón y páncreas aislados, se pesaron y colocaron en una solución de formaldehído tamponado con fosfato al 10% en una proporción de 1:20 para estudios histopatológicos. De acuerdo con el procedimiento estándar, las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

### **1.2.8 Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) en ratones diabéticos**

Este ensayo se realizó a los 21 días de administrados los tratamientos, siguiendo la metodología desarrollada previamente en nuestro grupo de investigación (Echeverry et al., 2018). Los animales se mantuvieron en ayuno por cuatro horas antes de la prueba. La sobrecarga de glucosa oral (2 g/Kg de peso corporal) se administró 30 minutos después de cada tratamiento y se midieron los NGS antes (tiempo 0) y después de la sobrecarga (30, 60 y 90 minutos), utilizando un equipo Accu-Check Performa®.

### **1.2.9 Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones diabéticos**

Para la determinación de los niveles de insulina sérica se utilizó un kit ELISA. La resistencia a la insulina (IR) se determinó de acuerdo con el índice de evaluación del modelo de homeostasis calculado con la ecuación 1 (Abdelhameed et al., 2021).

Ecuación 1

$$HOMA - IR = \frac{(insulina\ plasmatica\ en\ ayuno\ [\mu U/mL] \times glicemia\ en\ ayuno\ [mg/dL])}{405}$$

## 1.2.10 Parámetros de estrés oxidativo

Al final del bioensayo, los órganos aislados (hígado, páncreas y riñón) fueron utilizados para la estimación de parámetros bioquímicos de superóxido dismutasa (SOD) (Ref. 19160) y catalasa (CAT) (Ref. CAT100) utilizando kits de marca Sigma®. También se empleó un kit para estimar la peroxidación de lípidos como los niveles de malondialdehído (MDA) (Ref. MAK085) de Sigma® en homogeneizado de tejido. Finalmente, para perfil de lipídico sérico: Los niveles de triglicéridos (TG) (Ref. MR), colesterol total (CT) (Ref. MR 1118005), lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ref. 1133010) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Ref. 1133105) se estimaron mediante un kit de diagnóstico de Linear Chemicals S.L.U.

## 1.2.11 Análisis estadístico.

Se empleó el software GraphPad Prism® (versión 6, San Diego, CA) para el análisis de datos. Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  E.E.M o media  $\pm$  D.E. El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test de Bonferroni (Figura 1-1; Figura 1-3A y Figura 1-4) o un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunnett (tablas 1-4 a 1-6; 1-8 y 1-9; figuras 1-8 a 1-10),  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. La homogeneidad de los datos se determinó utilizando el software GraphPad prism 7® mediante la prueba de Bartlett para ANOVA.

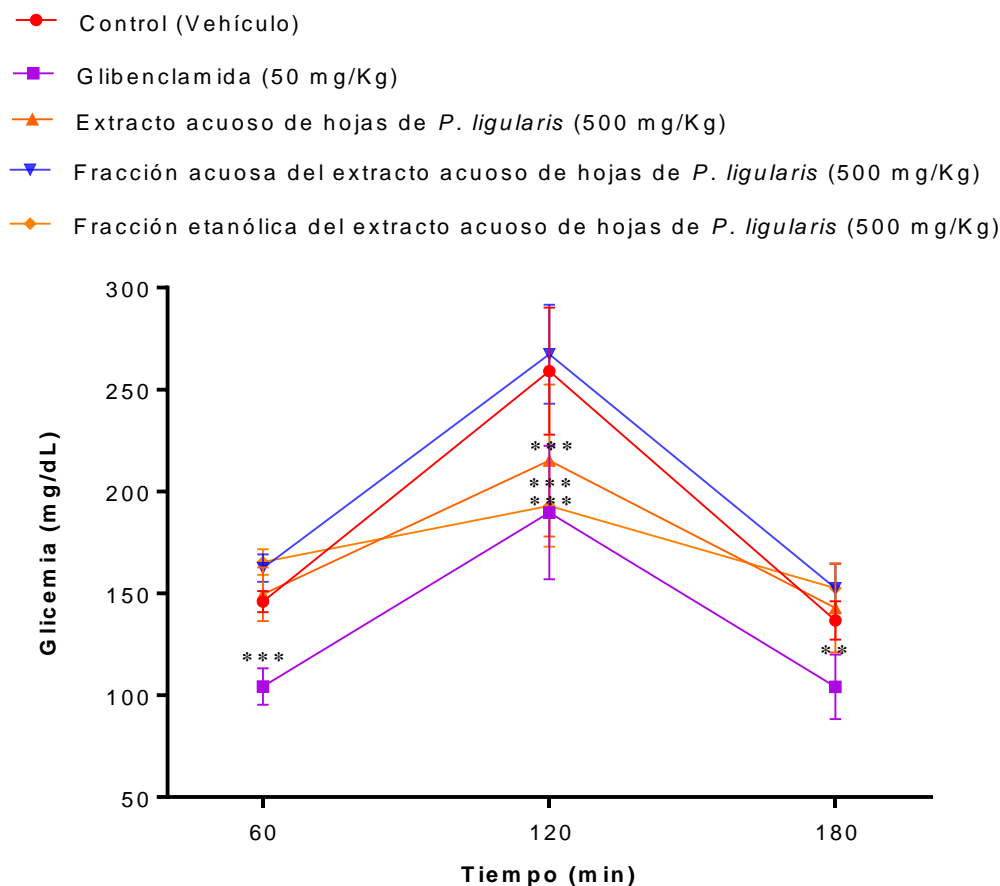
## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Efecto del extracto acuoso, fracción acuosa y etanólica de hojas de *P. ligularis* en el ensayo de sobrecarga oral de glucosa en ratas.

Como se muestra en la [Figura 1-1](#), el extracto acuoso de *P. ligularis* Juss y la fracción etanólica redujeron la glicemia en alrededor de un 23 % y un 25 %, respectivamente a los 120 min, en comparación con el grupo control sin tratamiento (vehículo). Por su parte, la fracción acuosa no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa durante el período estudiado. Para la glibenclamida, fármaco utilizado como control positivo, la glicemia se redujo en alrededor de un 27 %, en comparación con el grupo control (vehículo) respectivo.

Los resultados reportan la actividad antihyperglicemiante del extracto acuoso y etanólico obtenido de hojas de *P. ligularis* Juss en un tratamiento agudo *in vivo* en ratas normoglicémicas.

**Figura 1-1.** Efecto del extracto acuoso de las hojas de *P. ligularis* y sus fracciones en ratas hiperglicémicas con sobrecarga oral de glucosa.



Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M. ( $n = 9$ ), \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con el respectivo grupo de control de hiperglicemia

El test de tolerancia oral a glucosa (TTOG) es un método muy utilizado para diagnosticar la diabetes, en humanos se administran 75 g de glucosa y 2 horas luego si se encuentran valores de glicemia  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L) se diagnostica la diabetes (American Diabetes Association, 2022). En el presente caso, se utilizó para determinar el efecto hipoglicémico o antihiperglicémico del extracto acuoso y la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* Juss, este efecto no se observó en la fracción acuosa, lo que sugiere que los compuestos del extracto acuoso con menor polaridad (y presentes en la fracción etanólica) están involucrados en la disminución de la glicemia para mejorar la tolerancia a la glucosa. Así mismo, es bien conocido que la resina XAD-2 es una resina utilizada para la obtención de fracciones ricas en flavonoides a partir de extractos acuosos de plantas

(Rosler & Goodwin, 1984), por lo que se puede deducir que probablemente estos metabolitos sean los responsables de la actividad antidiabética.

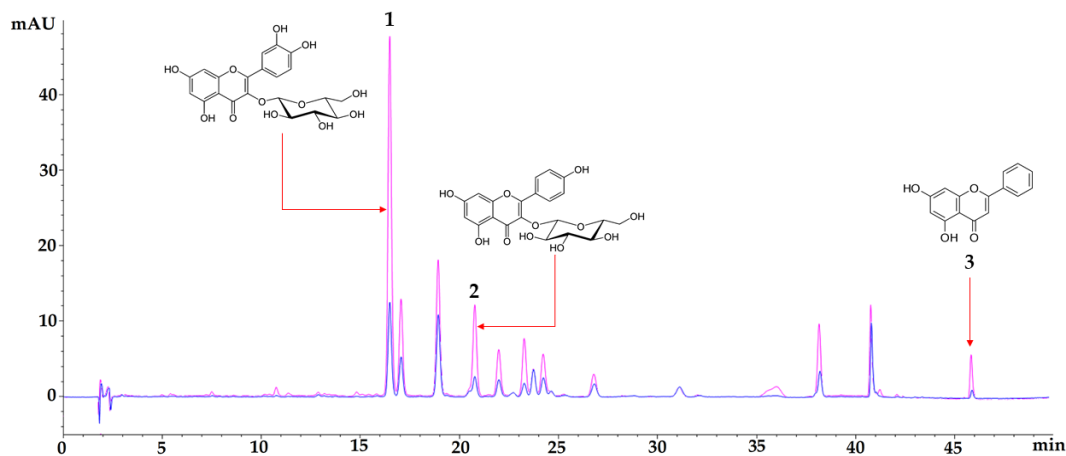
De acuerdo con lo anterior, para posteriores estudios se realizó la caracterización química y se evaluó el efecto antidiabético de solo el extracto acuoso y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*.

### **1.3.2 Caracterización química del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*.**

Como se muestra en la [Figura 1-2](#), según el análisis cromatográfico se puede evidenciar que el extracto acuoso y su respectiva fracción etanólica comprende una variedad de flavonoides de los cuales se puede identificar la isoquercetina (quercetina-3-O-glucósido) y astragalina (kaempferol-3-O-glucósido) como metabolitos mayoritarios y evidenciar la presencia de crisina. Cabe resaltar que previamente en investigaciones realizadas dentro del grupo de investigación que han tenido como finalidad aportar al estudio fitoquímico de las hojas los otros compuestos se habían identificado y comprenden: luteolina-7-O-glucósido, quercetina-3-O-(6"-acetil)-glucósido, quercetina-3-O-(6"-malonil)-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, isoramnetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-(6"-acetil)-glucósido, kaempferol-3-O-(6"-malonil)-glucósido, luteolina-7-O-(6"-O-malonil)-glucósido, isoramnetina-3-O-(6"-malonil)-glucósido, crisina-7-O- $\beta$ -glucósido y crisina-7-O-(6"-O-acetil)-glucósido (Sepúlveda Ramos, 2021), también es importante destacar que previamente se había evidenciado que los metabolitos mayoritarios, astragalina e isoquercetina, son inhibidores de las glucosidasas intestinales, lo que es un indicativo de un potencial efecto en el control de la glicemia (Monzón et al., 2021), por ello en la presente investigación nos enfocamos en estos flavonoides y fueron cuantificados.

Se encontró una concentración de flavonoides totales de  $60,98 \pm 0,76$   $\mu\text{g}$ -equivalente de isoquercetina/mg de extracto para el extracto acuoso, mientras que para la fracción etanólica el valor fue de  $135,00 \pm 0,49$   $\mu\text{g}$ -equivalente de isoquercetina/mg de fracción.

**Figura 1-2.** Perfil cromatográfico del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* (azul) y la fracción etanólica de hojas de *Passiflora ligularis* (rosa) a 350 nm.



La señal cromatográfica 1 corresponde a isoquercetina; la señal 2 corresponde a astragalina y la señal 3 corresponde a crisina. El método analítico utilizado se describió previamente en el apartado de metodología.

Los valores cuantificados de isoquercetina y astragalina en el extracto acuoso fueron  $12,89 \pm 0,38 \mu\text{g}$  de isoquercetina/mg y  $4,19 \pm 0,04 \mu\text{g}$  de astragalina/mg, respectivamente. En la fracción etanólica el contenido de isoquercetina aumentó en un 241,8 % y el de astragalina en un 227,3 %, con respecto a las concentraciones encontradas en el extracto acuoso de *P. ligularis*, mostrando un aumento significativo de estos flavonoides respecto al extracto acuoso, lo anterior es según lo esperado ya que, como se mencionó anteriormente la resina XAD-2 se utiliza para la obtención de fracciones ricas en flavonoides a partir de extractos acuosos de plantas (Rosler & Goodwin, 1984).

Previamente varios autores han reportado la presencia de flavonoides en otras especies de *Passiflora* tales como: *Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Passiflora alata* o *Passiflora edulis f. edulis* ya habían reportado (Viera et al., 2022), específicamente en la *P. incarnata* se ha evidenciado la presencia mayoritaria de C-glicosilflavonas como apigenina, luteolina, isorientina e isovetexina (Rehwald et al., 1994), las hojas de *P. edulis var. flavicarpa*, *P. alata*, *P. tripartita var. mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. bogotensis* y *P. manicata* han demostrado la presencia de C-glicosilflavonoides tales como vicenina-2, espinosina, swertisina, isoorientina, orientina, isovitexina y vitexin, entre otros (Costa et al., 2016; Zucolotto et al., 2012). Por último, en una revisión de la literatura de los fitoconstituyentes



de 46 especies de *Passifloras*. se reportó que al menos 15 de estas especies contenían C-glicosilflavonoides mayoritariamente (Dhawan et al., 2004).

De acuerdo con los resultados, a diferencia de la mayoría de las especies de *Passiflora*, la *P. ligularis* tiene O-glicosilflavonoides, de hecho, la ausencia de C-glicosilflavonoides en las hojas ya había sido reportada por Zucolotto y colaboradores (Zucolotto et al., 2012). Es bien conocido que la presencia de glicosil flavonoides hace que las estructuras sean más estables frente a sus respectivas agliconas (Xiao et al., 2016; Xie et al., 2022), por ejemplo, se ha comprobado con respecto a la actividad antioxidante que, aunque las agliconas demostraban tener una mayor actividad antioxidante los glicosil flavonoides mejoraban su estabilidad y ayudaban a mantener las actividades antioxidantes después de la digestión. Así mismo, aunque se ha evidenciado que la presencia de C- glicosilflavonoides reduce la hidrólisis a nivel gástrico e intestinal, se demostró *in vivo* que a nivel plasmático la actividad antioxidante era mayor en los O-glicosilflavonoides (Xie et al., 2022). Por otra parte, cabe destacar que para la escisión de los C- glicosilflavonoides los humanos dependen de la microbiota intestinal lo cual haría más variable su absorción (Oteiza et al., 2018), lo anterior nos conlleva a inferir que a pesar de la posible hidrólisis de los O-glicosilflavonoides a nivel gastrointestinal la actividad biológica de astragalina o isoquercetina se mantiene a nivel plasmático.

### **1.3.3 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en el peso corporal y consumo de alimento en ratones diabéticos.**

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para establecer el modelo diabético en los ratones. La [tabla 1-5](#) muestra la diferencia entre la ganancia o pérdida del peso desde la primera semana de administración de la dieta rica en grasa hasta la octava semana, antes de recibir la STZ, los valores correspondientes a la semana 9 y 10 fueron las diferencias en el peso respecto a la semana 8, es decir, luego de la administración de STZ. Se observa una ganancia de peso desde la semana 1 hasta la semana 8 en los ratones que recibieron HFD, el peso aumenta en un 8,4% en la semana 1 hasta en un 33,5% en la semana 8. Posterior a la administración de estreptozotocina se observa una

pérdida de peso, la cual solo fue significativa en la semana 10, es decir luego de la segunda dosis baja de STZ, dicha pérdida fue de aproximadamente 8,7%.

**Tabla 1-5.** Diferencia entre la ganancia o pérdida de peso entre la semana 0 a la semana 10 desde el inicio de la administración de la HFD

Semana de administración de HFD	Grupo que recibe dieta normal peso corporal (g) n=6	Grupo que recibe HFD/STZ Peso corporal (g) n=36
Semana 0	22,03 ± 1,54	22,631 ± 1,68
Semana 1	22,60 ± 1,60	24,528 ± 1,68
Semana 2	22,38 ± 1,43	25,556 ± 1,68*
Semana 3	22,55 ± 1,58	26,259 ± 1,96**
Semana 4	22,40 ± 1,60	27,222 ± 2,22****
Semana 5	22,67 ± 1,62	28,191 ± 2,66****
Semana 6	22,83 ± 1,52	28,978 ± 2,82****
Semana 7	22,80 ± 1,58	29,634 ± 2,92****
Semana 8	22,58 ± 1,80	30,209 ± 3,12****
Semana 9	22,67 ± 1,61	29,038 ± 3,28
Semana 10	22,53 ± 1,77	27,596 ± 3,60##

Los datos se expresan como media ± D.E. n=6 para el grupo que recibió dieta normal o n = 36 animales que recibieron HFD. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA unidireccional; \* p<0,01, \*\* p<0,001 o \*\*\*\* p<0,0001 respecto a la semana 0 (inicio de la administración de HFD) o ## p<0,005 respecto a la semana 8 (administración de la SZT).

Los resultados son concordantes con lo esperado en un modelo de diabetes inducida por HFD/STZ, en el cual se ha demostrado que al administrar una dieta rica en grasa ocurre un aumento de peso que a su vez tiende a aumentar con el tiempo (Gilbert et al., 2011; Yang et al., 2014). La pérdida de peso después de la administración de la STZ se puede explicar ya que esta ocasiona una pérdida de peso corporal debido a la degradación de algunas proteínas estructurales (Ma et al., 2017), lo anterior mimetiza la pérdida de peso que ocurre en el transcurso de la DMT2.

El cambio en los niveles de glucosa en sangre (NGS) en ratones se resumen en la [Tabla 1-6](#). Es importante aclarar que 6 ratones no superaron los niveles de 150 mg/dL establecidos en el protocolo para ser clasificados como diabéticos, lo que indica que el modelo tuvo una eficiencia del 83,33%, lo anterior es consecuente con lo reportado previamente por otros autores con protocolos similares (Furman, 2015; Zhang et al., 2008).

Cabe resaltar que tanto el grupo que recibió dieta normal como el grupo que recibió HFD no presentan diferencias significativas en la glicemia a la semana 8, antes de la administración de STZ, esto se justifica teniendo en cuenta que, aunque los pacientes con obesidad tienen un riesgo 28 veces mayor de presentar DMT2 no todos los pacientes la desarrollan; también se ha reportado que los pacientes con obesidad presentan resistencia a insulina pero no hiperglicemia (Algoblan et al., 2014; Barnes, 2011).

Dado lo anterior, es importante administrar STZ para garantizar que las condiciones sean lo más similares a la DMT2, incluyendo la hiperglicemia crónica. Al realizar la administración se observó un aumento del 112% en los NGS a la semana 10 con respecto al inicio del experimento, también todos los 30 ratones presentan NGS mayores a 200 mg/dl. Estos resultados son concordantes con lo obtenido por otros autores que también inducen DMT2 utilizando el mismo modelo (Furman, 2015; Guo et al., 2018).

**Tabla 1-6.** Niveles de glucosa en sangre a la semana 0, semana 8 y semana 10 después de iniciar HFD

Semana	Grupo que recibe dieta normal NGS (mg/dL) n=6	Grupo que recibe HFD/STZ NGS (mg/dL) n=30
Semana 0	112,17 ± 15,20	116,43 ± 12,90
Semana 8	117,00 ± 14,81	123,73 ± 13,18
Semana 10	121,33 ± 8,24	247,07 ± 18,60****

Los datos se expresan como media ± D.E. n=6 para el grupo que recibió dieta normal o n = 30 animales que recibieron HFD. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA unidireccional; \*\*\*\* p<0,0001 respecto a la semana 0 (inicio de la administración de HFD).

El establecimiento del modelo de diabetes es esencial para luego evaluar correctamente el efecto antidiabético de un posible tratamiento, dado que, parte de la sintomatología de los pacientes con DMT2 incluyen la polifagia y la pérdida de peso se determinaron los cambios en el peso y la ingesta de comida de todos los grupos, los cuales se encuentran expresados en la [tabla 1-7](#). Como se puede observar no hubo diferencias significativas en la ingesta de comida respecto a los días de tratamiento en ninguno de los grupos y con respecto al peso solo se encontraron diferencias en el grupo vehículo respecto al inicio del experimento en los días 14 y 21 donde se evidencia una pérdida de peso de un 19,9% y un 21,6% respectivamente.

**Tabla 1-7.** Pesos corporales (g) e ingesta de comida (g/día) de los animales desde el inicio de los tratamientos

Tratamiento administrado	Inicio (día 0)		Día 7		Día 14		Día 21	
	Peso corporal (g)	Ingesta de alimento (g/día)	Peso corporal (g)	Ingesta de alimento (g/día)	Peso corporal (g)	Ingesta de alimento (g/día)	Peso corporal (g)	Ingesta de alimentos (g/día)
Normo-glicémico	26,9 ± 3,6	4,0 ± 0,7	29,0 ± 3,5	4,2 ± 0,7	29,8 ± 3,6	4,2 ± 0,7	30,1 ± 3,5	4,20 ± 0,6
Vehículo	27,0 ± 3,1	4,3 ± 0,9	23,4 ± 3,1	4,2 ± 0,7	21,6 ± 3,2*	4,3 ± 0,6	21,2 ± 3,2*	4,2 ± 0,7
Metformina 250 mg/Kg	27,1 ± 2,9	4,2 ± 0,9	28,7 ± 2,9	4,3 ± 0,7	29,3 ± 3,0	4,4 ± 0,6	29,5 ± 3,0	4,4 ± 0,6
Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg	27,5 ± 3,3	4,2 ± 0,8	28,9 ± 3,3	4,2 ± 0,7	29,3 ± 3,3	4,2 ± 0,7	29,5 ± 3,3	4,1 ± 0,6
Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> 250 mg/Kg	27,1 ± 3,4	4,2 ± 0,8	28,3 ± 3,3	4,2 ± 0,7	28,8 ± 3,4	4,2 ± 0,6	29,0 ± 3,4	4,4 ± 0,9

Los datos se expresan como media ± D.E. n=6. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA de una vía; \* p<0,05 respecto al día 0 (inicio de la administración de tratamientos).

La pérdida de peso en los pacientes con DMT2 ocurre debido a que la resistencia a insulina incrementa el consumo de tejido adiposo y muscular, lo que provoca una reducción del peso corporal total (Ravussin & Smith, 2006). En este caso podemos decir que tanto metformina como el extracto acuoso y la fracción etanólica evitan este proceso, de hecho, previamente se encuentra informado que metformina evita que se reduzca el peso corporal en ratones diabéticos inducidos con HFD/STZ (Han et al., 2021; Sheng et al., 2021) por lo que los datos obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura. Por otra parte, extractos de *P. glandulosa* y de *P. suberosa* demostraron controlar el peso corporal en ratones con el mismo modelo de inducción de diabetes (Queiroz et al., 2018; Sudasinghe & Peiris, 2018). Es de resaltar que es la primera vez que un extracto de *P. ligularis* demuestra este efecto, el cual es un buen indicativo de un efecto antidiabético.

Por último, un extracto etanólico de hojas de morera rico en isoquercetina y astragalina, así como crisina a dosis de 15 mg/Kg y 30 mg/Kg, principales metabolitos de la fracción etanólica de *P. ligularis*, también han demostrado controlar el peso en roedores diabéticos inducidos con HFD/STZ. También el efecto del extracto *P. glandulosa* mencionado con

anterioridad es atribuido a la presencia de flavonoides (Duan et al., 2022; Zhou et al., 2021). Todo lo anterior nos lleva a sugerir que el extracto y la fracción etanólica si tienen un efecto antidiabético ya que el hecho que no se esté observando una pérdida de peso es porque se está consumiendo glucosa para su gasto energético y no grasa corporal y tejido muscular lo que a su vez sería un indicativo de una disminución en la resistencia a insulina en los tejidos periféricos.

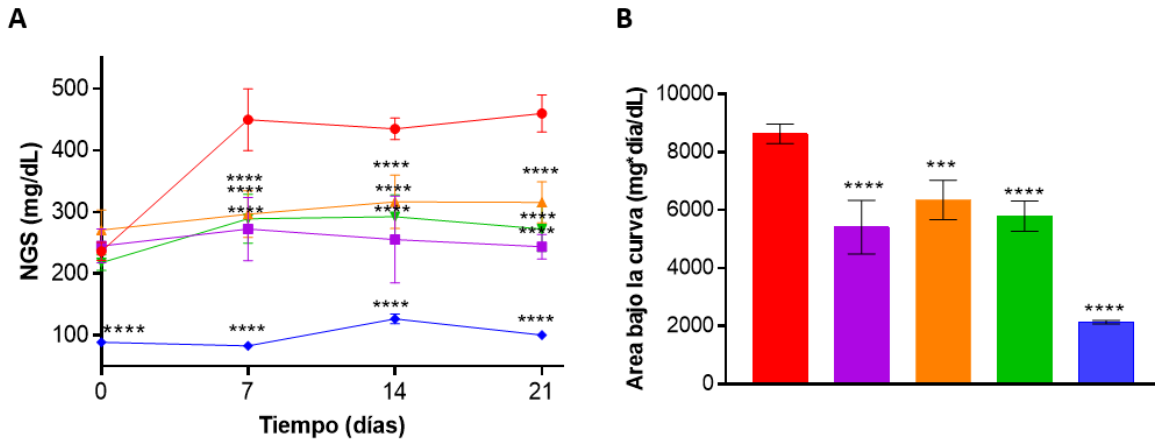
Con respecto a que no se hubieran visto cambios en la ingesta de comida resulta destacable que los extractos de *P. suberosa* tampoco demostraron cambios en este parámetro después de 4 semanas de tratamiento (Sudasinghe & Peiris, 2018), tampoco se observó un cambio en la ingesta de alimentos cuando se administraron 60, 100 o 200 mg/Kg de crisina luego de 4 semanas de tratamiento en ratones obesos (Amir et al., 2022). Lo anterior indicaría que tal vez no sea un síntoma que cambie significativamente o en su defecto que en el modelo planteado este parámetro es difícil de cuantificar.

Sin embargo, los paraclínicos *gold standard* que nos permiten conocer el efecto antidiabético del tratamiento con el extracto acuoso y fracción etanólica de *P. ligularis* son la glicemia, el índice de resistencia a insulina (HOMA), los cambios morfofisiológicos de los tejidos y otros parámetros tales como el estrés oxidativo y el perfil lipídico, los cambios en estos parámetros se detallan en los siguientes apartados.

#### **1.3.4 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos.**

En la [figura 1-3A](#), se puede observar los niveles de glucosa en sangre (NGS) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento, el porcentaje de reducción de la glicemia respecto al vehículo se detalla en la [tabla 1-8](#). Se puede evidenciar que, tanto el extracto acuoso como la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* tienen efectos antihiperглиcemiantes en ratones diabéticos inducidos por HDF/STZ desde los 7 días de tratamiento que se mantuvo hasta los 21 días.

**Figura 1-3. A.** Niveles de glucosa en sangre (NGS) a los 7, 14 y 21 días de tratamiento. **B.** Área bajo la curva de los NGS durante 21 días de tratamiento en ratones diabéticos.



Normoglicémico (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/Kg (púrpura), extracto acuoso de hojas *P. ligularis* 500 mg/Kg (naranja), fracción etanólica de hojas *P. ligularis* 250 mg/Kg (verde). Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E.,  $n = 6$  animales por grupo. Para **A** se utilizó un ANOVA de dos vías y después la prueba de Bonferroni; \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$  respecto al grupo vehículo. Para **B** se utilizó Dunnett posterior a la prueba de ANOVA una vía; \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$  respecto al grupo vehículo.

**Tabla 1-8.** Porcentaje de reducción de glicemia respecto al vehículo a los 7, 14 y 21 días de tratamiento en ratones diabéticos inducidos con HFD/STZ.

Grupo	Días de tratamiento		
	Día 7	Día 14	Día 21
Metformina 250 mg/Kg	39,4%	41,2%	47,0%
Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg	34,0%	27,1%	31,3%
Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> 250 mg/Kg	35,7%	32,7%	40,7%

Con respecto al área bajo la curva (ABC) de la glucosa, la cual se determinó para los 21 días de tratamiento utilizando el método de los trapecios, de acuerdo con la [figura 1-3B](#) y como era de esperarse el grupo que presentó una menor ABC fue los normoglicémicos, la metformina presentó una reducción del ABC de 37,3% respecto al ABC del vehículo mientras que el extracto acuoso y la fracción etanólica presentaron una reducción de 26,4% y 32,9% respectivamente. Es bien conocido que el de este parámetro es un indicador de la eficacia de los medicamentos para controlar la hiperglicemia, ya que un incremento del ABC se correlaciona directamente con un incremento de la glicemia (Floch et al., 1990; Sakaguchi et al., 2016), por lo que este análisis confirma el efecto

antihiperглиcémico del extracto y fracción, siendo este efecto ligeramente mayor en la fracción etanólica.

Como se ha referido con anterioridad el control de la hiperglicemia en la DMT2 es esencial para evitar la aparición de complicaciones renales y cardiovasculares (American Diabetes Association (ADA), 2021b). Los resultados nos indican que tanto el extracto acuoso como la fracción etanólica tienen un efecto en el control de la hiperglicemia, este efecto se vio en mayor proporción en la fracción etanólica.

Previamente, otros extractos de *Passiflora* que demostraron un efecto antihiperглиcemiante en modelos de ratones diabéticos inducidos con STZ, fueron: un extracto del fruto de *P. glandulosa* a los 15, 21 y 28 días de tratamiento, efecto atribuido principalmente a la presencia de flavonoides (Queiroz et al., 2018), 200 mg/Kg de un extracto metanólico de hojas de *P. incarnata* luego de 4, 7, 10 y 15 días de tratamiento, efecto atribuido a flavonoides como la quercetina o el kaempferol (Gupta et al., 2012) y 250 mg/Kg de un extracto etanólico de hojas de *P. edulis* después de 4 semanas de tratamiento en ratas diabéticas (Panchanathan & Rajendran, 2015); por lo que el resultado obtenido coincide con lo reportado por diferentes autores para otras especies del género *Passiflora*.

Aunque previamente también se demostró la reducción de la glicemia de un extracto acuoso de frutos de *P. ligularis* (400 mg/Kg) luego de 30 días de tratamiento en ratas diabéticas inducidas con STZ (Anusooriya et al., 2014) este estudio no realiza una caracterización fitoquímica solo reporta la presencia de flavonoides del extracto y dado que en la presente investigación se utilizaron hojas de *P. ligularis* la composición fitoquímica de diferentes partes de la planta cambia. Por otra parte, también se reportó la reducción de la glicemia por un extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* luego de 14 días de tratamiento en ratas diabéticas inducidas con aloxano (Chippy et al., 2016), este ensayo tampoco realiza una caracterización fitoquímica por lo que no se pueden asociar los metabolitos específicos responsables de dicha actividad, además es de resaltar que un modelo de aloxano es característico para estudiar la DMT1 mientras que el utilizado en esta investigación fue un modelo en ratones diabéticos inducidos con HFD/STZ el cual, como se mencionó anteriormente, es el modelo que asemeja más la DMT2 (Al-Awar et al., 2016; Zhang et al., 2008). Los resultados obtenidos son los primeros en reportar la

reducción de la glicemia por un extracto acuoso y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* luego de 21 días de tratamiento en ratones diabéticos inducidos con HFD/STZ lo que sería un gran indicio de ser un extracto y fracción promisorios en el tratamiento de la DMT2. Por otra parte, la caracterización fitoquímica nos permite reconocer que la fracción etanólica que es la más rica en flavonoides como isoquercetina, astragalina y crisina, presenta mayor reducción de la glicemia que el extracto acuoso por lo que es factible deducir que la presencia de estos flavonoides mejora la actividad antidiabética.

Con respecto a los metabolitos mencionados anteriormente es de resaltar que se ha evidenciado que 40 mg/Kg de isoquercetina redujeron la glicemia en ratones diabéticos inducidos con STZ luego de 45 días de tratamiento (Jayachandran et al., 2018), dosis de 15 mg/Kg y 30 mg/Kg de crisina también demostraron reducir la glicemia después de 5 semanas de tratamiento en ratones diabéticos inducidos con HDF/SZT (Zhou et al., 2021) y 50 mg/Kg de kampferol (aglicona de la astragalina) demostró la reducción de glicemia luego de 6 semanas de tratamiento en ratones diabéticos inducidos con STZ (Alkhalidy et al., 2018). Los anteriores estudios nos llevan a confirmar que el efecto de reducción de la glicemia del extracto acuoso o fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en este estudio se puede asociar a la presencia de estos O-glucosilflavonoides.

Para confirmar el efecto antihiperглиcemiante del extracto o fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en ratones diabéticos se realizó un TTOG.

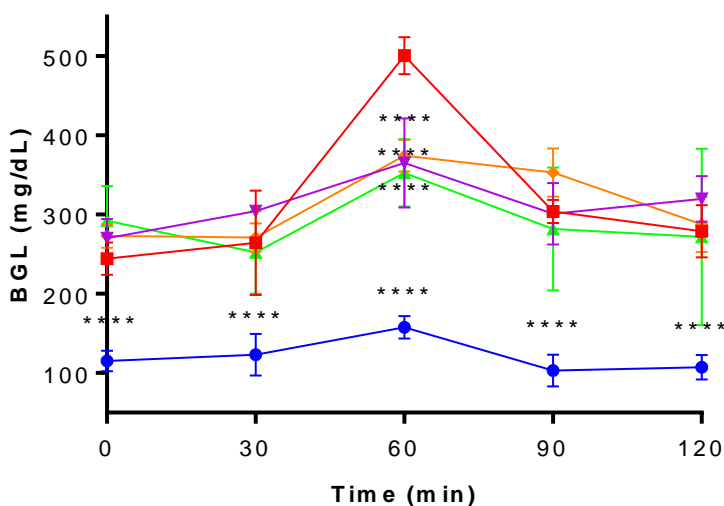
### **1.3.5 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en el TTOG en ratones diabéticos.**

En la [figura 1-4](#) se puede observar que los ratones normoglicémicos presentan diferencias significativas en todo momento respecto al grupo vehículo tras la sobrecarga oral de glucosa realizada el día 21 tras la inducción de diabetes. En cambio, todos los ratones diabéticos que recibieron tratamiento con metformina, el extracto o la fracción presentan una disminución de NGS a los 60 minutos. Mientras que el grupo vehículo eleva sus NGS hasta  $500,7 \pm 23$  mg/dL, los tratamientos redujeron la glicemia en un 27% para metformina,



un 25% para el extracto acuoso y un 29% para la fracción etanólica de *P. ligularis* con respecto al grupo vehículo.

**Figura 1-4.** Prueba de sobrecarga oral de glucosa en ratones diabéticos luego de 21 días de tratamiento



Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n = 6 animales por grupo. Se realizó un ANOVA de dos vías y después la prueba de Bonferroni; \*\*\*\*p <0,0001 respecto al grupo de vehículos.

El TTOG en roedores es una prueba habitual empleada para determinar si un ratón es intolerante a la glucosa y diabético. Sin embargo, esto también es útil para determinar el efecto hipoglicemiante o antihiperглиcemiante de fármacos y extractos, entre otros (Andrikopoulos et al., 2008). Otras especies del género *Passiflora* han informado un efecto antihiperглиcémico similar en modelos diabéticos, por ejemplo, los extractos etanólicos de *P. edulis* y el extracto metanólico de hojas de *P. incarnata* mantienen los niveles de glucosa en sangre mejorando la tolerancia oral a la glucosa en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (Shanmugam et al., 2018).

Cabe destacar que estos resultados confirman este efecto en ratones diabéticos luego de recibir 21 días de tratamiento y que la fracción etanólica tuvo un mayor efecto. De acuerdo con el perfil cromatográfico y estudios previos, nuevamente este efecto puede ser atribuido a los O-glicosil flavonoides ya que se ha demostrado que la isoquercetina disminuye la

glicemia después de una sobrecarga oral de glucosa en ratones diabéticos asociada con una inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) y un aumento en los niveles séricos del péptido similar al glucagón (GLP-1) e insulina (Zhang et al., 2018).

Por último, la crisina también mostró un efecto de reducción de los niveles de glucosa a los 60 minutos después de una sobrecarga oral de glucosa en ratas diabéticas después de 30 días de tratamiento, efecto asociado con un aumento en la sensibilidad de los receptores de insulina, transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT 4), y un aumento en el glucógeno muscular (Satyanarayana et al., 2015).

Dado lo anterior, podemos sugerir que el efecto antihiper glucémico en ratones diabéticos, del extracto acuoso y la fracción etanólica de *P. ligularis*, está asociado a la presencia de los flavonoides mencionados anteriormente.

### 1.3.6 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones diabéticos.

De acuerdo con los resultados descritos en la [tabla 1-9](#), después de 21 días de tratamiento, la glucosa en ayuno disminuye un 23% con el extracto acuoso y un 32% con la fracción etanólica; mientras tanto, la insulina en ayuno disminuye un 46% para el extracto acuoso y un 43% para la fracción etanólica. El índice HOMA disminuye un 58% para el extracto y un 59% para la fracción etanólica; como era de esperarse la metformina también presenta una disminución significativa en los tres parámetros en comparación con el grupo vehículo.

**Tabla 1-9.** Efecto del extracto acuoso y una fracción etanólica de *P. ligularis* sobre la glucosa e insulina en ayuno y el índice HOMA.

TRATAMIENTO	Glucosa en ayuno mg/dL	Insulina en ayuno (μUI/mL)	HOMA-IR
Normoglicémicos	105,60 ± 7,58****	2,27 ± 0,33****	0,59 ± 0,09****
Vehículo	434,00 ± 26,07	23,18 ± 2,53	24,83 ± 2,42
Metformina 250 mg/Kg	347,29 ± 19,50****	15,88 ± 1,75****	13,61 ± 1,34****
Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg	333,80 ± 15,77****	12,49 ± 1,41****	10,29 ± 1,04****

TRATAMIENTO	Glucosa en ayuno mg/dL	Insulina en ayuno ( $\mu$ UI/mL)	HOMA-IR
Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> 250 mg/Kg	292,60 $\pm$ 27,21****	12,99 $\pm$ 1,22****	9,38 $\pm$ 0,79****

Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E. n = 6 animales por grupo. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA una vía; \*\*\*\*p<0,0001 respecto al grupo vehículo.

El modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés), es el más utilizado para determinar la resistencia a la insulina en modelos de diabetes en roedores, ya que es un método simple, preciso y causa un estrés mínimo a los animales. Este modelo matemático relaciona la insulina y la glucosa plasmática en ayuno con el clamp (pinzamiento) de glucosa hiperinsulinémico-euglucémico (HEGC, por sus siglas en inglés) (Antunes et al., 2016).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto y la fracción etanólica disminuyen la resistencia a la insulina, efecto que ya había sido evidenciado en otras especies de *passifloras*. Por ejemplo, el consumo de jugo de *Passiflora setacea* disminuyó el HOMA-IR en humanos, tanto en ayuno como 3 horas después del consumo (Duarte et al., 2020). Asimismo, el extracto de hojas de *Passiflora incarnata* (*P. incarnata*) previene la resistencia a la insulina, y su efecto se asoció fuertemente con la presencia de flavonoides (Sarto et al., 2018). Los resultados encontrados están de acuerdo con reportes previos en la literatura ya que la fracción etanólica disminuye ligeramente los valores de HOMA-IR. Además, previamente se ha demostrado que la isoquercetina disminuye el HOMA-IR de manera dependiente de la dosis en la lesión hepática inducida por diabetes tipo 2 en ratas (Huang et al., 2017). Finalmente, también se ha demostrado que un extracto rico en astragalina disminuye la resistencia a la insulina en un modelo de diabetes inducida con una dieta rica en grasas en ratas (Khlifi et al., 2020).

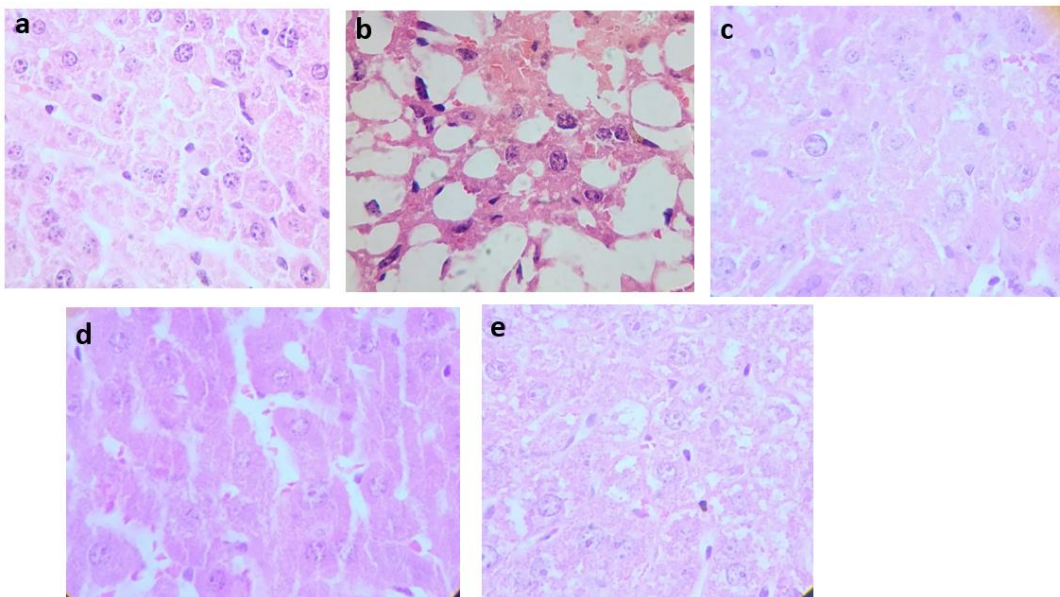
Lo anterior no solo confirma los resultados obtenidos en los apartados 1.3.4 y 1.3.5, sino que además explica estos resultados ya que se observa que los tratamientos al reducir la resistencia a insulina facilitarían la disminución de la glicemia.

### 1.3.7 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en la histopatología hepática, renal y pancreática de ratones diabéticos.

Los tejidos que más se ven afectados en pacientes con DMT2 son el páncreas, el hígado y el riñón (Haligur et al., 2012), por ello luego de 21 días de tratamiento con el extracto y la fracción se realizó el sacrificio, aislamiento y estudio histopatológico de estos órganos.

De acuerdo con la microfotografía que se muestra en la [figura 1-5 \(a-e\)](#), en los grupos que recibieron tratamiento [figura 1-5 \(c, d y e\)](#) se observa que la estructura del tejido hepático se mantiene sin interrupción con algunas vacuolas pequeñas grasas pero sin presencia de infiltrados inflamatorios asociados, ni colestasis. Por su parte la micrografía [1-5b](#) correspondiente al grupo vehículo muestra tejido con arquitectura difusa con una extensa esteatosis de vacuola grande dispersa y algunos hepatocitos con núcleos grandes. Como era de esperar, el grupo normoglicémico ([figura 1-5a](#)) presentó hígado con arquitectura preservada; sin necrosis o presencia de esteatosis o colestasis.

**Figura 1-5.** Microfotografías de tejidos de hígado de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.



Se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron con aumento (10x). Grupos: a) normoglicémico, b) vehículo, c) metformina (250 mg/Kg), d) extracto acuoso de hojas *P. ligularis* (500mg/Kg), e) fracción etanólica de *P. ligularis* (250mg/Kg).

Es importante estudiar el hígado ya que es principal órgano encargado del metabolismo de carbohidratos, en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina se evidencia una hipertrofia de las células hepáticas implicando una hipertrofia nuclear manifestando hepatocitos binucleares, también acumulación de grasas e infiltración linfocitaria, lo que conlleva a reducción del glucógeno hepático, esteatosis grasa, cirrosis e incluso necrosis hepática, entre otras complicaciones vistas también en pacientes diabéticos (Doi et al., 1997; Salih et al., 2009). Por otra parte, en modelos de roedores a los que se administró HDF también se presentó una hipertrofia centrolobular hepática, gotas de lípidos dentro de los hepatocitos, esteatosis hepática y hepatomegalia (Altunkaynak & Ozbek, 2009; Karam et al., 2018). Los resultados del grupo diabético que no recibió tratamiento ([figura 1-5b](#)), coinciden con lo reportado previamente en la literatura, lo que implica que si presenta características similares a los pacientes diabéticos.

Por otra parte, los grupos que recibieron tratamiento tanto metformina como el extracto o fracción de *P. ligularis* demuestran una mayor preservación del tejido frente al grupo vehículo, ya la metformina había demostrado disminuir la hiperplasia hepática y prevenir el daño hepático provocado por la STZ y la HFD (Shaker et al., 2014; Yanardag et al., 2005), asimismo algunas pasifloras, la *P. incarnata*, la *P. nitida* y la *P. edulis* también han demostrado la prevención de daño oxidativo a nivel hepático y la reducción en la aparición de esteatosis hepática (Goss et al., 2018; Sarto et al., 2018; Teixeira et al., 2014).

Se puede observar que las vacuolas grasas son de menor tamaño en la microfotografía de la fracción etanólica ([figura 1-5e](#)) respecto a la del extracto acuoso ([figura 1-5d](#)), dada la presencia en mayor proporción de isoquercetina y astragalina en la fracción este efecto se puede atribuir a la presencia de estos ya que isoquercetina ha exhibido reducir la presencia de gotas de lípidos hepáticos, revertir la esteatosis hepática e incluso la hiperplasia hepática producida por la administración de HFD o STZ (Goss et al., 2018; Jayachandran et al., 2018; Teixeira et al., 2014). Asimismo, extractos ricos en astragalina han demostrado disminuir la acumulación lipídica en hígado, la hepatomegalia y en general el daño hepático (Barge et al., 2021; Kim et al., 2018; Pandeya et al., 2021), incluso en un extracto rico en isoquercetina y astragalina también se evidencia estos mismos efectos a nivel hepático (Li et al., 2020). Lo anterior confirma lo obtenido y la relación entre la isoquercetina y

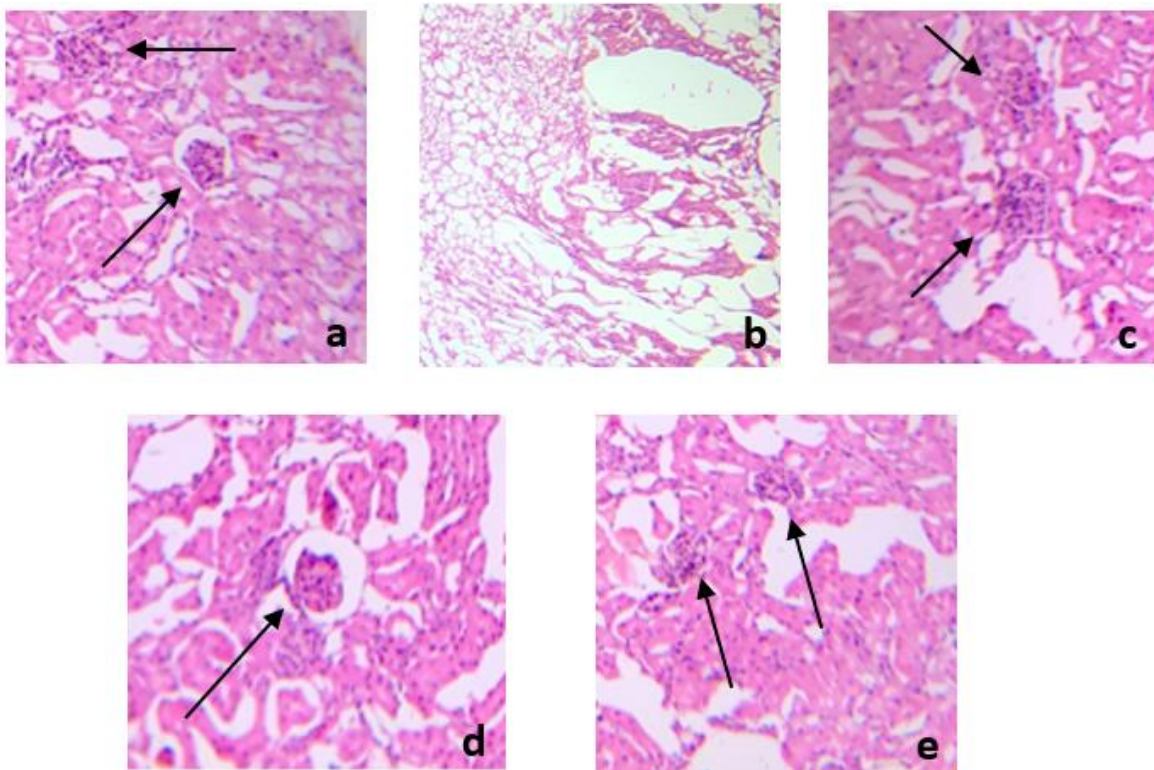
astragalina con una mayor prevención de daño del tejido hepático mostrado por la fracción etanólica.

Es bien conocido que uno de los órganos más afectados en pacientes con DMT2 es el riñón, presentando complicaciones como la nefropatía e insuficiencia renal (Dabla, 2010; Dejager et al., 2014), por ello se estudiaron los cambios en la morfología renal luego del tratamiento con *P. ligularis*.

De acuerdo con la microfotografía que se muestra en la [figura 1-6 \(a-e\)](#), en el grupo normoglicémico ([figura 1-6a](#)) el tejido renal tiene arquitectura preservada, los glomérulos son de tamaño y morfología usual y no se identifican cambios vasculares ni cambios inflamatorios asociados, por el contrario que el grupo vehículo no se observa la presencia de tejido glomerular y una gran infiltración de células inflamatorias ([figura 1-6b](#)), los tejidos de los ratones diabéticos que recibieron tratamiento ([figuras c, d y e](#)) se observan la presencia de glomérulos con leves infiltraciones inflamatorias



**Figura 1-6.** Microfotografías de tejidos de riñón de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.



Se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron con aumento (40x). Grupos: a) normoglicémico, b) vehículo, c) metformina (250 mg/Kg), d) extracto acuoso de hojas *P. ligularis* (500mg/Kg), e) fracción etanólica de *P. ligularis* (250mg/Kg). Flecha negra: señala los glomerulos preservados.

Se ha descrito en estudios previos que tanto la STZ como la HFD provocan daño del tejido glomerular y tubular asociado a la hiperglicemia e hiperlipidemia también la presencia de una hipertrofia tubular y renal que conlleva a degeneración de la arquitectura renal (Chen et al., 2021; Prem & Kurian, 2021; Seyer-Hansen, 1976; Sugano et al., 2006; Tesh & Allen, 2007), lo que coincide con los resultados encontrados en el grupo vehículo, confirmando que el modelo de HFD y dosis bajas de STZ es un modelo que favorece y mimetiza las condiciones de la DMT2 y es útil para la evaluación de sustancias con propiedades antidiabéticas.

La metformina ya había demostrado su efecto protector del daño renal y de la pérdida de la función renales, así como preservación de la integridad estructural y la filtración glomerular (Eisenreich & Leppert, 2017; Zhang et al., 2017), los resultados del tejido renal

obtenidos ([figura 1-6c](#)) están acordes con lo reportado previamente por diversos autores, ya que se observa la arquitectura glomerular conservada con leves infiltraciones inflamatorias, esto mismo se ve en el riñón de los ratones diabéticos tratados con el extracto acuoso y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*. El aumento en el número de glomérulos y nefroprotección también se ha descrito en un extracto acuoso de *P. edulis* asociado a los flavonoides orientina e isoorientina, también el extracto de cáscara de maracuyá púrpura ha demostrado tener efecto nefroprotector asociado a la presencia de flavonoides (Araújo et al., 2022; Nerdy & Ritarwan, 2019); los resultados coinciden con lo evidenciado en otras especies de *Passiflora*.

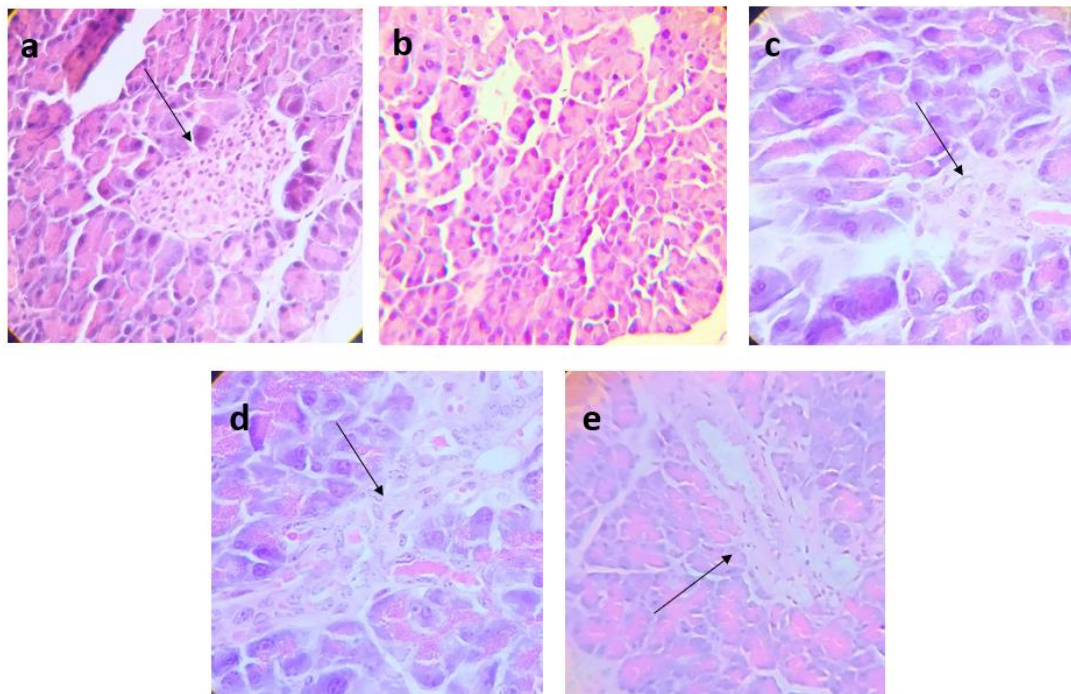
Asimismo, podemos asociar que la presencia de una mayor preservación de la estructura del tejido glomerular y mayor número de glomérulos en el tejido renal de la fracción etanólica frente al del extracto acuoso se debe a la presencia en mayor porcentaje de los flavonoides isoquercetina, astragalina y la presencia de crisina, ya que la isoquercetina ha demostrado presentar tejidos renales con estructuras tubulares renales en buen estado, sin necrosis ni inflamación de túbulo en comparación con el grupo diabético en un modelo de inducción de diabetes con STZ (Jayachandran et al., 2018). Tanto la crisina como la isoquercetina han evidenciado un efecto nefroprotector asociado a la reducción de la apoptosis, inflamación y estrés oxidativo en el tejido renal (Wang et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Por último, se analizó el páncreas. De acuerdo con la microfotografía que se muestra en la [Figura 1-7 \(a-e\)](#), se puede observar que los ratones diabéticos, luego de 21 días de tratamiento con metformina, extracto acuoso y la fracción etanólica de *P. ligularis*, muestran una preservación significativa de los islotes pancreáticos y del tejido exocrino en comparación con los ratones diabéticos que no recibieron tratamiento. La [figura 1-7a](#) muestra islotes normales en los que no se ha sobreestimulado la secreción de insulina, manteniendo su estructura y tamaño. Por otra parte, la [micrografía 1-7b](#) correspondiente al grupo vehículo muestra una degeneración vacuolar citoplasmática, sin componente endocrino. La [figura 1-7c](#) (ratones diabéticos que recibieron metformina) muestra un islote no proliferado en comparación con los otros tratamientos, lo que es coherente con estudios previos que muestran que niveles elevados de glucosa en ratones alimentados con un HFD propician la proliferación de islotes, pero esta se ve disminuida por la administración



de metformina (Tajima et al., 2017). La [figura 1-7d](#) muestra tejido endocrino no hipertrófico en comparación con la figura E, que muestra una estructura difusa e hipertrófica.

**Figura 1-7.** Microfotografías de tejidos de páncreas de diferentes grupos experimentales de ratones diabéticos.



Se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron con aumento (40x). Grupos: a) normoglicémico, b) vehículo, c) metformina (250 mg/Kg), d) extracto acuoso de hojas *P. ligularis* (500mg/Kg), e) fracción etanólica de *P. ligularis* (250mg/Kg). Flecha negra: señala los islotes  $\beta$ -pancreáticos preservados.

Se ha reportado en la literatura que la inducción de la DMT2 por parte de la estreptozotocina provoca degeneración en las células  $\beta$ - pancreáticas y necrosis en los islotes de Langerhans (Haligur et al., 2012; Smirnov et al., 2012). Específicamente, el modelo de inducción por dieta rica en grasa (HFD) y dosis bajas de estreptozotocina (STZ) en ratones, provoca una alteración de las células  $\beta$ - pancreáticas por hipertrofia de los islotes y se ha evidenciado que algunas células se vuelven apoptóticas mientras que otras continúan funcionando normalmente (Nugent et al., 2008), los resultados indican que tanto el extracto como la fracción protegen de la hiperproliferación y daño celular en los islotes pancreáticos lo que concordaría con la reducción de la glicemia y de la resistencia a insulina relacionados a su tratamiento.

Es de resaltar que otros extractos de *Passiflora* han demostrado regenerar y restaurar el tamaño de los islotes  $\beta$ -pancreáticos hiperplásicos de ratones diabéticos inducidos con STZ, por ejemplo, un extracto metanólico de *P. incarnata* luego de 15 días de tratamiento (Gupta et al., 2012), un extracto de cáscaras de frutos de *P. glandulosa* luego de 28 días de tratamiento (Queiroz et al., 2018) y 500 mg/Kg de un extracto etanólico de *Passiflora edulis* (Kandandapani et al., 2015), porque los resultados coinciden con lo reportado en la literatura en otras especies. Así mismo es de resaltar que también la isoquercetina mostró actividad protectora en los islotes pancreáticos que mostraban una morfología similar a los normales (Huang et al., 2017), esto también coincide con lo encontrado en la fracción etanólica, en donde se vio una mayor preservación del tejido ya que la isoquercetina se encuentra en mayor proporción respecto al extracto acuoso de hojas de *P. ligularis*.

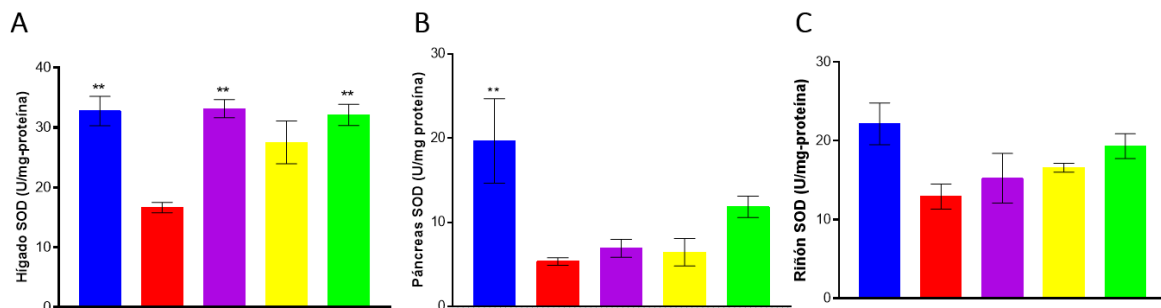
### **1.3.8 Efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en parámetros de estrés oxidativo en ratones diabéticos.**

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la hiperglicemia crónica característica de la DMT2 aumenta la formación de ROS y por tanto el estrés oxidativo, se ha evidenciado que las ROS reducen la secreción de insulina de células  $\beta$ -pancreáticas y promueven la resistencia a la insulina y la inflamación (Chang & Chuang, 2010).

Se encuentra demostrado previamente el rol que cumplen los flavonoides en la disminución del estrés oxidativo especialmente en la prevención del daño oxidativo en células endoteliales la reducción de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y de procesos inflamatorios (Suen et al., 2016). Varios flavonoides entre ellos la quercetina, rutina, isorhamnetina, fisetina, apigenina, baicaleina, genisteína, crisina, diosmina entre otros se han asociado con reducir el estrés oxidativo causado por la hiperglicemia crónica, tener un efecto protector frente a procesos inflamatorios y así asociarlos a un efecto antidiabético (AL-Ishaq et al., 2019; Gupta et al., 2018).

A continuación, se evaluó el rol del extracto acuoso y fracción etanólica sobre la superóxido dismutasa, catalasa y la peroxidación lipídica a nivel renal, hepático y pancreático y su posible relación con la presencia de los flavonoides isoquercetina y astragalina.

**Figura 1-8.** Efecto de *P. ligularis* sobre la superóxido dismutasa (SOD) en ratones diabéticos.



Normoglicemiant (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/Kg (morado), extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* 500 mg/Kg (amarillo), fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* 250 mg/Kg (verde). Actividad SOD: **A)** hígado, **B)** páncreas, **C)** riñón. Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n = 6 animales por grupo. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA una vía; \*\*p<0,01 respecto al grupo vehículo.

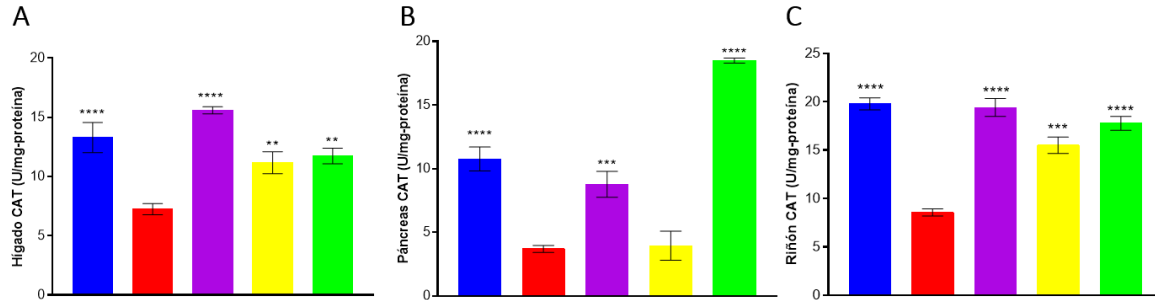
La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se muestra en las [Figuras 1-8B](#) y [1-8C](#). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos normoglicémico y vehículo en los tejidos de páncreas y riñón. En tejido hepático ([Figura 1-8A](#)), la actividad de esta enzima aumentó un 39 % para el extracto acuoso, en un 48 % para la fracción y en un 50 % para metformina en comparación con el vehículo.

Respecto a la actividad catalasa (CAT), como se muestra en la [Figura 1-9A](#), en el hígado, el extracto acuoso aumenta la actividad catalasa en un 35%, mientras que la fracción etanólica lo hace en un 38% respecto al vehículo. De acuerdo con la [Figura 1-9C](#), en el riñón, la actividad de la catalasa aumenta en un 44% en el extracto acuoso y en un 51% para la fracción etanólica en comparación con el vehículo. Finalmente, según la [Figura 1-9B](#), si bien el extracto acuoso no incrementó la actividad catalasa en el páncreas, la fracción etanólica sí la incrementó en un 80% respecto al vehículo. La metformina mejora la actividad de la catalasa en todos los órganos.

La SOD y CAT son enzimas antioxidantes que disminuyen la producción de ROS, protegen contra el estrés oxidativo, la nefropatía y otras complicaciones de la DMT2. CAT también

protege las células beta pancreáticas del daño causado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El aumento de los niveles de MDA en diabéticos sugiere que las lesiones peroxidativas están relacionadas con el desarrollo de complicaciones diabéticas y una disminución de los mecanismos antioxidantes (Tiwari et al., 2013).

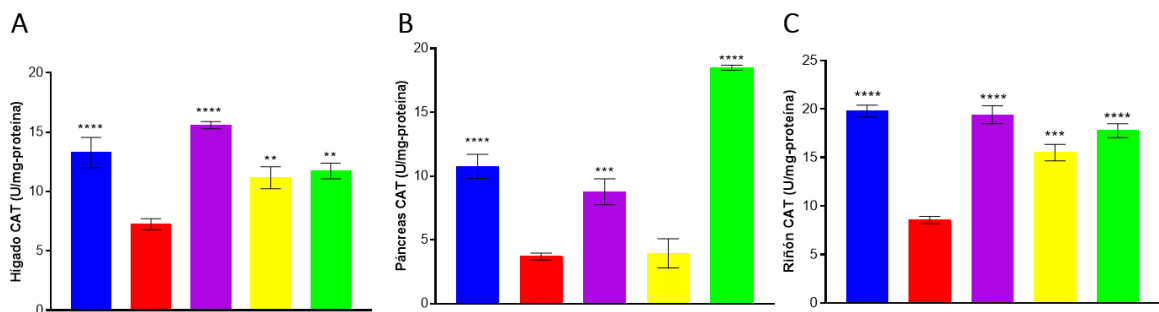
**Figura 1-9.** Efecto de *P. ligularis* sobre la catalasa (CAT) en ratones diabéticos.



Normoglicemiante (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/Kg (morado), extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* 500 mg/Kg (amarillo), fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* 250 mg/Kg (verde). Actividad CAT: **A**) hígado, **B**) páncreas, **C**) riñón. Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n = 6 animales por grupo. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA una vía; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001 respecto al grupo vehículo.

En cuanto a los niveles de peroxidación lipídica y malondialdehído (MDA), como se muestra en la [Figura 1-10A](#), el extracto acuoso disminuye en un 35% y la fracción en un 37% los niveles de MDA en comparación con el grupo vehículo a nivel hepático. Según la [Figura 1-10C](#), en riñón, el extracto acuoso disminuye un 42% y la fracción un 55% los niveles de MDA respecto a ratones diabéticos sin tratamiento. Finalmente, en el páncreas ([Figura 1-10B](#)), el extracto acuoso disminuye en un 70% y la fracción etanólica en un 80% los niveles de MDA respecto al vehículo. Como era de esperar, los ratones normoglicémicos muestran una mayor actividad de catalasa y SOD y niveles más bajos de MDA en todos los órganos.

**Figura 1-10.** Efecto de *P. ligularis* sobre la peroxidación lipídica (MDA) en ratones diabéticos.



Normoglicemiante (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/Kg (morado), extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* 500 mg/Kg (amarillo), fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* 250 mg/Kg (verde). Actividad MDA: A) hígado, B) páncreas, C) riñón. Los datos se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n = 6 animales por grupo. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA una vía; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001 respecto al grupo vehículo.

Los resultados indican que, solo la fracción etanólica demostró mejorar la actividad de la SOD hepática, sin embargo, la actividad de la CAT mostró una mejora en todos los órganos estudiados, lo que indica que el efecto antioxidante está más relacionado con el metabolismo del  $H_2O_2$ . Estos resultados se pueden correlacionar con lo analizado histopatológicamente ya que la reducción del estrés oxidativo está directamente relacionada con un menor daño e inflamación tisular (Ibtissem et al., 2017).

Otras especies de *Passiflora* que distintos autores han reportado tener una mejora de los parámetros antioxidativos y su relación con el efecto antidiabético son: 500 mg/Kg de un extracto etanólico de *P. edulis*, que causó reducción de niveles de SOD, CAT y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a nivel hepático y renal (Kandandapani et al., 2015), también un extracto de *P. incarnata* L. con flavonoides como la quercetina y el kaempferol (agliconas de la isoquercetina y astragalina respectivamente) mostró después de 30 días de tratamiento una disminución en los niveles de MDA a nivel hepático en ratones que recibieron una dieta rica en grasas (Sarto et al., 2018), incluso un extracto acuoso de frutos de *P. ligularis* que disminuyó niveles hepáticos, renales y pancreáticos de SOD, CAT y glutatión (Anusooriya et al., 2014); estos efectos han sido asociados a la presencia de algunos metabolitos como los flavonoides.

Asimismo, dado que la fracción etanólica tuvo un efecto antioxidante más significativo, se puede asociar a flavonoides como la crisina, que puede ser responsable de este efecto, ya que previamente ha mostrado una disminución en los niveles de MDA y un aumento en la actividad de SOD y CAT en el hígado, cerebro y páncreas de ratas diabéticas después de 4 semanas de tratamiento (Samarghandian et al., 2016), la quercetina también ha demostrado reducir el estrés oxidativo en ratones diabéticos inducidos con aloxano (Alam et al., 2014) y es de resaltar que el efecto hepatoprotector asociado a isoquercetina se debe a la mejora de los niveles de SOD, MDA y glutatión hepático (Huang et al., 2017). Del mismo modo, el extracto acuoso de hojas de *M. oleifera* rico en flavonoides como la isoquercetina y la astragalina ha mostrado un aumento en los niveles de CAT, SOD y una disminución para reducir los niveles de MDA a nivel hepático y renal en ratas diabéticas (Oldoni et al., 2021).

Todo lo anterior reafirma que el efecto antidiabético se puede asociar a la reducción del estrés oxidativo que a su vez conlleva a reducción del daño tisular hepático, pancreático y renal y que se relaciona con una menor resistencia a insulina y una reducción de los niveles de glucosa en sangre.

### 1.3.9 Análisis del efecto del extracto y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en el perfil lipídico sérico en ratones diabéticos.

Los defectos en la acción de la insulina o la hiperglicemia podrían estar asociados con cambios en el metabolismo de los lípidos/lipoproteínas en plasma en pacientes con diabetes (Goldberg, 2001). La hipertrigliceridemia y la reducción del colesterol de lipoproteínas de alta densidad en plasma son las anomalías lipídicas más frecuentes en la DMT2 (O'Brien et al., 1998). Debido a la relación entre diabetes e hiperlipidemia, en este estudio se consideró la cuantificación de triglicéridos totales, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total (CT).

**Tabla 1-10.** Efecto del extracto acuoso de *P. ligularis* 500 mg/Kg y la fracción etanólica de *P. ligularis* sobre el perfil lipídico sérico en ratones diabéticos.

TRATAMIENTO	Triglicéridos (TG)	Colesterol total	LDL-C mg/dL	HDL-C mg/dL
-------------	--------------------	------------------	-------------	-------------

	mg/dL	mg/dL		
Normoglicémico	96,87 ± 2,23	140,28 ± 15,35	88,82 ± 25,78	37,84 ± 1,93
Vehículo	225,51 ± 13,34	252,08 ± 5,48	174,66 ± 17,53	28,92 ± 0,08
Metformina 250 mg/Kg	169,61 ± 3,62****	159,78 ± 4,81****	98,44 ± 13,63***	36,73 ± 4,82**
Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> 500 mg/Kg	159,45 ± 7,07****	207,41 ± 17,58*	131,46 ± 25,95*	34,26 ± 2,21*
Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> 250 mg/Kg	157,16 ± 0,43****	162,70 ± 13,79****	117,34 ± 2,45**	36,24 ± 1,98**

LDL-C-colesterol de lipoproteínas de baja densidad, HDL-C-colesterol de lipoproteínas de alta densidad. Los datos se expresan como media ± DE. n = 6 animales por grupo. Dunnett posterior a la prueba de ANOVA de una vía; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001 respecto al grupo de vehículo.

Según la [tabla 1-10](#), los TG disminuyeron un 29% para el extracto acuoso y un 30% para la fracción etanólica. El parámetro de colesterol total disminuyó un 17% para el extracto acuoso y un 35% para la fracción de etanol. Los niveles de LDL-C disminuyen un 24% para el extracto acuoso y un 32% para la fracción etanólica. Finalmente, el HDL-C aumenta un 18% para el extracto acuoso y un 25% para la fracción etanólica respecto al vehículo. Por su parte, como era de esperarse la metformina también mostró una mejora en el perfil lipídico (Anurag & Anuradha, 2002).

Este efecto podría estar relacionado con la actividad protectora del extracto acuoso y la fracción etanólica de las hojas de *P. ligularis* sobre el páncreas ya que, como se evidenció previamente, en el análisis histopatológico mostró que ambos tratamientos encontraron componentes endocrinos asociados con los islotes pancreáticos. Cuando la producción o liberación de insulina es deficiente el proceso de lipólisis no se inhibe, provocando hiperlipidemia (Ginsberg et al., 2005). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los animales tratados con el extracto acuoso y la fracción etanólica de *P. ligularis* atenuaron la resistencia a la insulina, lo que podría estar relacionado con la disminución de TG, colesterol total y LDL con el aumento de HDL en comparación con animales diabéticos a los que se administró el vehículo. Así mismo también se puede correlacionar la mejoría en el perfil lipídico con la menor presencia de esteatosis hepática a nivel hepático.



Reportes previos de la literatura han demostrado que diferentes especies del género *Passiflora* ocasionan cambios en el perfil lipídico sérico de roedores. Por ejemplo, la *P. incarnata* disminuyó el impacto de una dieta alta en grasas en ratones normoglicémicos, reduciendo los niveles de colesterol total y triglicéridos y aumentando la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Sarto et al., 2018). También se reporta en la literatura, un comportamiento similar para el extracto metanólico de esta especie en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (Gupta et al., 2012). También se ha evidenciado que la administración oral del extracto del fruto de *P. ligularis* (400 mg/Kg) mejora el perfil lipídico en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, atribuyéndose estos resultados al aumento de la secreción de insulina inducida por el extracto de *P. ligularis* (Anusooriya et al., 2014), sus efectos pueden asociarse con la presencia de flavonoides. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con estudios previos que demostraron la actividad antihiperlipidémica de la isoquercetina en una dosis dependiente que atenuó los niveles de triglicéridos y colesterol en ratones diabéticos (Zhang et al., 2018), así como también se ha demostrado que un extracto rico en astragalina disminuye el colesterol, los triglicéridos, el LDL y aumenta el HDL en ratas Wistar con diabetes inducida por una dieta rica en grasas y fructosa (Khlifi et al., 2020).

Para finalizar, la [tabla 1-11](#) resume los resultados obtenidos, expresados en porcentaje de reducción o aumento respecto al vehículo, de los diferentes parámetros bioquímicos medidos para evaluar el efecto antidiabético del extracto acuoso y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*.

**Tabla 1-11.** Porcentaje de reducción o aumento de diferentes parámetros bioquímicos después de 21 días de tratamiento con un extracto acuoso o fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* respecto al vehículo.

Tratamiento		Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> (500 mg/Kg)	Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> (250 mg/Kg)
Parámetro medido			
ABC de glucosa durante los 21 días de tratamiento		↓26,4%	↓32,9%
Glicemia a los 60 min después de una SOG		↓25%	↓29%
HOMA-IR		↓58%	↓59%
SOD hepática		Aumento no significativo	↑48%
CAT	Hepática	↑35%	↑38%
	Renal	↑44%	↑51%
	Pancreática	Aumento no significativo	↑80%



Tratamiento		Extracto acuoso de hojas de <i>P. ligularis</i> (500 mg/Kg)	Fracción etanólica de hojas de <i>P. ligularis</i> (250 mg/Kg)
Parámetro medido			
MDA	Hepática	↓35%	↓37%
	Renal	↓42%	↓55%
	Pancreática	↓70%	↓80%
Triglicéridos (TG) (mg/dL)		↓29%	↓30%
Colesterol total (mg/dL)		↓17%	↓35%
LDL (mg/dL)		↓24%	↓32%
HDL (mg/dL)		↑18%	↑25%

## 1.4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que:

En animales normoglicémicos solo 500 mg/Kg de extracto acuoso o 500 mg/Kg de fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* demuestran no aumentar significativamente los niveles de glucosa en sangre frente a roedores que no recibieron tratamiento después de una sobrecarga oral de glucosa, por lo que se deduce que solo el extracto acuoso y fracción etanólica tienen efecto antihiperlicemiante y podrían llevar a controlar la hiperglicemia en un tratamiento crónico, también se infiere que los metabolitos menos polares del extracto acuoso son los responsables de dicho efecto ya que 500 mg/Kg de fracción acuosa tampoco demostró ejercer este efecto.

En el análisis cromatográfico se encontró que la fracción etanólica tiene 121,4% más de concentración de flavonoides que el extracto acuoso y que sus metabolitos mayoritarios son la isoquercetina que se encuentra aumentada en un 241,8 % y la astragalina que se encuentra aumentada en un 227,3 %, frente al extracto acuoso. También se evidenció que la presencia de O-glicosilflavonoides es mayor en el extracto acuoso y fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* que en otras especies de *Passiflora* donde predominan los C-glicosilflavonoides.

En un modelo de diabetes inducida en ratones con dieta rica en grasa y dosis bajas de estreptozotocina se determinó que tanto el extracto acuoso como la fracción etanólica reducen la glicemia a los 7, 14 y 21 días de tratamiento. Luego de los 21 días de tratamiento

se determinó que también tienen un efecto antihiperlicemiante en un test de tolerancia oral a la glucosa, que reducen la resistencia a insulina, mejoran los niveles de catalasa, reducen la peroxidación lipídica, reducen los triglicéridos, colesterol y LDL y aumentan las HDL ([ver tabla 1-11](#)).

En el análisis histopatológico se encontró que el hígado, riñón y páncreas de los ratones diabéticos tratados tanto con el extracto como con la fracción se encontraban con estructuras menos alteradas, una menor hiperplasia y menos signos de inflamación frente a los ratones diabéticos no tratados.

Todos lo anterior nos lleva a concluir que tanto 500 mg/Kg de extracto acuoso y 250mg/Kg de fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* tienen un efecto antidiabético, al comparar los resultados de estos dos tratamientos se evidenció que la fracción etanólica presenta mejores resultados en todos los parámetros bioquímicos determinados (ver [tabla 1-11](#)) y también los órganos se encuentran cualitativamente en mejor estado, presentando más islotes  $\beta$  pancreáticos preservados y menos signos de inflamación. Correlacionando estos resultados con lo encontrado en el perfil cromatográfico podemos concluir que el efecto antidiabético de la fracción etanólica se puede asociar a sus dos metabolitos mayoritarios, la isoquercetina y la astragalina, por lo que en siguiente capítulo se evaluó el posible mecanismo de acción por el cual estos dos metabolitos ejercen su mecanismo de acción.

## 1.5 Productos de investigación obtenidos:

**Artículo para sometimiento:** Extract of leaves from *Passiflora ligularis* ameliorative insulin resistance, pancreatic damage and lipid profile on high fat-diet/streptozotocin-induced diabetic mice.

## **2.Evaluación de los posibles mecanismos de acción de los flavonoides isoquercetina y astragalina.**

### **2.1 Aspectos teóricos: Absorción y transporte de glucosa.**

La glucosa es la principal fuente de energía y combustible de la mayoría de las células, se puede obtener del consumo de comida, así como de glucogenólisis y gluconeogénesis, así como de precursores como el glicógeno, ribosa, glicolípidos, glicoproteínas entre otros (Nakrani et al., 2021; Nordlie et al., 1999). Los carbohidratos consumidos en los alimentos, usualmente polisacáridos, se transforman en monosacáridos (glucosa o fructosa) mediante las enzimas salivales, pancreáticas y enzimas digestivas y se absorben en las células epiteliales de la mucosa intestinal o enterocitos (Drozdowski & Thomson, 2006).

Las carbohidrasas intestinales o glucosidasas, presentes en los enterocitos, son enzimas relevantes en la transformación de oligosacáridos a glucosa, especialmente las  $\alpha$ -amilasas que rompen polisacáridos, hidrolizando enlaces  $\alpha$ -1,4-glucano del almidón, a oligosacáridos y disacáridos, y las  $\alpha$ -glucosidasas que degradan los oligo y disacaridos a glucosa (Fallah et al., 2022; Tundis et al., 2010). Luego de dicha hidrólisis, estos azúcares son absorbidos en las células epiteliales intestinales para llegar a circulación plasmática y ser distribuidos a los diferentes tejidos, esta absorción y captación de glucosa ocurre mediante transportadores específicos, los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: los transportadores dependientes de sodio o proteínas de transporte sodio-glucosa (SGLT) y los transportadores de glucosa por medio de la difusión facilitada (GLUTs) (Scheepers et al., 2004).

### 2.1.1 Transportadores de glucosa.

Los SGLT son transportadores de glucosa dependientes del gradiente electroquímico proporcionado por la bomba de sodio-potasio, guardan un 57 % a 71 % de identidad de secuencia de aminoácidos y se clasifican de la siguiente forma:

SLGT1: Cotransportadores de iones de sodio y moléculas de glucosa en una proporción de 2:1, ubicados principalmente en el intestino, transportan de la membrana apical a la membrana basolateral.

SLGT2: Cotransportadores de iones de sodio y moléculas de glucosa en una proporción de 1:1, ubicados en su mayoría en el túbulo proximal renal.

SLGT3: localizados en intestino, bazo, hígado, riñón y músculo, su actividad glucosensorial se vincula al sistema nervioso entérico y a la acetilcolina.

SGLT4 y SGLT6: transportadores multivitamínicos y

SGLT5: transportador de yoduro de tiroides (Scheepers et al., 2004; Wood & Trayhurn, 2003).

Por otra parte, los transportadores de glucosa por medio de la difusión facilitada (GLUTs) en humanos consisten en 14 miembros divididos en 3 subfamilias basados en su similitud filogenética: la clase I, que incluye los GLUTs 1 a 4 y 14, los cuales presentan entre 55 % a 95% de identidad en sus secuencias, los de clase II que incluye los GLUTs con actividad de transporte de fructosa y glucosa que incluyen los GLUTs 5, 7, 9 y 11, con 42%-59% de identidad y la clase III que comprende los GLUTs 6, 8,10 y 12 que presentan 35% a 45% de identidad (Scheepers et al., 2004).

Dentro de las funciones fisiológicas de los GLUTs, encontramos que: los GLUT1 ubicados en eritrocitos y barrera hematoencefálica son transportadores de alta afinidad de la glucosa basal; los GLUT2 expresados en hígado, riñón y células beta pancreáticas, facilitan captación y transporte de glucosa y fructosa por hígado y páncreas; los GLUT3 son transportadores de glucosa en tejidos con alto requerimiento como las neuronas; los GLUT4 responden a la estimulación de la insulina para ser traslocados del citosol a la membrana plasmática del tejido adiposo, musculatura esquelética y cardíaca; los GLUT5, transportan principalmente fructosa en el intestino y espermatozoides y los GLUT 6 a 12 se ubican en diferentes tejidos y su rol en la homeostasis de la glucosa no ha sido del todo dilucidada

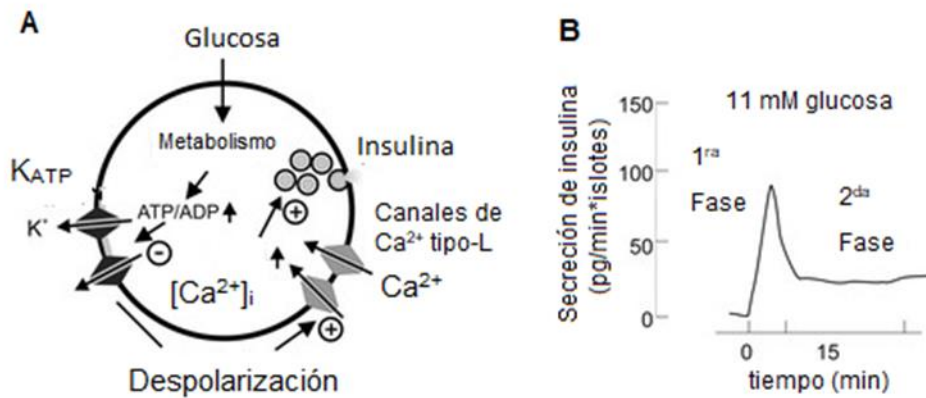
(Gorovits & Charron, 2003; Scheepers et al., 2004; Wood & Trayhurn, 2003). A continuación, se van a describir más en detalle los transportadores GLUT-2 y GLUT-4 por ser de especial interés en el presente estudio.

El rol que desempeñan los GLUT-2 ubicados en las células  $\beta$ -pancreáticas está relacionado con la captación de glucosa e iniciar la síntesis de insulina, esta da comienzo a partir de la preproinsulina, un péptido de 11.500 Daltons que consta de una cadena A con 30 aminoácidos, un péptido conector de 31 aminoácidos (péptido C) y una cadena B de 24 aminoácidos, este precursor se traslada desde los ribosomas hasta retículo endoplásmico (ER) y a través de una peptidasa se escinden 24 residuos de aminoácidos para biotransformarse en proinsulina (Morimoto, 2000; Vasiljević, et al., 2020).

La proinsulina sintetizada pesa entre 8.000 a 10.000 Daltons se pliega y forma tres enlaces disulfuro entre la cadena A y la cadena B luego se desplaza del ER hasta el aparato de Golgi donde por efecto de dos endopeptidasas se separa el péptido C para formar la insulina madura que se almacena en los islotes pancreáticos en forma de gránulos (Liu et al., 2018; Patel & Dutta, 2018).

La insulina se libera de los gránulos que la almacenan en respuesta a la entrada de glucosa, este proceso lo realiza en dos fases: la primera es una respuesta inmediata y ocurre en los primeros minutos y una segunda fase que puede alcanzar su pico a los 30 o 40 minutos. El aumento de glucosa en sangre se detecta por la glucoquinasa quien la transforma a glucosa 6 fosfato, luego por vía glucolítica es metabolizada a piruvato y se aumenta la síntesis de ATP en la mitocondria (Jitrapakdee et al., 2010). Como se observa en la [Figura 2-1A](#), el aumento del ATP/ADP citosólico, fosforila y cierra los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), reduce el influjo de  $K^+$  y despolariza la membrana de las células  $\beta$ -pancreáticas. Esta despolarización abre los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), aumenta el calcio citosólico libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ), esto conduce a la movilización, fusión y liberación de gránulos que contienen insulina (Ashcroft & Rorsman, 2013; Rorsman et al., 2000). Tal y como se observa en la [Figura 2-1B](#), aproximadamente un 3% de la insulina es liberada en la primera fase. Ya en la segunda fase, la cual puede mantenerse por horas, cerca del 20% del contenido de insulina es liberada de las células  $\beta$ -pancreáticas (Henquin, 2011; Rorsman et al., 2000).

**Figura 2-1.** Mecanismo de secreción de insulina inducida por glucosa y perfil bifásico de secreción de insulina en células beta pancreáticas.



**A.** secreción de insulina mediada por el metabolismo de la glucosa, el aumento del ATP/ADP citosólico, el cierre de los  $K_{ATP}$ , la despolarización de la membrana, la apertura de los CCDV y el aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ . **B.** perfil bifásico de secreción de insulina inducida por la elevación de 11 mM glucosa, nótese la presencia de una primera fase rápida (que dura 10 min) y una segunda fase más lenta. Figura adaptada de (Rorsman et al., 2000).

Como se ha descrito anteriormente, la reducción en la producción de y resistencia a la insulina es reconocidas como las causas principales de la DMT2. En población prediabética, en las células  $\beta$ -pancreáticas se aumenta la secreción de insulina y los pacientes presentan hiperinsulinemia para compensar la resistencia a insulina y regular la glicemia. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad la resistencia a insulina va aumentando mientras que el mecanismo compensatorio disminuye, lo que conlleva a un deterioro de la captación de glucosa en el músculo y un aumento de la gluconeogénesis en el hígado que resulta en hiperglicemia, tanto en ayuno como en estados posprandiales (Ormazabal et al., 2018; Roberts et al., 2013). Se ha evidenciado que la hiperglicemia e hiperinsulinemia conllevan a una desregulación en la expresión del GLUT2 a nivel hepático y por consiguiente a un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa (Gorovits & Charron, 2003).

Una vez la insulina es liberada de las células  $\beta$ -pancreáticas al torrente sanguíneo, se une al receptor de insulina en el tejido muscular o adiposo. El receptor de insulina es un

holoreceptor heterotetramérico, que consta de una subunidad  $\alpha$  extracelular (la que se une a insulina) y una subunidad  $\beta$  transmembranal que es una tirosin quinasa, al ligarse la insulina a la subunidad  $\alpha$  ocurre un cambio conformacional que implica la autofosforilación de distintos residuos de tirosina de la subunidad  $\beta$ . La activación de las quinasas celulares se hace a través del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) lo que promueve la traslocación de las vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática para aumentar el transporte de glucosa (Youngren, 2007).

Se ha evidenciado que, en la DMT2, uno de los principales mecanismos de resistencia a insulina asociado a su vez a la disminución de la captación de glucosa, se debe a la reducción en la expresión de los GLUT 4 (Fazakerley et al., 2019). Anteriormente se indicó que estos son transportadores de glucosa que responden a la cascada de señalización de la insulina y se encuentran ubicados predominantemente en tejido adiposo y musculatura esquelética. Las vesículas que contienen estos transportadores se tienen que traslocar y fusionar con la membrana plasmática celular, estos procesos son proporcionales a la captación de glucosa y depende de varias proteínas adaptadoras, entre las que se consideran relevantes los receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida (SNARE) (Gorovits & Charron, 2003).

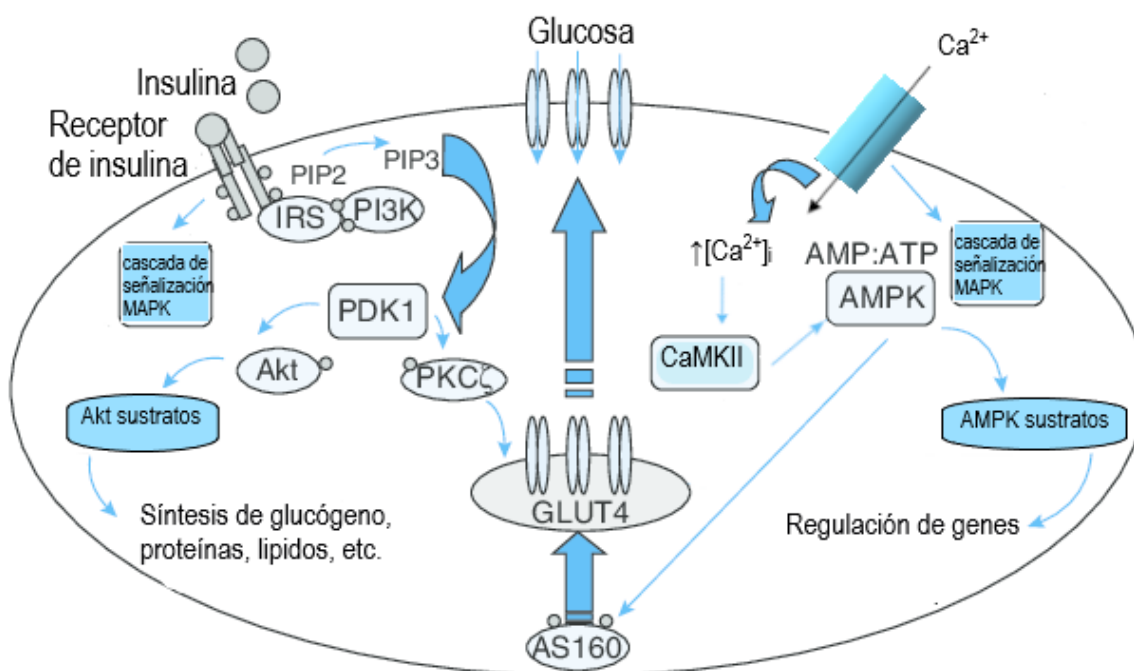
La vía PI3K también se estimula por el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio  $[Ca^{2+}]_i$ , mediados por la contracción muscular que se realiza durante el ejercicio, involucrándose la enzima quinasa dependiente de calcio/ calmodulina II (CaMKII), la cual se activa por la formación del complejo calcio/calmodulina el cual, a su vez, se forma entre el calcio citosólico y la proteína transportadora de calcio, la CaMKII fosforila proteínas sustrato en residuos de serina y treonina (Ojuka et al., 2012). La CaMKII interactúa con otras quinasas relacionadas con la síntesis y traslocación del GLUT4, como la serina/treonina quinasa Akt (proteína quinasa B), lo que culmina en la activación de PI3K (Joseph et al., 2021).

Aparte de la activación de los GLUT4 por la vía PI3K, existen otras vías de traslocación de GLUT4 independiente de insulina como la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), presente en el tejido esquelético muscular, la cual depende de la concentración de oxígeno y el recambio de ATP. Se ha demostrado que esta vía se activa al realizar

ejercicio, debido a que al realizar actividad física el recambio de ATP puede aumentar más de 100 veces (Gorovits & Charron, 2003; Kjøbsted et al., 2018). De acuerdo con la anterior información por ello se recomienda la realización de ejercicio a pacientes con DMT2, dado que esto aumentaría la síntesis y traslocación de GLUT4 y la sensibilidad a insulina tisular (Friedrichsen et al., 2013).

La relación entre las diferentes proteínas quinastas (PI3K y AMPK) y el calcio con los transportadores de glucosa del músculo esquelético se puede observar en la [figura 2-2](#).

**Figura 2-2.** Vía de señalización intracelular del músculo esquelético posterior a la activación del receptor de insulina.



La insulina activa varias proteínas quinastas de señalización intracelular que participan en el mecanismo de captación de glucosa dependiente de insulina. Fosfatidilinositol bisfosfato (PIP2), fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), proteína quinasa-1 dependiente de la proteína 3-fosfoinosítido (PDK1), sustrato del receptor de insulina (IRS), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa activada por AMP (AMPK), enzima quinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), proteína quinasa B (Akt) y transportador glucosa (GLUT4). Adaptado de (Hawley et al., 2006).



### **2.1.2 Rol de los canales de potasio y calcio en la secreción de insulina.**

El páncreas es un tejido glandular compuesto por dos compartimientos uno exocrino y uno endocrino que coexisten en equilibrio (Rickels et al., 2020). La función exocrina, que consiste en células acinares, produce enzimas digestivas como la tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa para digerir proteínas, carbohidratos y triglicéridos (Pandol, 2011). Por otra parte, la función endocrina que consiste en islotes de Langerhans, libera hormonas al torrente sanguíneo, principalmente insulina y glucagón que se liberan según los requerimientos de glucosa en la sangre (Koh et al., 2012).

Los islotes de Langerhans se clasifican en 5 tipos de células productoras de hormonas: aproximadamente un 30 % corresponde a células  $\alpha$  productoras de glucagón, alrededor de 60 % corresponde a células  $\beta$  productoras de insulina, y un 10 % de células  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -productoras de grelina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente (Da Silva Xavier, 2018). Se ha evidenciado que, en el transcurso de la DMT2, debido a la hiperglicemia se observa una reducción en la masa y un deterioro de las células  $\beta$  y un aumento de las células  $\alpha$ , lo que resulta en un aumento del glucagón y un déficit de insulina (Breton et al., 2014).

La liberación de la insulina de los islotes pancreáticos está regulada por la captación de glucosa mediada por los transportes de glucosa (GLUT), en roedores se ha evidenciado que están involucrados los GLUT1 y GLUT2, mientras que en humanos se relacionan con los GLUT1 y GLUT3 (Berger & Zdzienko, 2020; Tal et al., 1992). Dicha captación de glucosa activa la glucoquinasa que fosforila la glucosa y posteriormente se metaboliza a piruvato, la oxidación mitocondrial del piruvato a su vez da como resultado una acumulación de ATP, que cierra los canales de potasio dependientes de ATP ( $K^{+}_{ATP}$ ), causando una despolarización de la membrana y posteriormente la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs); por último el aumento de la concentración de calcio citosólica promueve la liberación de insulina en los islotes  $\beta$ - pancreáticos (Berger & Zdzienko, 2020; Skelin Klemen et al., 2017).

### 2.1.3 Canales de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ )

Se han reconocido al menos tres tipos de canales de  $K^+$  involucrados en la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células  $\beta$  del páncreas: los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}^+$ ), los canales de potasio activados por calcio (KCa), activados en respuesta al aumento en las concentraciones de calcio intracelular y los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) que se puede dividir en cuatro familias Kv1-4 (B. H. Choi & Hahn, 2010).

Los canales de potasio dependientes ATP ( $K_{ATP}^+$ ) se encuentran en varios tejidos tales como el miocardio, tejido muscular esquelético, músculo liso vascular, neuronas y células  $\beta$  pancreáticas, cumpliendo una serie de funciones fisiológicas y son inhibidos por el ATP intracelular y activados por el ADP, comprenden 2 tipos de subunidades: la subunidad receptora de sulfonilúreas (SUR) y una subunidad tipo canal iónico rectificador de entrada de potasio (Kir6), las dos subunidades se encuentran en una relación estequiométrica de 1:1 en un canal tetamérico y se relacionan con los cambios en potencial de acción membranar y subsecuentemente con apertura o cierre de CCDV (Aguilar-Bryan et al., 1998; Huopio et al., 2002).

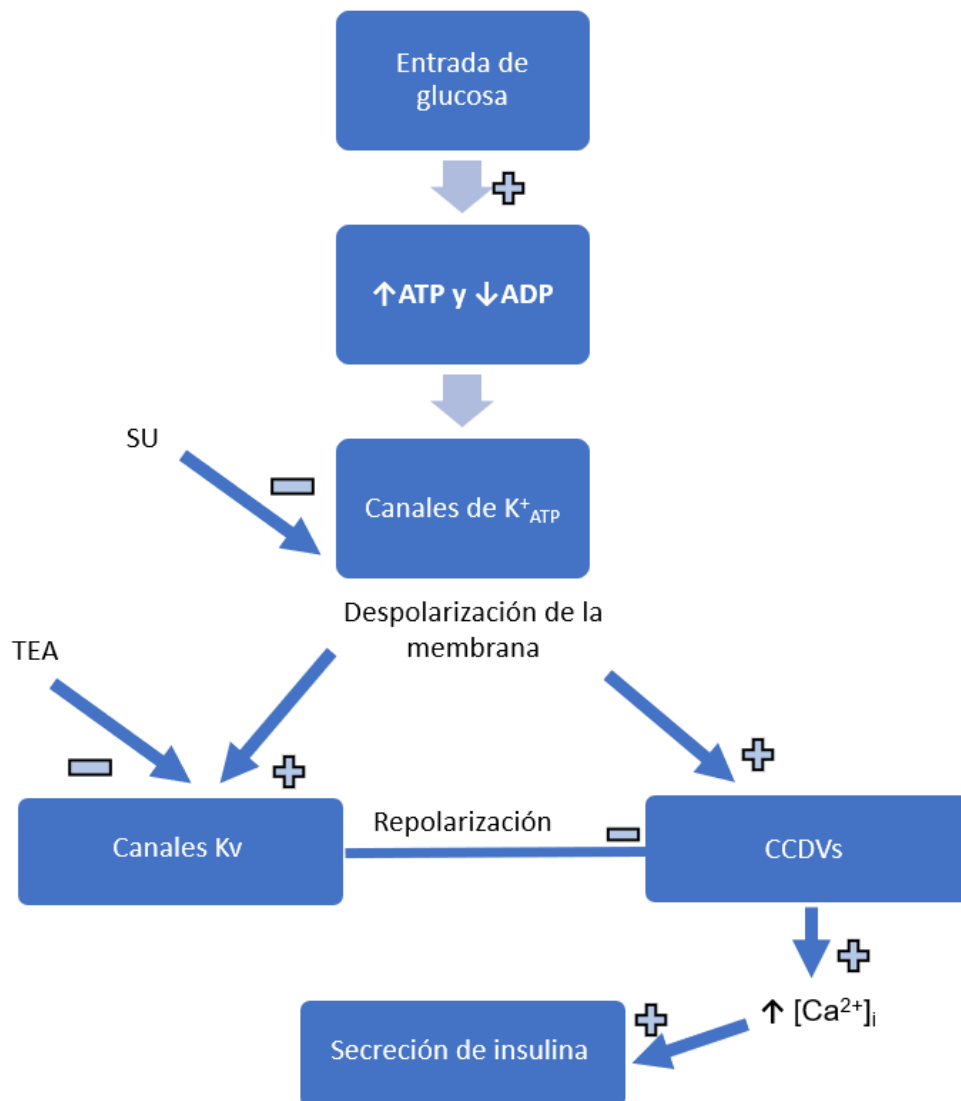
Como se mencionó con anterioridad, los canales de  $K_{ATP}^+$  en las células  $\beta$  cumplen un rol muy importante en la homeostasis de la glucosa ya que promueven la exocitosis de insulina al cerrarse en presencia de ATP. En individuos sanos, al disminuir las concentraciones séricas de glucosa disminuye la relación ATP/ADP provocando una hiperpolarización celular el subsecuente cierre de los canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ), la disminución del calcio citosólico y por ende la supresión de la secreción de insulina (Huopio et al., 2002). Por otra parte, también se ha demostrado la participación de los canales  $K_{ATP}^+$  en células  $\alpha$ -pancreáticas ya que al cerrarse en presencia de la glucosa provoca la disminución de la secreción de glucagón. La relación entre la diabetes y los canales de  $K_{ATP}^+$  ha sido ampliamente descrita. Se ha demostrado que la hiperglicemia crónica provoca cambios estructurales y funcionales en las células  $\beta$  pancreáticas que se pueden revertir al cerrar los canales de  $K_{ATP}^+$ , así mismo, mutaciones en las subunidades de los SUR y Kir6 de los canales  $K_{ATP}^+$  inducen la diabetes neonatal (Brereton et al., 2014).

Fármacos que han indicado la relevancia de los canales de  $K^{+}_{ATP}$  en las células  $\beta$  pancreáticas son el diazóxido y las sulfonilúreas (por ejemplo, glibenclamida y tobutamida). El diazóxido es un derivado de benzotiadiazina agonista de los canales de  $K^{+}_{ATP}$   $\beta$ -pancreáticos, al unirse a la subunidad SUR1, se utiliza en el tratamiento de la hiperinsulinemia congénita e insulinoma ya que disminuye la secreción de insulina (George & McCrimmon, 2012). Las sulfonilúreas son uno de los tratamientos utilizados en el control de la DMT2 ya que ha demostrado ser secretagogo de insulina al bloquear los canales de  $K^{+}_{ATP}$   $\beta$ -pancreáticos al unirse a la subunidad SUR1, también ha demostrado restaurar los daños estructurales y funcionales de estos islotes provocados por la hiperglicemia crónica (Brereton et al., 2014; Huopio et al., 2002; Frederico et al., 2017). Cabe resaltar que la tolbutamida (sulfonilurea) también ha demostrado inhibir parcialmente la secreción de glucagón en pacientes con DMT2 demostrando su acción en los canales de  $K^{+}_{ATP}$   $\alpha$ -pancreáticos (Zhang et al., 2013).

La secreción de insulina de los islotes  $\beta$  pancreáticos también se encuentra mediada por los KCa y los Kv. Con respecto al rol de los KCa en la secreción de insulina estimulada por glucosa, se conoce que moléculas como el tetraetilamonio (TEA), un inhibidor de estos canales no tiene un efecto sobre el potencial de membrana de las células  $\beta$ -pancreáticas, lo que sugeriría que estos canales, no hacen parte de las rutas de señalización que activa la glucosa, por lo que el papel de estos canales aún tiene que ser investigado a mayor profundidad (Choi & Hahn, 2010).

Por otra parte, los Kv al controlar la salida de potasio de la célula participan en la regulación del potencial de membrana. Una subfamilia importante de estos canales son los Kv1.3 los cuales se identificaron inicialmente en los linfocitos T y posteriormente en otros tejidos como riñones, osteoclastos, testículos y los tejidos sensibles a la insulina como el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético, estando involucrados en varias funciones fisiológicas tales como regulación del volumen celular, proliferación celular y liberación de neurotransmisores. Es de resaltar que en la activación de estos canales participan la fosforilación de treonina, serina y tirosina y que este canal está relacionado con la unión a insulina a su receptor y a un aumento en la captación de glucosa por parte de los tejidos anteriormente mencionados (Li et al., 2006). La relación entre los canales de  $K^{+}_{ATP}$ , el calcio y la secreción de insulina se puede observar en la [figura 2-3](#).

**Figura 2-3.** Esquema del mecanismo dependiente de los canales  $K^+_{ATP}$ , para la secreción de insulina estimulada por glucosa.



El incremento de la glucosa intracelular aumenta el ATP intracelular y disminuye el ADP intracelular, cerrando los canales de  $K^+_{ATP}$  lo que a su vez despolariza la membrana y los CCDVs, aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  y se propicia la secreción de insulina. Las sulfonilúreas (SU) estimulan la secreción de insulina por bloqueo de los canales  $K^+_{ATP}$  y el tetraetilamonio (TEA) aumenta la secreción de insulina de manera dependiente de la glucosa al bloqueo de canales Kv. Adaptado de (MacDonald & Wheeler, 2003).

Con respecto a la DMT2 se ha demostrado polimorfismos y variaciones genéticas en los genes que codifican  $K^+_{ATP}$  especialmente, variaciones genéticas en los genes KCNJ11 y ABCC8 y el polimorfismo en el gen E23K trae como consecuencia el incremento en el desarrollo de DMT2 a nivel mundial (Bonfanti et al., 2015).

### 2.1.4 Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV)

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es 20.000 veces mayor que la intracelular, el calcio puede aumentar sus concentraciones intracelulares ya sea por la entrada de calcio extracelular al citoplasma a través de los CCDV, canales de calcio regulados por ligandos (ROCs) y los canales de calcio activados por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (receptores de inositol 1,4,5-trifosfato y los receptores de rianodina (RyRs)). Una vez el calcio ingresa a la célula actúa como segundo mensajero y participa en múltiples procesos tales como la contracción muscular, la secreción de insulina, el metabolismo, la excitabilidad y la proliferación celular (Berridge et al., 2003; Díaz Horta, 2003).

Los CCDV se encuentran tanto en células excitables como no excitables. En el caso de las células  $\beta$ -pancreáticas están fuertemente relacionados con la secreción de insulina y se han identificado 6 diferentes tipos de subunidades  $\alpha$ , CaV1.2, CaV1.3, CaV2.1, CaV2.2, CaV2.3 y CaV3.1, las cuales forman complejos con ciertas subunidades auxiliares para conducir corrientes de calcio dependientes de voltaje de tipo L, P/Q, N, R y T, respectivamente. A su vez se pueden clasificar en corrientes de bajo voltaje (LVA) porque una pequeña despolarización hace que se activen, por ejemplo, los canales tipo T; o corrientes de alto voltaje que requieren umbrales altos de voltaje para su activación, ejemplo los canales tipo L, P/Q, N y R (Yang & Berggren, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, en respuesta a la despolarización causada por el cierre de canales  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  estos canales de calcio tienen un cambio conformacional y permiten rápidamente la entrada de calcio al citoplasma lo que propicia la exocitosis de insulina, se ha evidenciado que en las células  $\beta$ -pancreáticas aproximadamente un 50% corresponden a canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (CCDV-L) (Jing et al., 2005; Thompson & Satin, 2021).

El rol de los CCDV-L en la exocitosis de insulina se ha demostrado utilizando moléculas como el nifedipino o nimodipino, dihidropiridinas, que bloquean estos canales e impiden la

secreción de insulina estimulada por glucosa. Por otra parte, también se ha demostrado que poblaciones diabéticas, tanto animales como humanas, presentan una regulación a la baja de los CCDV y mutaciones en los CaV1.3, CaV2.1 lo que demuestra su relevancia en la liberación de insulina y regulación de la homeostasis de la glucosa (Thompson & Satin, 2021; Yang & Berggren, 2006).

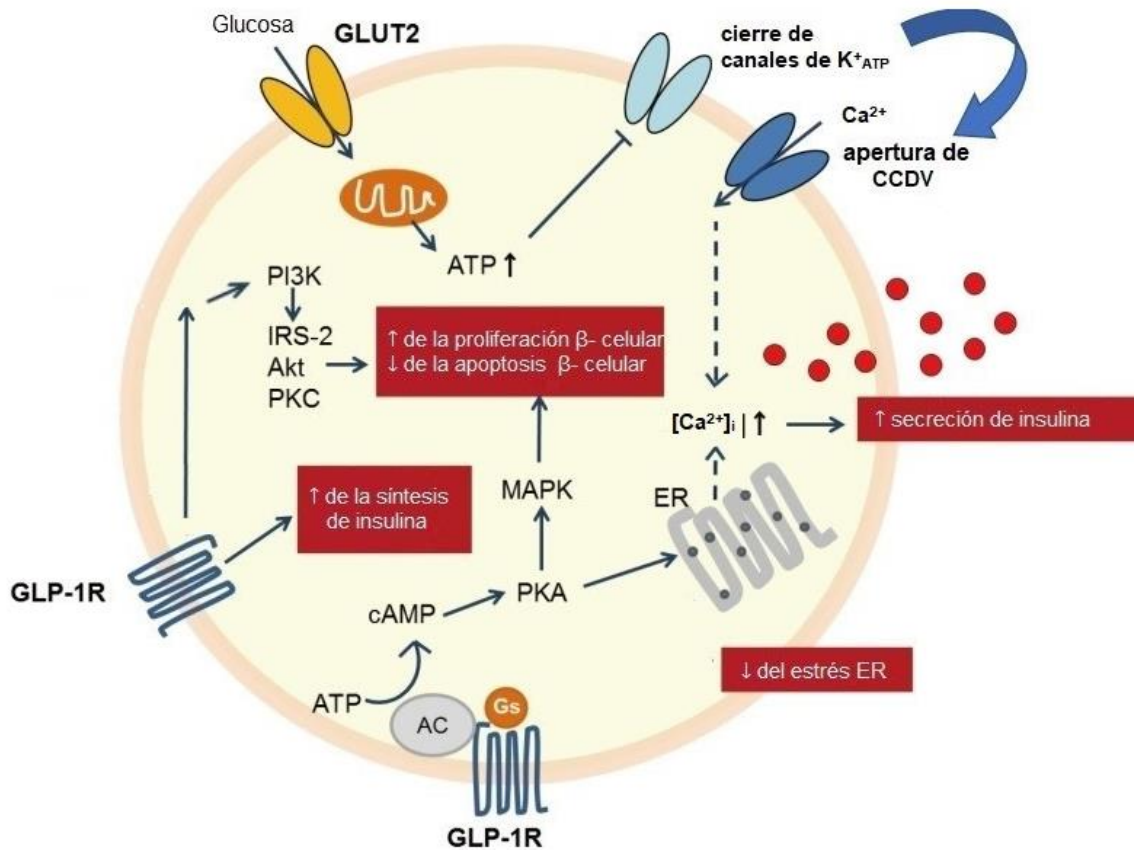
Previamente se ha evidenciado que los CCDV pueden sufrir fosforilaciones por múltiples proteínas quinasas tales como proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa G (PKG), quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) y dicha fosforilación está relacionada con su apertura (Yang & Berggren, 2006). En los mamíferos, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), es un segundo mensajero intracelular que ejerce muchos de sus efectos fisiológicos activando la proteína quinasa dependiente de AMPc o proteína quinasa A (PKA) que fosforila sus sustratos en residuos específicos de serina y treonina. El AMPc por lo general es producido por la unión de hormonas a receptores acoplados a proteínas G. Con respecto a la homeostasis de la glucosa, el AMPc/PKA está involucrado en la secreción de insulina y glucagón en las células  $\beta$ -pancreáticas y la captación de glucosa, síntesis y degradación de glucógeno, gluconeogénesis en los tejidos hepáticos, músculoesqueléticos y adiposo (Catterall, 2011; Yang & Yang, 2016).

Con respecto a la función de la proteína quinasa C (PKC) en las células  $\beta$ -pancreáticas, se conoce que también está involucrada la fosfolipasa C (PLC), que convierte por hidrólisis los fosfolípidos de la membrana, especialmente el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) en inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> activa la salida de calcio del retículo endoplasmático y aumenta la concentración celular, por su parte el DAG junto con la PKC participan en la apertura de los CCDV-L propiciando también el aumento de calcio citosólico, dicho aumento de la concentración de calcio citosólico favorece la traslocación de los gránulos que almacenan insulina a la membrana y la liberación de la misma (Ashcroft et al., 1994; Kamp & Hell, 2000; Mendez et al., 2003).

El rol de los canales de potasio, calcio y las diferentes proteínas quinasas involucradas en la liberación de insulina en las células pancreáticas se puede observar en la [figura 2-4](#).

Por último, se ha demostrado que, en la DMT2 como consecuencia de la hiperglicemia crónica, hay un aumento anormal de DAG y una activación anormal de PKC lo que a su vez suscita en tejidos periféricos la resistencia a insulina y la aparición de complicaciones diabéticas como la neuropatía y nefropatía (Kaneko & Ishikawa, 2015; McCarty, 2006).

**Figura 2-4.** Señalización de la secreción de insulina en las células  $\beta$  – pancreáticas.



La entrada de la glucosa a través de los transportadores de glucosa 2 (GLUT2) provoca el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K^{+}_{ATP}$ ) lo que provoca una despolarización de la membrana y apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), el aumento del calcio intracelular aumenta la secreción de los gránulos de insulina; este aumento también está mediado por la salida de calcio del retículo endoplásmico (ER). Otras rutas implicadas son la proteína quinasa C (PKC), la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), el monofosfato de adenosina cíclico AMPc, la proteína quinasa A (PKA). Otras siglas: adenilato ciclasa (AC), receptor del Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1R). Figura adaptada de (Jung et al., 2014).

Se ha descrito que algunos flavonoides pueden intervenir en las rutas de señalización para aumentar la secreción de insulina (Soares et al., 2017) por ende es necesario identificar si los metabolitos mayoritarios del extracto y fracción (isoquercetina y astragalina) pueden intervenir en esta señalización.

## 2.2 Metabolitos de la *Passiflora ligularis* Juss

Como se refirió en el capítulo anterior, la *Passiflora ligularis* Juss (*P. ligularis*) es comúnmente conocida como granadilla y se distribuye principalmente en Colombia, Perú, Bolivia y México. Si bien hay estudios previos reportando el efecto antidiabético de los frutos y hojas de *P. ligularis* Juss en ratas diabéticas (Anusooriya et al., 2014; Chippy et al., 2016), que dentro de los metabolitos mayoritarios se encuentran los flavonoides quercetina 3-O-beta-D-glucopiranosido (isoquercetina) y Kaempferol 3-O-beta-D-glucósido (astragalina), aún se desconoce el mecanismo por el cual dichos metabolitos podrían causar el efecto antidiabético.

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente disponibles en las plantas. Los estudios han demostrado su actividad terapéutica y eficacia en el tratamiento de la DMT2 (Vinayagam & Xu, 2015). Uno de los mecanismos asociados a los metabolitos de plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la DMT2 es la inhibición de las carbohidrasas intestinales, principalmente la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Estas enzimas están involucradas en la absorción de la glucosa posprandial a nivel salival, pancreático e intestinal ya que facilitan la hidrólisis de poli y oligosacáridos en glucosa, por lo que su inhibición enlentece la absorción de glucosa (Barber et al., 2021; Tundis et al., 2010).

En estudios previos realizados por el grupo de investigación se determinó que el extracto de hojas de *P. ligularis* demuestra una inhibición entre el 10% al 30% y que la concentración a la que la crisina, isoquercetina y astragalina son capaces de inhibir la  $\alpha$ -amilasa en un 50% ( $IC_{50}$ ) es  $> 1570 \mu M$ ,  $31 \pm 1,1 \mu M$  y  $33,4 \pm 2,5 \mu M$  respectivamente; mientras que las  $IC_{50}$  para la  $\alpha$ -glucosidasa fueron de  $> 786,7 \mu M$  para la crisina,  $15,4 \pm 1,1 \mu M$  para la isoquercetina y  $1830 \pm 10 \mu M$  para la astragalina (Monzón et al., 2021). Lo anterior es un fuerte indicio de los posibles mecanismos de acción de los metabolitos mayoritarios del extracto, sin embargo, lo anterior no explicaría del todo el efecto



antidiabético demostrado en el anterior capítulo por lo que se estudia posibles mecanismos de acción asociados a un efecto insulinomimético.

Otros flavonoides con estructuras similares a la isoquercetina, como la rutina y la kaempferitrina, han demostrado un efecto hipoglicemiante, así como una acción sobre el metabolismo del glucógeno y la captación de glucosa en el músculo esquelético (Kappel et al., 2013a). Además, la isoquercetina ha mostrado actividad antidiabética en un modelo de hiperglicemia inducida por aloxano (Valentová et al., 2014). Por lo tanto, es posible que la isoquercetina sea responsable de la actividad antidiabética de *P. ligularis* Juss.

La astragalina por su parte es un flavonoide que tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, neuro y cardioprotectora, antiulcerosa, antitumoral y antidiabética, entre otras (Riaz et al., 2018). Con respecto a la homeostasis de la glucosa, la astragalina se evidencia como uno de los componentes mayoritarios del extracto de hojas de *Gynura procumbens*, el cual presenta mecanismos similares a la metformina (Algariri et al., 2013; Hassan et al., 2010). También se ha evidenciado que la astragalina es uno de los componentes responsables de la actividad antidiabética de los extractos de raíces de *Astragalus membranaceus* (Agyemang et al., 2013) y de la *Morus alba* L. (Choi et al., 2013). Incluso ha demostrado disminuir la retinopatía diabética (Ke et al., 2012) e inhibir la actividad de la  $\alpha$  glucosidasa y  $\alpha$  amilasa intestinal (Hong et al., 2013; Mounika, 2015).

A continuación, se evalúa el efecto *in vivo* del extracto acuoso y la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* Juss en la prueba de tolerancia a la glucosa y el contenido de glucógeno en ratas normoglicémicas y el posible mecanismo de acción de la isoquercetina y astragalina sobre la captación de glucosa en un enfoque *in vitro* en el músculo sóleo o en la captación de calcio en islotes pancreáticos aislados de rata.

## 2.3 Metodología

### 2.3.1 Materiales y reactivos

El acetonitrilo (calidad de cromatografía líquida de alta resolución) y ácido fórmico (calidad de reactivo,  $\geq 85$  %) fueron adquiridos de Merck®. El agua se purificó en un sistema Milli-Q (Millipore®). Todas las soluciones se filtraron a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (CNW Technologies) y se desgasificaron mediante un baño de ultrasonidos antes de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

El glucógeno, la colagenasa tipo V, la quercetina-3-O- $\beta$ -glucopiranosido (isoquercetina), el kaempferol-3-O- $\beta$ -glucopiranosido (astragalina), la  $\beta$ -metil-ciclodextrina, 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona (PD 98059), el trans - 1- (4-hidroxiciclohexil) - 4- (4-fluorofenil) - 5- (2 metoxipiridimidin- 4-il) imidazol (SB239063), el tetraquis (acetoximetil) 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacetato (BAPTA-AM), el 3-{3-[4-(1-Metil-1H-indol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-1H-indol-1-il}propil carbamimidatoato (RO-318220), el N-[2-(p-bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H89), el nifedipino, el diazóxido, la glibenclamida, la taspigargina, el dantroleno, la albúmina de suero bovino (BSA), la colchicina, la N-etilmaleimida, la wortmanina, la cicloheximida y la actinomicina se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

El éster tris-acetoxi-metílico del ácido hidroxil-2-naftalenil metil fosfónico (HNMPA(AM)<sub>3</sub>) [un inhibidor de la actividad de la tirosina quinasa del receptor de insulina] se adquirió de Enzo -Life Sciences (NY, EE. UU.).

La glucosa fue adquirida de Vetec® (Florianópolis, SC, Brasil). Los demás solventes para los procedimientos analíticos, etanol, metanol y todos los demás químicos (sales para el buffer) eran de grado analítico y fueron comprados a Diprolab (Florianópolis, SC, Brasil).

La [U-<sup>14</sup>C] -2-desoxi-D-glucosa (<sup>14</sup>C-DG), actividad específica de 9,25 GBq/mmol, el [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] CaCl<sub>2</sub>, actividad específica 321 KBq/mg Ca<sup>2+</sup> y líquido de centelleo biodegradable OptiphaseHisafe 3 se adquirió de Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, EE. UU.).

El enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) para la determinación cuantitativa de insulina humana (código de producto 2425-300) se adquirió de Monobind Inc. (Lake Forest, CA 92630, USA).

### **2.3.2 Preparación del extracto y fracción de *Passiflora ligularis***

#### **Juss.**

La recolección y preparación del extracto acuoso y fracción etanólica ya fue descrita previamente en el ítem 1.2.2.

### **2.3.3 Animales**

Ratas Wistar macho de 50 a 55 días de edad (180-210 g), se mantuvieron en jaulas a temperatura ambiente controlada (aproximadamente  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas de las 6h a las 18 h). Los animales recibieron alimento (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) y agua ad libitum. Los animales tuvieron un ayuno de 16h con libre acceso al agua. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética en Uso Animal (CEUA), Protocolo UFSC PP2119/17. La eutanasia se realizó, según protocolo, con isoflurano y posterior decapitación en guillotina.

### **2.3.4 Test de tolerancia oral a glucosa (TTOG)**

Las ratas en ayuno (16 h) se organizaron en 5 grupos (cada uno de 6 ratas):

- i. Grupo Control (Vehículo)
- ii. Glibenclamida (10 mg/Kg)
- iii. Fracción etanólica del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (125 mg/Kg)

- iv. Fracción etanólica del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (250 mg/Kg).
- v. Fracción etanólica del extracto acuoso de hojas de *P. ligularis* (500 mg/Kg).

Para otro experimento se dividieron en 3 grupos (cada uno de 6 ratas):

Grupo I: grupo control hiperglicémico que recibió glucosa (4 g/Kg; 8,9 M)

Grupo II: hiperglicemiantes+ astragalina (1 mg/Kg); y

Grupo III: hiperglicemiantes + astragalina (10 mg/Kg).

Todos los tratamientos se administraron por sonda oral. La glicemia se midió antes de la administración de cualquier tratamiento (tiempo cero). A continuación, las ratas recibieron el respectivo tratamiento o vehículo y luego de 30 min se administró una sobrecarga de glucosa (4 g/Kg de peso corporal). La prueba de tolerancia a la glucosa se inició inmediatamente después de la sobrecarga de glucosa y la glucosa se midió a los 15, 30, 60 y 180 min. Se recolectó sangre de la vena de la cola, para medir la glicemia por el método de la glucosa oxidasa (Frederico et al., 2017).

### **2.3.5 Contenido de glucógeno hepático y muscular**

Para determinar el contenido de glucógeno, se extrajo el músculo sóleo y el hígado de ratas hiperglicémicas (controles) y de ratas sometidas a los respectivos tratamientos, inmediatamente después de 180 min de la sobrecarga de glucosa. Los tejidos fueron tratados según una metodología previamente utilizada y referenciada (Kappel et al., 2012). El contenido de glucógeno se cuantificó con reactivo de yodo según la metodología de Krisman (Krisman, 1962) (ver el Anexo A) y luego se leyó en un espectrofotómetro a 460 nm y los resultados se expresaron en mg de glucógeno/g de tejido (Silva et al., 2016).

### **2.3.6 Mediciones de insulina plasmática**

La insulina se midió mediante ELISA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, ya que se utilizó un kit para medir la insulina humana. Todas las

concentraciones de insulina se estimaron mediante medidas colorimétricas a 450 nm con un lector de placas ELISA (OrganonTeknika, Roseland, NJ, EE. UU.) por interpolación a partir de una curva estándar. Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron como  $\mu\text{UI/ml}$  de insulina plasmática.

### **2.3.7 Captación de [U- $^{14}\text{C}$ ] -2-Desoxi-D-glucosa ( $^{14}\text{C}$ -DG) en músculo sóleo de rata**

Se distribuyeron cortes de músculo sóleo de ratas normoglicémicas en los grupos de control y tratados (ver figura). Los músculos fueron diseccionados, preincubados (30 min) y luego incubados (60 min) a  $37^{\circ}\text{C}$  en  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95%: 5%, v/v), pH 7,4 en tampón Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) con una composición de: NaCl (122 mM), KCl (3 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1,2 mM),  $\text{CaCl}_2$  (1,3 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4 mM) y  $\text{NaHCO}_3$  (25 mM) (ver Anexo A). Se añade quercetina-3-O-beta-D-glucopiranosido (isoquercetina) o (10 nM, 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$ ) al medio de incubación (60 min) en presencia o ausencia de 100  $\mu\text{M}$  HNMPA-AM, wortmanina 100 nM, colchicina 1  $\mu\text{M}$ , N-etilmaleimida 1 nM, PD98059 50  $\mu\text{M}$ , SB239063 10  $\mu\text{M}$ ,  $\beta$ -metil-ciclodextrina 10 mM, actinomicina D 1  $\mu\text{M}$  o cicloheximida 350  $\mu\text{M}$ . Se añadió  $^{14}\text{C}$ -DG (0,1  $\mu\text{Ci/mL}$ ; 0,12 nM) a todas las muestras durante el período de incubación. Las muestras fueron tratadas conforme al protocolo previamente establecido (Frederico et al., 2018) y se cuantificó la proteína total por el método de Lowry. Para preparación del reactivo, ver Anexo A (Lowry et al., 1951). Los resultados de captación de glucosa se expresaron como nmol de glucosa/mg de proteína.

### **2.3.8 Aislamiento de islotes pancreáticos de rata**

El aislamiento pancreático fue hecho de acuerdo con las técnicas realizadas previamente por el grupo de investigación (Frederico et al., 2012). El páncreas de la rata fue visualizado mediante una incisión central abdominal, el conducto biliar se pinza en la punta del duodeno y se cánula en un punto suficientemente proximal al hígado. El buffer de Krebs Ringer - bicarbonato (KRb) fue suplementado con N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(ácido 2-

etanosulfónico) (HEPES) (8mM) y glucosa (3 mM), el medio KRb-HEPES fue introducido lentamente dentro del ducto biliar con una jeringa hasta que el páncreas queda distendido. El páncreas se extrajo lentamente y se mantuvo en una placa de Petri con medio KRb-HEPES. El tejido pancreático se cortó en trozos pequeños (2 x 2 mm) y se incubó en tubos de plástico en medio KRb-HEPES con colagenasa (3 mg/mL). Después de la incubación, la mezcla fue transferida a un tubo cónico (110 mm x 15 mm), resuspendido en 10 mL con colagenasa libre de medio y centrifugado a temperatura ambiente por 3 min a 4,500g en una centrifuga Excelsa Baby (modelo 206), (FANEM, São Paulo, SP, Brasil). El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en medio KRb-HEPES fresco. El procedimiento de lavado fue repetido 5 veces y, en los dos últimos lavados los islotes se sedimentan sin centrifugar. Alícuotas de 100 µL del sedimento final con los islotes aislados (vistos microscópicamente) se transfirieron a tubos eppendorf con el medio de incubación, KRb-HEPES (Frederico et al., 2012; Lacy & Kostianovsky, 1967).

### 2.3.9 Medición de Insulina basal

Los estudios de secreción de insulina se realizaron *in vitro* con islotes pancreáticos aislados de ratas normoglicémicas. Los islotes (alícuotas de 0,5 mL) fueron preincubados por 60 min e incubados (tiempo de tratamiento) a 37 °C en KRb, pH 7,4. La incubación fue realizada en ausencia o presencia de astragalina (100 µM) por 10 min. Al final de la incubación, una alícuota de 50 µL fue usado por cuantificación por ELISA (Castro et al., 2018; Kyriazis et al., 2014). La cantidad total de proteína en el medio de incubación y en los islotes fue determinada por el método Lowry (Lowry et al., 1951). Los resultados son expresados como µIU de insulina/µg de proteína. La preparación del reactivo de Lowry se puede consultar en el Anexo A.

### 2.3.10 Entrada de calcio en islotes pancreáticos aislados

Los islotes aislados fueron preincubados en un incubador metabólico Dubnoff por 60 min para equilibrar 0.1 µCi/mL <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> contenido en un buffer de KRb-HEPES a 37°C, pH 7.4 y

en presencia de gas O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5; v/v). Los islotes fueron incubados por 10 min en KRb-HEPES en presencia o ausencia (control) de astragalina. En algunos experimentos, bloqueadores de canales o inhibidores de quinasas fueron añadidos durante los últimos 15 min antes del tratamiento y se mantuvieron durante todo el periodo de incubación (ver los textos de las figuras).

Los siguientes fármacos fueron usados: diazóxido (250 μM), glibenclamida (20 μM), nifedipino (1 μM), BAPTA-AM (50 μM), RO 31-8240 (20 μM) (Frederico et al., 2012), H89 (10 μM), tapsigargina (1 μM) o dantroleno (50 μM) (Kappel et al., 2013b). Se añadió 1 mL de buffer frío con cloruro de lantano (10 mM) a 2°C a las muestras para inhibir la entrada de calcio. Los tubos fueron centrifugados por 1 min a 1,500g.

El sobrenadante fue almacenado y los islotes se lavaron dos veces en solución fría de cloruro de lantano. La presencia de La<sup>3+</sup> durante la fase de lavado es esencial para prevenir la liberación de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> intracelular (Batra & Sjögren, 1983).

Después del lavado del tejido con La<sup>3+</sup>, los islotes se homogenizaron con 300 μL de NaOH (0,5 M) y se llevó a punto de ebullición por 5 min. Se tomaron alícuotas de 50 μL de cada muestra para medir la radioactividad en líquido de centelleo utilizando un espectrómetro de centelleo líquido LKB rack beta (modelo LS 6500; Multi- Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Alícuotas de 5 μL se usaron para la cuantificación de proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Después de 60 min de incubación con <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> el equilibrio de calcio ocurre en el citosol, los depósitos intracelulares y el calcio extracelular. Esto significa que la cantidad de calcio en el medio es equivalente entre el medio intra y extracelular. Después de 60 min con la adición de sustancias exógenas (fármacos, solutos e inhibidores), el medio de incubación puede ser modificado, una estrategia experimental para estudiar el mecanismo de entrada de calcio en células aisladas, fragmentos de tejido y/o cultivo celular (Batra & Sjögren, 1983). Los estudios sobre la entrada de calcio realizados a continuación se realizaron teniendo en cuenta lo anterior.

### **2.3.11 Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  E.E.M. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (figura 2-5, figuras 2-14), o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni cuando se compararon más de dos grupos (figuras 2-6 a 2-12 y 2-18 a 2-21) y cuando solo se compararon 2 grupos se usó prueba t de Student (figuras 2-15 a 2-17 y 2-23). Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ . La homogeneidad de los datos se determinó utilizando el software GraphPad prism 7® mediante la prueba de Bartlett para ANOVA o mediante una prueba de igualdad de varianza para la prueba t de Student.

## 2.4 Resultados y discusión

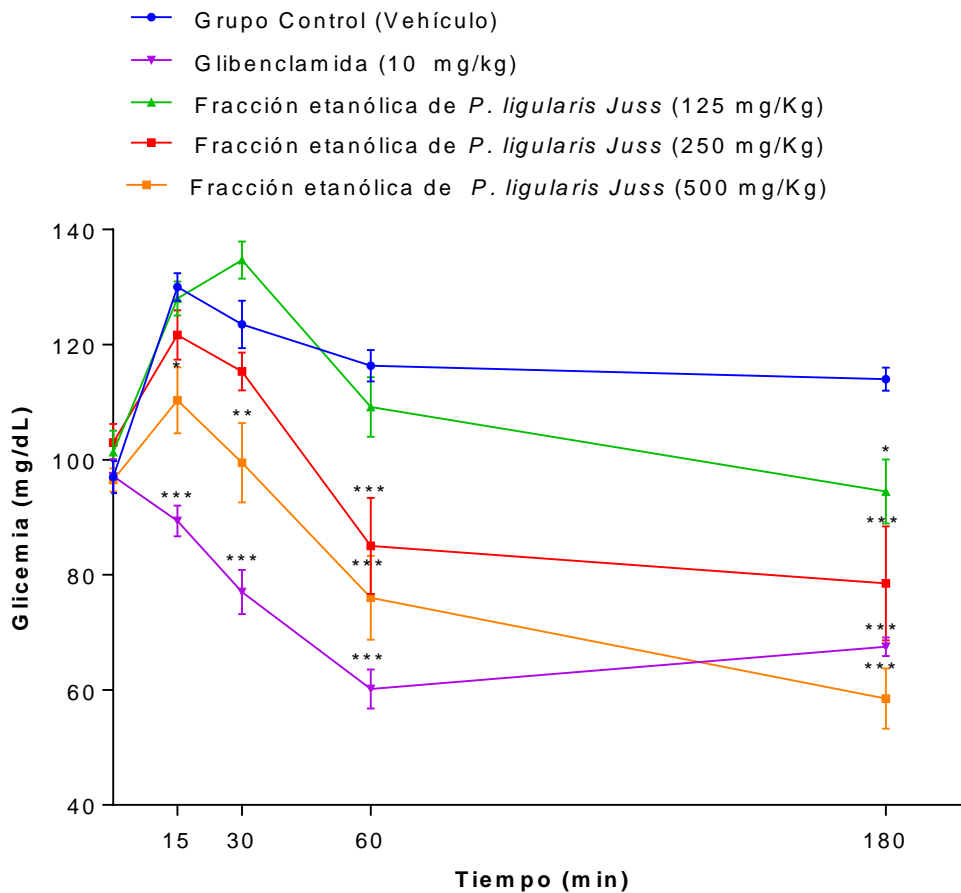
### 2.4.1 Efecto de la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en el ensayo de sobrecarga oral de glucosa y la glucogénesis hepática y muscular.

La [figura 2-5](#) muestra la curva dosis-respuesta a 125, 250 y 500 mg/Kg de la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* sobre la glucosa sérica. La fracción etanólica muestra una diferencia estadísticamente significativa a 125 mg/Kg reduciendo la glucosa sérica en aproximadamente un 17% a los 180 min. La dosis de 250 mg/Kg reduce alrededor de un 30% a los 60 min y 180 min y, a 500 mg/Kg la fracción etanólica reduce alrededor del 15%, 20%, 35% y 50% de 15 a 180 min respectivamente. Finalmente, la glibenclamida muestra una reducción de la glicemia de alrededor de 30 % a los 15 min, de 40 % a los 30 min, de 50 % a los 60 min y de 40 % a 180 min.

Como se puede observar, el efecto de reducción de glicemia mediado por la fracción etanólica es de tipo dosis-dependiente, esto se puede asociar a que a mayor concentración de la fracción mayor concentración de flavonoides presentes en la fracción (especialmente astragalina e isoquercetina que son los mayoritarios).



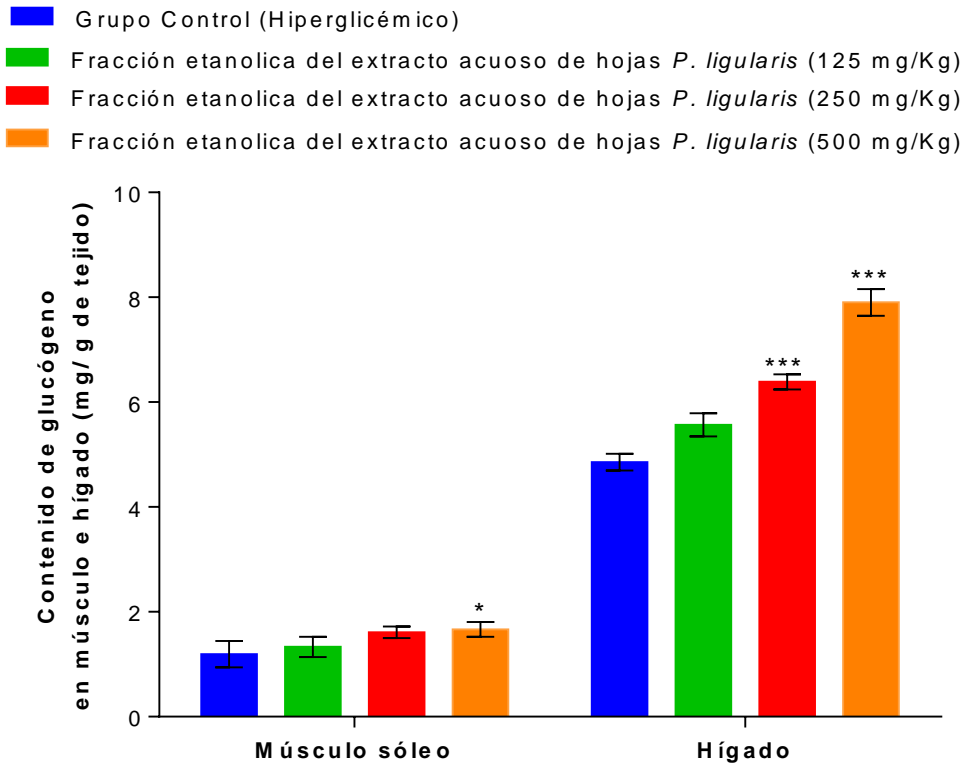
**Figura 2-5.** Efecto de las fracciones etanólicas de *P. ligularis* en la prueba de tolerancia a la glucosa.



Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M (n = 6). \*p <0,05, \*\*p <0,01 y \*\*\*p < 0,001 en comparación con el respectivo grupo de control hiperglicémico.

Por otra parte, la [figura 2-6](#) muestra la curva dosis-respuesta de la fracción etanólica en el contenido de glucógeno del músculo sóleo y el hígado medido 180 min después de la sobrecarga de glucosa de su respectivo tratamiento por vía oral. La fracción etanólica (500 mg/Kg) aumentó el contenido de glucógeno muscular en casi un 40% y el glucógeno hepático en un 65%, en comparación con el grupo control hiperglicémico. Mientras tanto, el grupo que recibió 250 mg/Kg de la fracción etanólica se aumentó el contenido de glucógeno hepático en casi un 35% y la dosis de 125 mg/Kg no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo control.

**Figura 2-6.** Efecto de las fracciones etanólicas de *P. ligularis* sobre el contenido de glucógeno en el músculo sóleo e hígado



Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M con  $n = 6$ . \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con el respectivo grupo de control hiperглиcémico.

Es bien conocido en el estado del arte que el hígado juega un rol en la captación y almacenamiento de la glucosa mediante la glucogénesis. Este proceso involucra el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), el cual es activado durante la fase de absorción de la glucosa para su captación y posterior almacenamiento, este transportador también se activa durante el ayuno para la liberación de la glucosa requerida. El proceso de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en términos generales involucra lo siguiente: la glucosa captada en el hígado se biotransforma en la glucosa-6-fosfato a través de la glucoquinasa, la glucosa-6-fosfato se transforma en glucosa-1-fosfato, la cual a su vez es el sustrato de la glucógeno sintasa para la formación del glucógeno (Nordlie et al., 1999; Thorens, 2015).

Por otra parte, en el músculo esquelético se encuentran los GLUT4, activados por la unión de la insulina a su respectivo receptor, lo que promueven la captación de glucosa por la activación de varias rutas de señalización de tipo quinasa tales como PI3K, AMPK, PKC, entre otras, como se puede observar en la [figura 2-2](#) (Gorovits & Charron, 2003).

Con respecto a la glucogénesis, anteriormente en la literatura se ha reportado que algunos extractos de diferentes especies de *Passiflora* la pueden aumentar, tales como: 50 mg/Kg *P. suberosa*, 5% y 10% de *P. edulis* y 200 mg/Kg de *P. incarnata* e incluso 200 mg/Kg a 600mg/Kg de un extracto de frutos de *P. ligularis* (Anusooriya et al., 2014; Gupta et al., 2012; Salgado et al., 2010; Sudasinghe & Peiris, 2018). En el presente estudio, el aumento tanto del glucógeno hepático como muscular se considera un buen marcador de actividad hipoglicemiante (Patel et al., 2012). Los resultados sugieren que la fracción etanólica y el extracto acuoso de *P. ligularis* Juss aumentaron el contenido de glucógeno hepático de manera dependiente de la dosis y aumentaron el contenido de glucógeno muscular, atribuyéndole un posible efecto mimético de insulina y secretagogo de insulina. Así, tanto el extracto como las diferentes fracciones de las hojas de *P. ligularis* Juss ensayadas evidencian un potencial efecto secretagogo de insulina, ya que redujeron la glicemia. También exhiben una acción mimética de la insulina, como lo demuestra el aumento de la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el hígado.

En el capítulo anterior el extracto acuoso y fracción etanólica de *P. ligularis* ya habían demostrado el efecto antihiperглиcemiante en ratas normoglicémicas y el efecto antidiabético en ratones diabéticos. Los resultados de aumento de glucógeno hepático corroboran que los metabolitos mayoritarios de la fracción etanólica (isoquercetina o astragalina) son los asociados al efecto antidiabético descrito previamente. Asimismo, estudios previos han demostrado que la isoquercetina tiene actividad antihiperглиcémica en un modelo en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina la cual esta mediada por formación de glucógeno hepático y control de función hepática (Jayachandran et al., 2018).

Con base en los resultados *in vivo*, y al perfil cromatográfico de la [figura 1-2](#), los siguientes experimentos *in vitro* permitieron clarificar el mecanismo de acción de los dos metabolitos mayoritarios de la fracción etanólica: isoquercetina y astragalina.

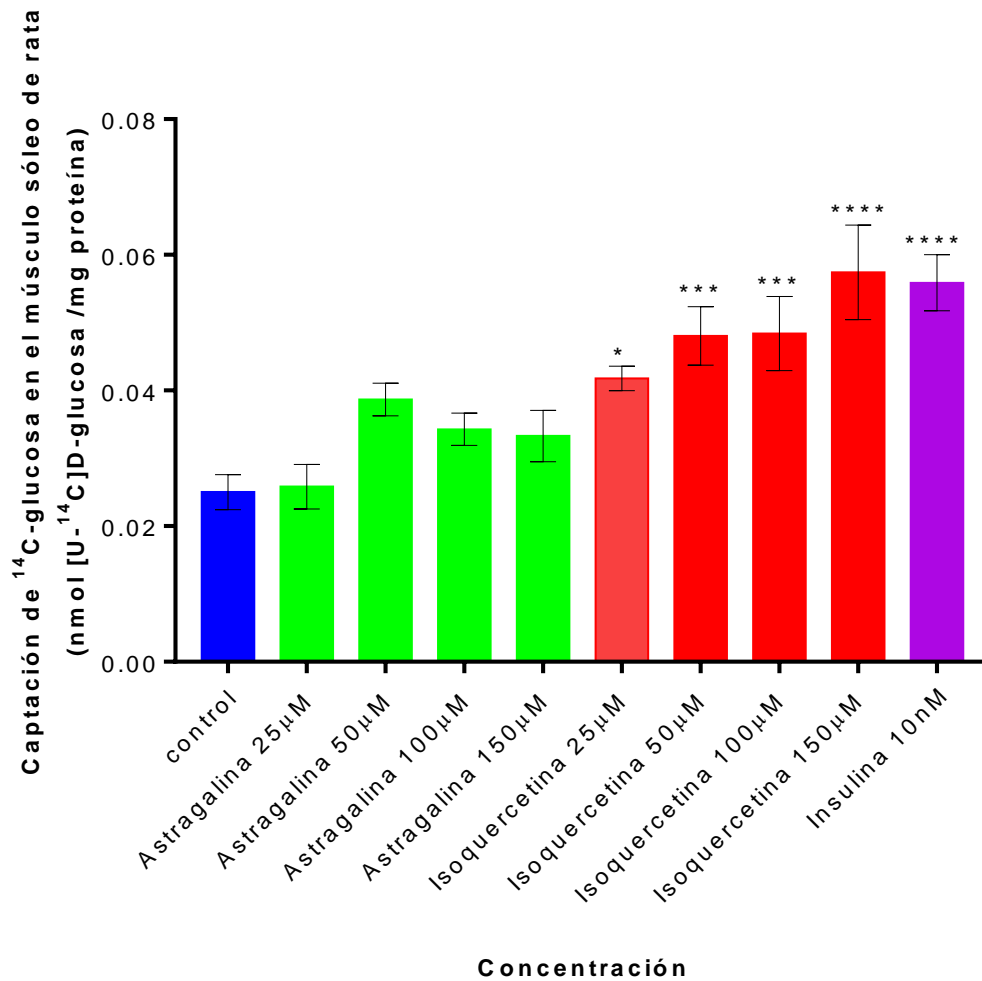
Primero se investigó la influencia de la isoquercetina y astragalina en la captación de glucosa en el músculo sóleo.

#### **2.4.2 Curva dosis-respuesta del efecto de la isoquercetina sobre la captación de glucosa ( $^{14}\text{C-DG}$ ) en el músculo sóleo de rata.**

Estos experimentos *in vitro* se centraron en el efecto de la isoquercetina o astragalina sobre la captación de glucosa en músculo sóleo aislado y el mecanismo de acción implicado con el fin de investigar su rol en la homeostasis de la glucosa. A partir de la curva dosis-respuesta (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  de isoquercetina o astragalina). Como se evidencia en la [figura 2-7](#), la astragalina no estimula la captación de glucosa, sin embargo, la isoquercetina demostró estimulación de la captación de glucosa al 92 %, 98 %, 102 %, 93 %, 133 % y 129 %. En el rango de concentraciones probadas (25  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ ), con respecto al grupo control. En el grupo control positivo, la insulina (10 nM), estimula en 123% la captación de glucosa en su receptor tisular de insulina. Sin embargo, es de resaltar que el tratamiento agudo con isoquercetina exhibe un porcentaje similar de captación de glucosa, una concentración 103 veces mayor en comparación con la insulina. Para los siguientes experimentos se seleccionó la isoquercetina a 50  $\mu\text{M}$  para conocer los mecanismos de acción de este flavonoide.

Los anteriores resultados demostraron que la isoquercetina aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético, al igual que otros flavonoides presentes en los extractos etanólicos que previamente demuestran influir en la absorción de glucosa en las células del músculo esquelético humano (Ho et al., 2017). Asimismo, los flavonoides kaempferitrina, kaempferol 3-neohesperidosido y rutina, cuya estructura química es similar a la isoquercetina, han exhibido aumento de la captación de glucosa en músculo esquelético de ratas (Cazarolli et al., 2013; Kappel et al., 2013a).

**Figura 2-7.** Efecto de la isoquercetina y astragalina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo



Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media ± E.E.M. con n = 4. \*p <0,05, \*\*p <0.01 y \*\*\*p < 0,001 en comparación con el grupo control respectivo.

A continuación, se investiga el mecanismo de acción por el cual la isoquercetina estimula la captación de glucosa en el músculo sóleo.

### 2.4.3 Participación de las rutas de señalización de insulina en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de <sup>14</sup>C-DG en el músculo sóleo.

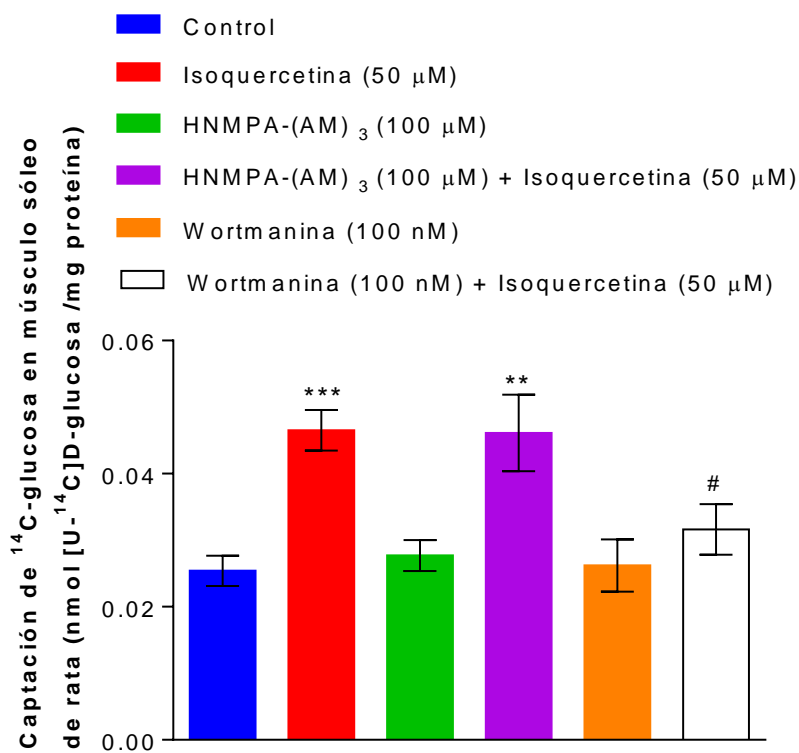
Con el fin de evaluar si la isoquercetina puede activar la vía de señalización de la insulina para estimular la captación de glucosa, se utilizó 100  $\mu$ M de HNMPA-(AM)<sub>3</sub> (Cazarolli et al., 2013), el cual es un inhibidor de la actividad de la tirosina quinasa del receptor de insulina (IR), y 100 nM de wortmanina (Castro et al., 2015), como inhibidor específico de PI3K. Las concentraciones de fármaco ensayadas se basaron en experimentos previos llevados a cabo en protocolos similares y ya publicados por el grupo de investigación. El efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa no se modificó en presencia de HNMPA-(AM)<sub>3</sub>. Sin embargo, el efecto estimulante sobre la captación de glucosa de la isoquercetina 50  $\mu$ M fue inhibido en alrededor de un 30 % por la wortmanina ([figura 2-8](#)).

Los estudios relacionados con el mecanismo de acción de algunos compuestos naturales, como los flavonoides, sobre la captación de glucosa están relacionados con la activación del receptor insulina tirosina quinasa (Cazarolli et al., 2012; Kappel et al., 2013a). En el presente caso, se evidencia que el efecto de inducción de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en el músculo esquelético no involucra la actividad del receptor de insulina. No obstante, la estimulación de la captación de glucosa por la rutina, un flavonol, apigenina-6-C- $\beta$ -fucopyranósido y glucósidos flavonoides de kaempferitrina fueron completamente inhibidos por el pretratamiento con HNMPA(AM)<sub>3</sub> (Cazarolli et al., 2012, 2013; Kappel et al., 2013a).

Aunque este estudio no sugiere que el efecto de la isoquercetina sea mediado a través del receptor de insulina, si se evidencia que la ruta de PI3K, una serina/treonina quinasa que activa Akt, realiza un paso fundamental en la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Belfiore et al., 2017) como parte de la señalización de isoquercetina para la captación de glucosa, lo que sugiere que este mecanismo está relacionado con la transducción. Otros flavonoides que involucran las vías de señalización de la insulina por vía intracelular son: el kaempferol 3-neophesperidosido que exhibe un efecto estimulador

en la síntesis de glucógeno a través de la PI3K, ya que su efecto también fue inhibido por la wortmanina (Cazarolli et al., 2009a). Previamente se había demostrado que en el efecto de la isoquercetina está involucrada la vía PI3K, inhibiendo la apoptosis causada por el estrés oxidativo en la línea celular de vena umbilical humana EA.hy926 (Zhu et al., 2016) y disminuyendo la degeneración de los islotes pancreáticos al activar la señalización de PI3K (Huang et al., 2017).

**Figura 2-8.** Efecto de HNMPA-(AM)<sub>3</sub> y wortmanina sobre la acción estimulante de la isoquercetina sobre la captación de <sup>14</sup>C-glucosa en el músculo sóleo de rata.

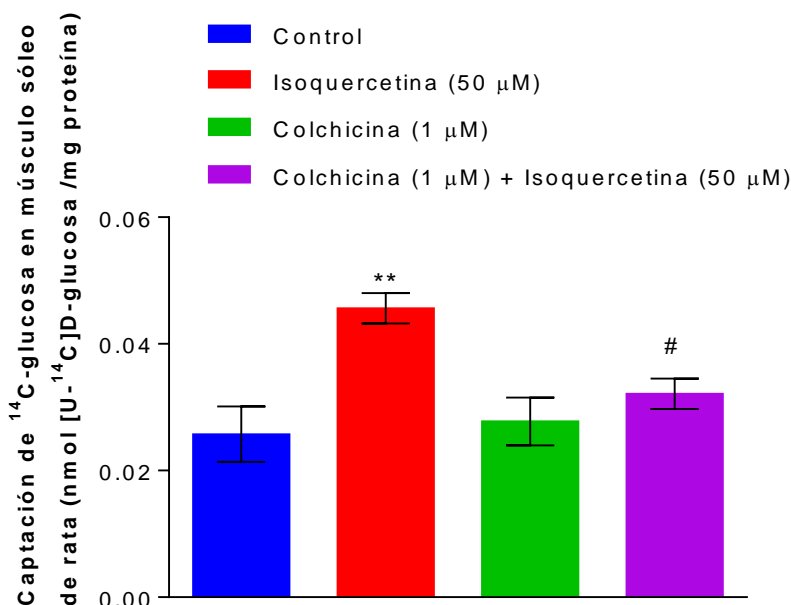


Los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación= 30 min; tiempo de incubación= 60 min. Los valores se expresan como media ± E.E.M con n = 4. \*\*p<0,01 y \*\*\*p < 0,001 en comparación con el grupo de control respectivo; #p <0,05 en comparación con el grupo de isoquercetina respectivo.

#### 2.4.4 Participación de receptores de membrana y citoplasma en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}\text{C}$ -DG en el músculo sóleo

Para investigar la integridad del citoesqueleto sobre el efecto estimulador de la isoquercetina en la captación de glucosa, se utilizó 1  $\mu\text{M}$  de colchicina (Castro et al., 2015), un agente disruptor de microtúbulos. Como se muestra en la [figura 2-9](#), el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de glucosa se redujo en alrededor de un 30 % en comparación con el grupo control.

**Figura 2-9.** Efecto de la colchicina sobre el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en el músculo sóleo.



Los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M. con  $n = 4$ . \*\* $p < 0.01$ , en comparación con el respectivo grupo control y # $p < 0,05$  en comparación con el grupo de isoquercetina.

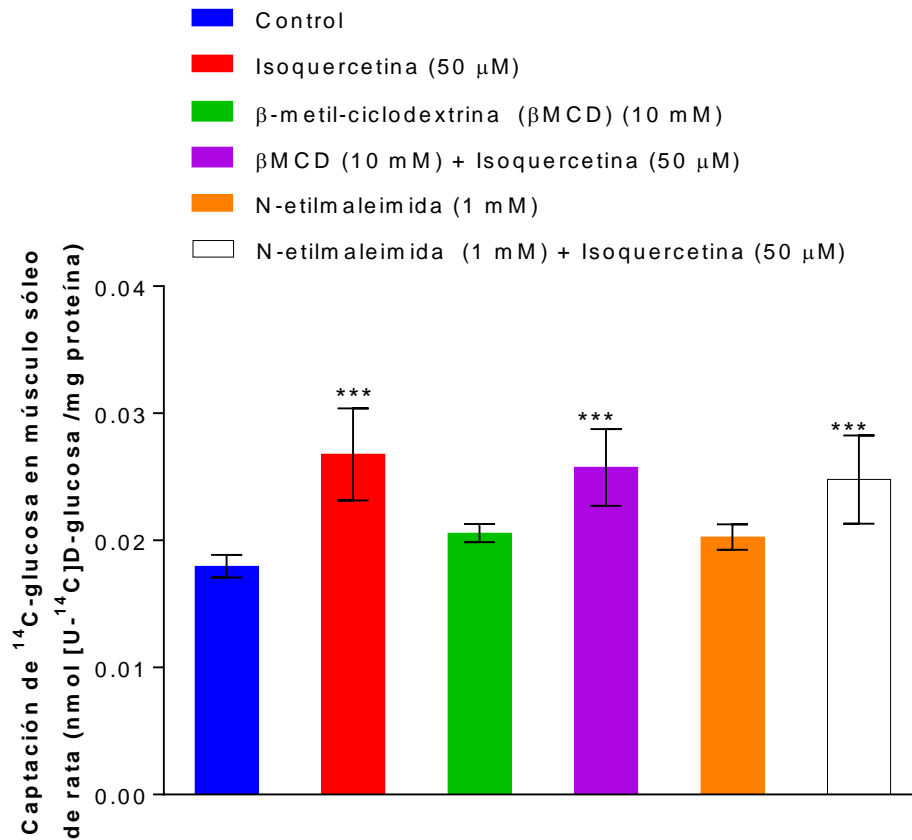
En la literatura es ampliamente reportado que mantener el citoesqueleto intacto (tanto de adipocitos como de músculo esquelético) es importante para la traslocación del GLUT4. Se ha evidenciado que la disrupción de los microtúbulos inhibe el tráfico vesicular de



GLUT4 inducido por insulina y, en consecuencia, la captación de glucosa (Belfiore et al., 2017; Du & Wei, 2014; Huang et al., 2005; Kanzaki, 2006). Aquí, el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa se inhibió por completo en presencia de colchicina, lo que indica que se requiere la integridad del citoesqueleto para que la isoquercetina ejerza su efecto estimulador completo. Se ha demostrado que otros flavonoides como la apigenina-6-C-(2"-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- $\beta$ -L-fucopiranosido (Cazarolli et al., 2009), kaempferitrina (Cazarolli et al., 2013) y la rutina (Kappel et al., 2013a) tampoco estimulan la captación de glucosa en presencia de colchicina, lo cual implica que este mecanismo también está involucrado.

Otra ruta de señalización de insulina para la traslocación del GLUT 4 y por ende la absorción de glucosa incluye regiones denominadas caveolas, que son pequeñas invaginaciones lipídicas (enriquecidas con colesterol) (Gustavsson et al., 1999; Parpal et al., 2001; Ploug & Ralston, 2002). Para evaluar el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de glucosa sobre los microdominios de lípidos de la membrana plasmática se ensayó con  $\beta$ -metil-ciclodextrina 10 mM el cual consume el colesterol de las caveolas (Simons & Gerl, 2010; Smart & Anderson, 2002), con/sin el flavonoide. Además, se investiga la influencia de la isoquercetina en el proceso de acoplamiento y fusión de vesículas en la membrana plasmática utilizando 1 mM de N-etilmaleimida (Frederico et al., 2018), un agente alquilante que inhibe el tráfico vesicular y los eventos de fusión en la membrana celular. Como se puede observar, no hubo diferencia significativa entre los grupos evaluados con isoquercetina en comparación con isoquercetina más  $\beta$ -metil-ciclodextrina o N-etilmaleimida; por lo tanto, el efecto de inducción de la isoquercetina sobre la captación de glucosa no se vio afectado en presencia de estos dos inhibidores ([Figura 2-10](#)).

**Figura 2-10.** Efecto de la  $\beta$ -metil-ciclodextrina y la N-etilmaleimida sobre la acción estimuladora de la isoquercetina sobre la captación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en el músculo sóleo.



Los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación e incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M. con  $n = 4$ . \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con el grupo control respectivo.

La glucosa es la principal fuente de energía celular en los seres humanos y el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es fundamental para la supervivencia. El proceso de traslocación y fusión de GLUT4 se produce a través de receptores de proteína de fijación del factor sensible a la N-etilmaleimida soluble (SNARE), microtúbulos y filamentos de actina, que dirigen el movimiento de las vesículas desde la región perinuclear hacia la membrana en respuesta a la unión de insulina (Tunduguru & Thurmond, 2017). El uso de N-etilmaleimida, un agente alquilante que inhibe los eventos de tráfico vesicular en la membrana (Rodríguez et al., 1994), demuestra que el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa no depende del complejo de adhesión SNARE. Además, la influencia de los microdominios en la membrana plasmática para la adhesión

de vesículas se puede estudiar usando  $\beta$ -metil- ciclodextrina, la cual consume el colesterol de la membrana plasmática y altera la captación de glucosa (Llanos et al., 2015). En este estudio se evidencia que el efecto estimulante de la isoquercetina sobre la captación de glucosa no se alteró en presencia de los inhibidores de N-etilmaleimida y metil- $\beta$ -ciclodextrina, por lo que se puede concluir que dichas rutas no están involucradas.

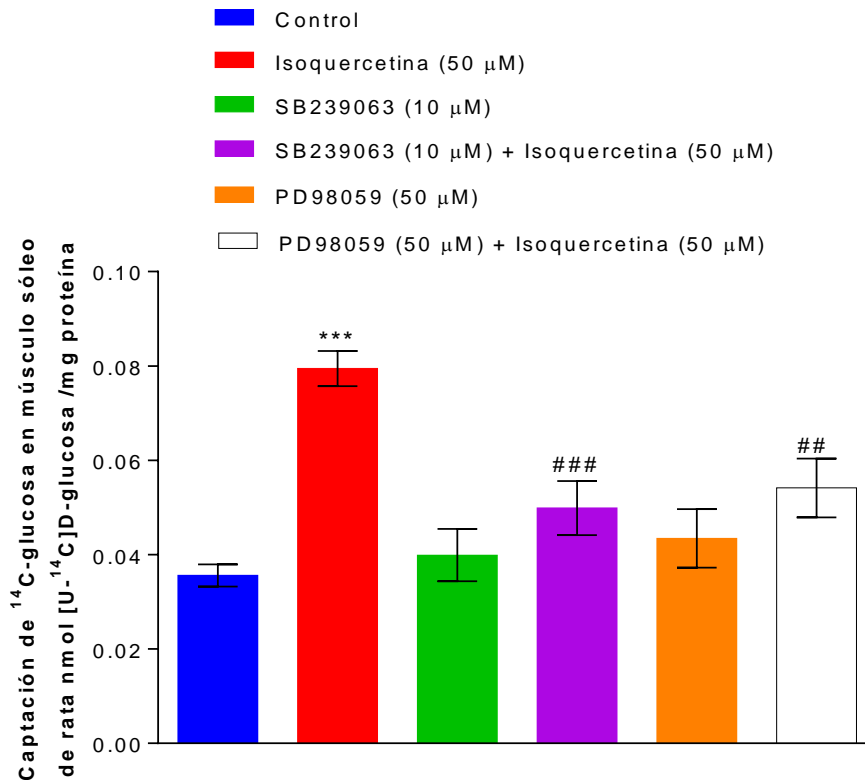
#### **2.4.5 Participación del GLUT-4 en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de $^{14}\text{C}$ -DG en el músculo sóleo**

El papel de la isoquercetina en la activación de GLUT4 se investigó mediante la incubación de 10  $\mu\text{M}$  de SB239063 (Frederico et al., 2018), un inhibidor de la ruta p38 proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de segunda generación, con/sin la presencia de flavonoides. La [figura 2-11](#) muestra que la coincubación de SB239063 más el compuesto evita el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en casi un 100 %. De manera similar, el bloqueo de la vía MAPK/ERK por la co-incubación de 50  $\mu\text{M}$  de PD98059 (Gomes Castro et al., 2014) e isoquercetina muestra una reducción significativa en el efecto estimulador de la captación de glucosa de este flavonoide.

La activación de las vías de señalización MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y la proteína quinasa p38 activada por mitógenos posee la capacidad de activar la traslocación de GLUT4, probablemente influyendo en su estado de fosforilación en la membrana plasmática (Somwar et al., 2001). Por lo tanto, para dilucidar si esta vía está involucrada en la estimulación de la captación de glucosa mediada por isoquercetina en el músculo sóleo utilizamos SB239063, un inhibidor de la vía MAPK p38 de segunda generación, específicamente de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  de p38 (Sweeney et al., 1999). Para continuar con los estudios de posible actividad de isoquercetina en el paso de traducción de proteínas a través de la vía MAPK/ERK, se utilizó PD98059. Este es un inhibidor que se une a formas inactivas de MEK1 e impide la activación por parte de activadores de otras vías, como c-Raf, evitando así la fosforilación de ERK y, en consecuencia, impidiendo la activación de la cascada de la MAPK p38 (Tremblay et al., 2003). El efecto estimulante de

la isoquercetina sobre la captación de glucosa se inhibe en presencia de PD98059 y SB 239063, lo que indica la presencia de eventos de regulación nuclear por parte de este flavonoide. Por lo que se puede deducir que el mecanismo de acción de la isoquercetina sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo implica, al menos en parte, la vía MAPK/ERK.

**Figura 2-11.** Efecto de SB239063 y PD98059 sobre la acción estimulante de la isoquercetina sobre la captación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en el músculo sóleo de rata.



Los inhibidores estuvieron presentes en el período de preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación = 30 min; tiempo de incubación = 60 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M con  $n = 4$ . \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con el valor respectivo del grupo control; ## $p < 0,01$  y ### $p < 0,001$  en comparación con el grupo de isoquercetina.

Cabe señalar que se ha demostrado que algunos flavonoides estimulan la captación de glucosa en el músculo esquelético por parte de GLUT4, ya sea a través de la vía MEK/ERK, como en el caso de la apigenina-6-C- (2 "-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilo) - $\beta$ -L-fucopyranoside (Cazarolli et al., 2009), rutina (Kappel et al., 2013a) y kaempferol-3-neohesperidosido

(Cazarolli, 2009a), o por la vía MAPK p38, como con la baicalina (Fang et al., 2018) o incluso utilizando ambas vías, como en el caso de la kaempferitrina (Cazarolli et al., 2013).

También se ha evidenciado, que la isoquercetina suprime el crecimiento de células de cáncer de hígado a través de la vía de señalización MAPK, actuando específicamente sobre ERK y p38MAPK (Huang et al., 2014). Cabe destacar que la isoquercetina mejora la acumulación lipídica hepática por la activación de la ruta de señalización de AMPK (Qin et al., 2018), lo cual también se podría asociar con la disminución de la esteatosis hepática observado en análisis histopatológico del tejido hepático tratado con la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*, rica en este flavonoide.

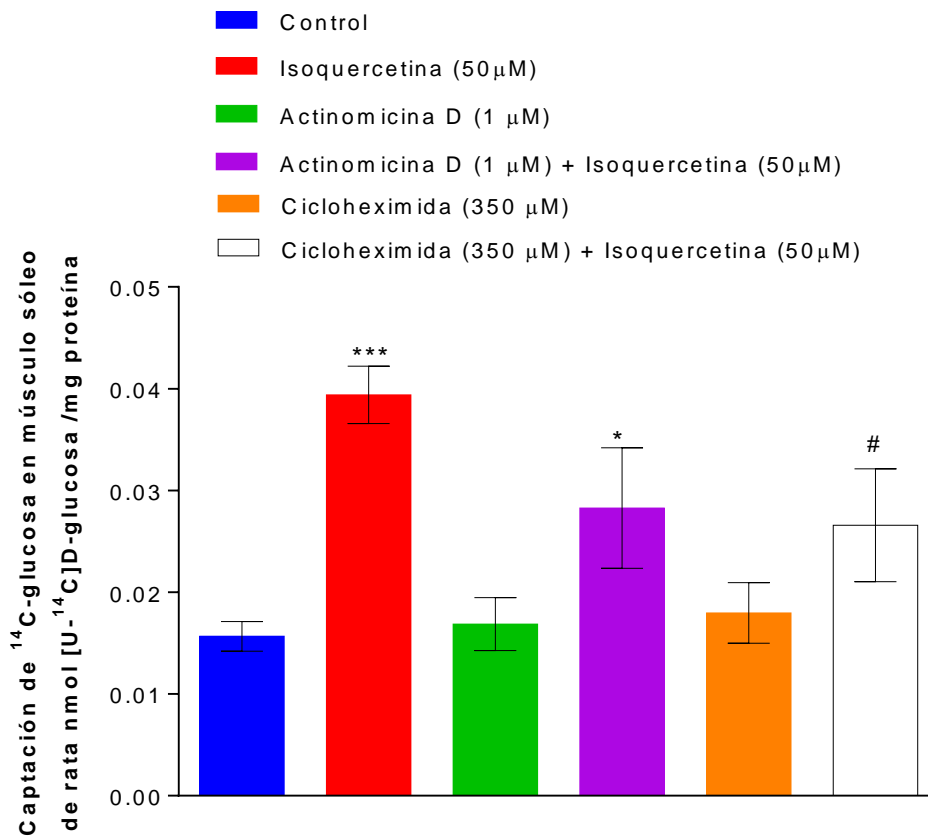
Es de resaltar que los flavonoides con estructura similar a la isoquercetina tales como rutina, apigenina -6-C-(2"-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- $\beta$ -L-fucopiranosido y kaempferitrina (Cazarolli et al., 2012, 2013; Kappel, et al., 2013a) aumentan la síntesis de proteínas y estimulan la vía MAPK para promover la captación de glucosa contribuyendo a la homeostasis de la glucosa. Además, de manera similar a la isoquercetina, tres homoisoflavonoides de *Portulaca oleracea* aumentaron la captación de glucosa al inducir la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática mediante la activación de las vías PI3K / Akt y AMPK en los adipocitos 3T3-L1 (Park et al., 2019).

#### **2.4.6 Participación de la transcripción y traducción en el efecto estimulante de la isoquercetina en la captación de <sup>14</sup>C-DG en el músculo sóleo**

El efecto de la isoquercetina sobre la transcripción del ADN y la traducción del ARNm se estudió en presencia/ausencia de isoquercetina sobre su efecto estimulador sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo. La [figura 2-12](#) muestra que la presencia de 1  $\mu$ M de actinomicina D (Kappel et al., 2013a), inhibidor de la transcripción del ADN, no afectó la captación de glucosa estimulada por el flavonoide. Sin embargo, la incubación conjunta de isoquercetina y 350  $\mu$ M de cicloheximida, un inhibidor de la traducción de

ARNm, (Gomes Castro et al., 2014), reduce significativamente el efecto de la isoquercetina en la captación de glucosa.

**Figura 2-12.** Efecto de la actinomicina D y la cicloheximida sobre el efecto estimulador de la isoquercetina sobre la captación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en el músculo sóleo de rata.



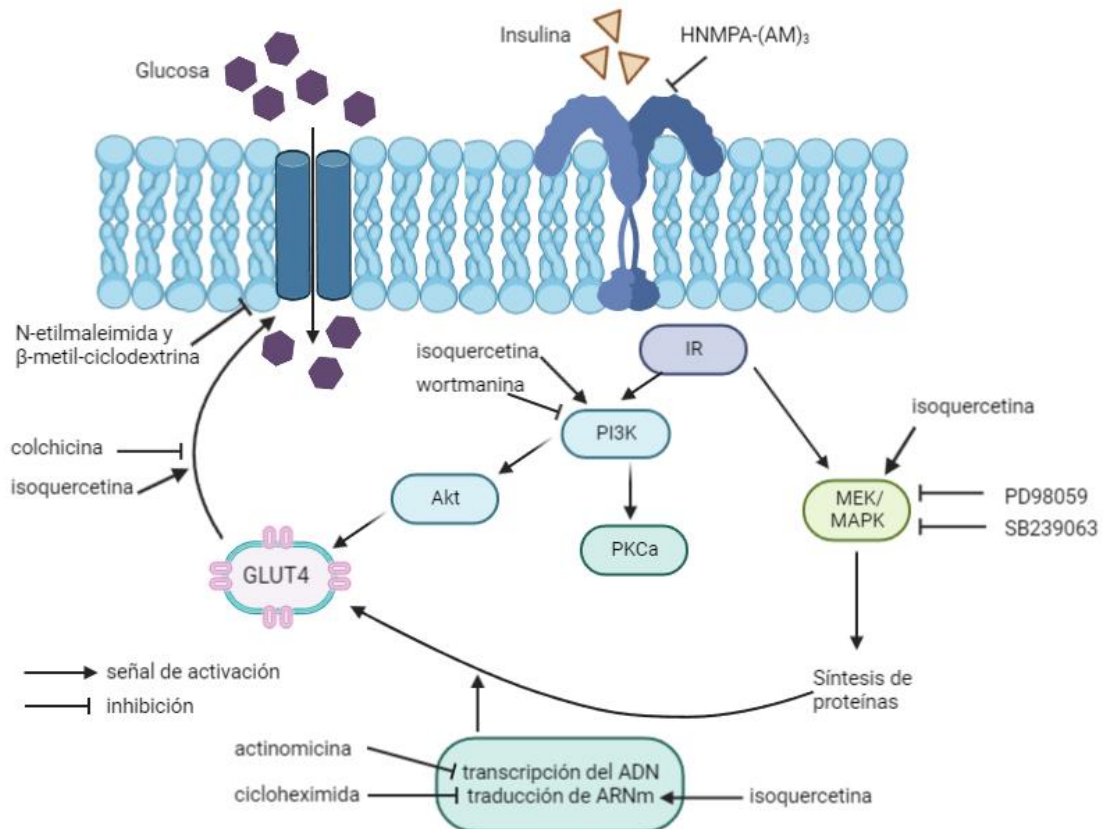
Los inhibidores estuvieron presentes en la preincubación y durante el período de incubación. Tiempo de preincubación= 30 min; tiempo de incubación= 60 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M. con  $n = 4$ . \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con el grupo de control respectivo; # $p < 0,05$  en comparación con el grupo de isoquercetina.

Para evaluar el efecto de la isoquercetina en el núcleo celular, se utilizó actinomicina D y cicloheximida ya que la actinomicina D es un inhibidor de la transcripción que se compleja con el ADN de doble cadena, bloqueando el movimiento de la ARN polimerasa, evitando así la transcripción y, en consecuencia, inhibiendo la síntesis de ARN (Bensaude, 2011). La cicloheximida por su parte, inhibe la síntesis de proteínas al interferir con el paso de traslocación (desplazamiento de dos moléculas de ARN transportador (ARNt) y ARN mensajero (ARNm) en relación con el ribosoma, lo que interfiere con la fase de elongación

en la traducción (Schneider-Poetsch et al., 2010). Dado que el efecto de la isoquercetina solo se vio afectado en presencia de la cicloheximida, se comprueba que este flavonoide mejora la captación de glucosa al aumentar la traducción del ARNm de GLUT4. Hay que destacar que, aunque no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa de la captación de glucosa mediada por isoquercetina en presencia cicloheximida se observa una ligera disminución del efecto mediado por el flavonoide por lo que se sugiere considerar en este ensayo para futuros experimentos realizar una incubación de mayor tiempo en presencia de este inhibidor para descartar que el efecto no sea mediado por la transcripción del ADN.

La [figura 2-13](#) resume las diferentes rutas de señalización que usa la isoquercetina para mediar la captación de glucosa en el músculo sóleo aislado.

**Figura 2-13.** Vías de señalización que utiliza la isoquercetina para la captación de la glucosa en el músculo sóleo.



La isoquercetina activa las vías PI3K, MAPK y MEK/ERK y la síntesis proteica del transportador GLUT-4. Receptor de insulina (IR), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K),

fosfoquinasa B (Akt), proteína quinasa C (PKC), transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), Figura de autoría propia utilizando Biorender®.

Dado que la astragalina no demostró tener actividad en la captación de glucosa se evaluó a continuación si había un efecto en la liberación de insulina en los islotes  $\beta$ -pancreáticos mediada por la astragalina. Primero se realizó un TTOG para saber si había un efecto en el control de la glicemia. También se midió la insulina sérica para evidenciar si dicho efecto se asociaba a la secreción de insulina.

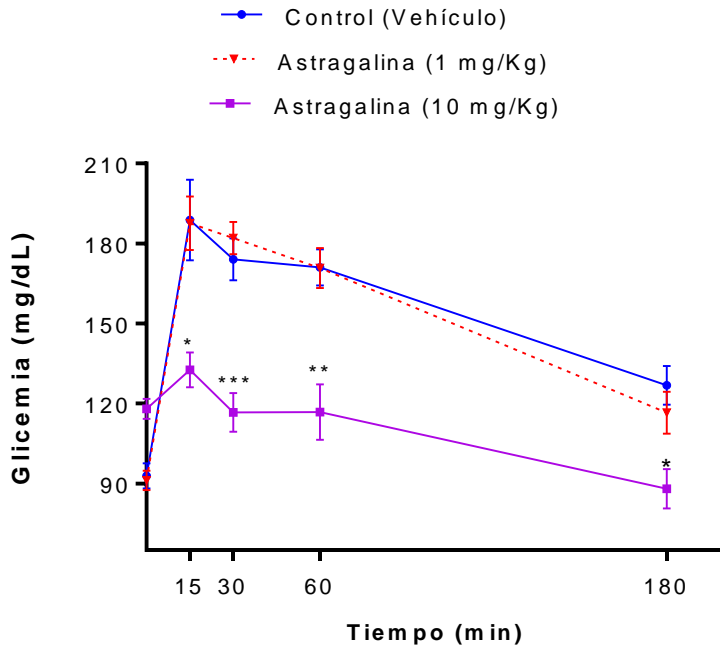
#### **2.4.7 Test de tolerancia oral a glucosa (TTOG) y niveles de insulina plasmática.**

Como se muestra en la [figura 2-14](#), luego de administrar por vía oral en ratas 1 mg/ Kg y 10 mg/ Kg de astragalina, se observó una reducción de la glucosa sérica con 10 mg/ Kg durante el periodo estudiado. Esta dosis de astragalina redujo la glicemia en 30% a los 15 min, en 33% a los 30 min, en 32% a los 60 min y en 31% a los 180 min, comparado con el control en los mismos tiempos.

La astragalina es un glicósido flavonol del kaempferol. Previamente, se ha demostrado que algunos flavonoides estructuralmente similares tienen efectos hipoglicemiantes, tales como kaempferitrina, kaempferol 3-neohesperidósido (Cazarolli et al., 2006, 2009a), isovitexina y swertisina (Folador et al., 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que algunos flavonoides aumentan la secreción de insulina; estos incluyen rutina (Kappel et al., 2013b), quercetina y kaempferol (Soares et al., 2017).



**Figura 2-14.** Efecto de astragalina (1 mg/Kg y 10 mg/Kg) sobre la curva de tolerancia oral a la glucosa en ratas, después de una sobrecarga oral de glucosa (4 g/Kg).

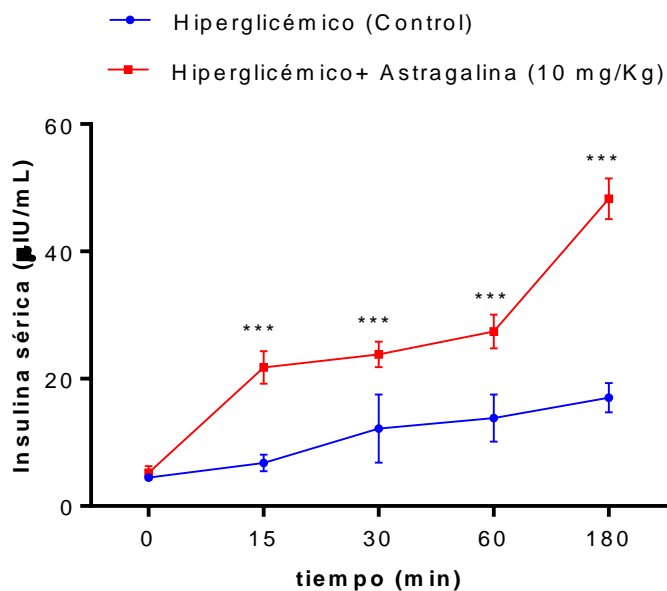


Los valores se expresan como medias  $\pm$  E.E.M,  $n = 6$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ , en comparación con el valor respectivo en el grupo control con hiperglicemia y utilizando ANOVA de una vía seguido de Bonferroni prueba post hoc para cada uno de los tiempos en que se tomaron las muestras.

En este mismo experimento, después de la sobrecarga de glucosa (4 g/Kg), se determinó la insulina plasmática en ratas en ayuno a los 15, 30 y 60 min. Como se muestra en la [figura 2-15](#), ocurrió un aumento significativo en la secreción de insulina después de la administración de astragalina, con aumentos de aproximadamente 220 % a los 15 min, de 95 % a los 30 min, de 98 % a los 60 min y de 183 % a los 180 min, en relación con los valores observados para estos mismos tiempos en el grupo control hiperglicémico.

El aumento abrupto de la glucosa posprandial promueve la secreción de insulina, que se caracteriza por un patrón bifásico (Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008). Estos resultados demostraron claramente que la astragalina potencia tanto la primera fase (entre 4 a 10 min) como la segunda fase (mantenimiento gradual del aumento y durabilidad prolongada) de la secreción de insulina.

**Figura 2-15.** Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina plasmática en ratas hiperglicémicas.



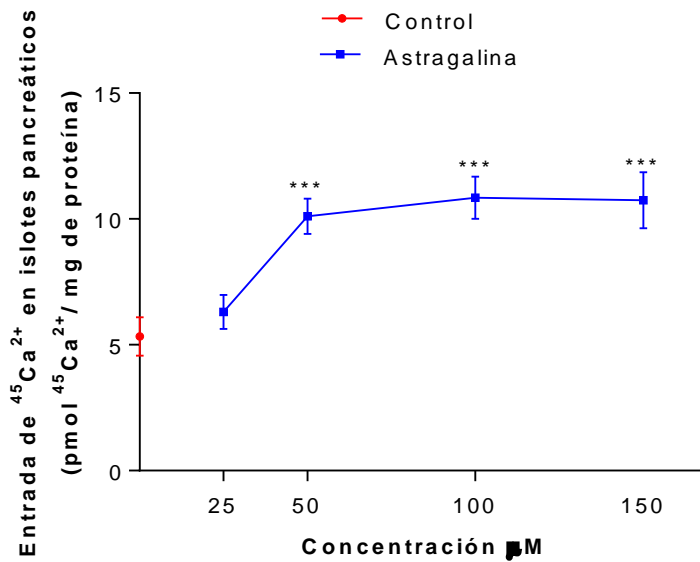
Los valores se expresan como medias  $\pm$  E.E.M; n = 4. \*\*p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001 comparado con el valor respectivo del grupo control hiperglicémico y utilizando la prueba t de Student para cada uno de los tiempos en que se tomaron las muestras.

#### 2.4.8 Curva dosis-respuesta del efecto de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos.

Las señales de calcio regulan tanto la primera como la segunda fase de la secreción de insulina, y el calcio actúa como segundo mensajero en la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (Gilon et al., 2014).

Se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos aislados. Como se muestra en la [figura 2-16](#), solamente a concentraciones a partir de 50  $\mu$ M de astragalina aumenta la entrada de calcio en porcentajes superiores a 76%. Para posteriores experimentos, se determinó utilizar la astragalina a una concentración de 100  $\mu$ M.

**Figura 2-16.** Curva dosis-respuesta del efecto de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los islotes pancreáticos de ratas de 50 días.

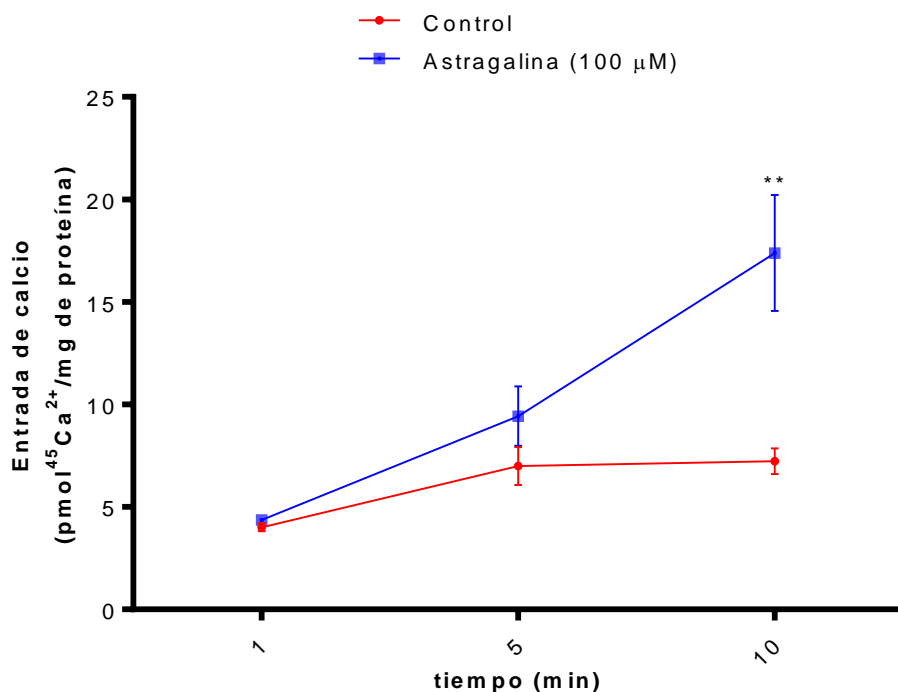


Preincubación = 60 min; Incubación = 10 min. Los valores se expresan como medias  $\pm$  E.E.M; n = 5. Significativo para \*\*\*  $p < 0,001$ , en comparación con el grupo control y utilizando la prueba t de Student para cada una de las concentraciones.

### 2.4.9 Evolución temporal del efecto de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos

El efecto de la astragalina (100  $\mu\text{M}$ ) sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos aislados fue determinado a diferentes tiempos (1, 5 y 10 min). Al comparar con el grupo control, la astragalina a los 10 minutos incrementó 2,4 veces la entrada de calcio en los islotes pancreáticos aislados ([figura 2-17](#)). Para experimentos posteriores se terminó trabajar con la misma concentración de astragalina (100  $\mu\text{M}$ ), con 10 min de incubación.

**Figura 2-17.** Evolución temporal del efecto de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en islotes pancreáticos de rata aislados.



Los islotes pancreáticos se preincubaron durante 60 min con 0,1  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Después se incubaron con/sin 100  $\mu\text{M}$  de astragalina durante 1, 5 y 10 min. Los valores son medias  $\pm$  E.E.M;  $n=5$ . \*\* $p < 0,01$  al comparar con el grupo control y utilizando la prueba t de Student para cada uno de los tiempos en que se tomaron las muestras.

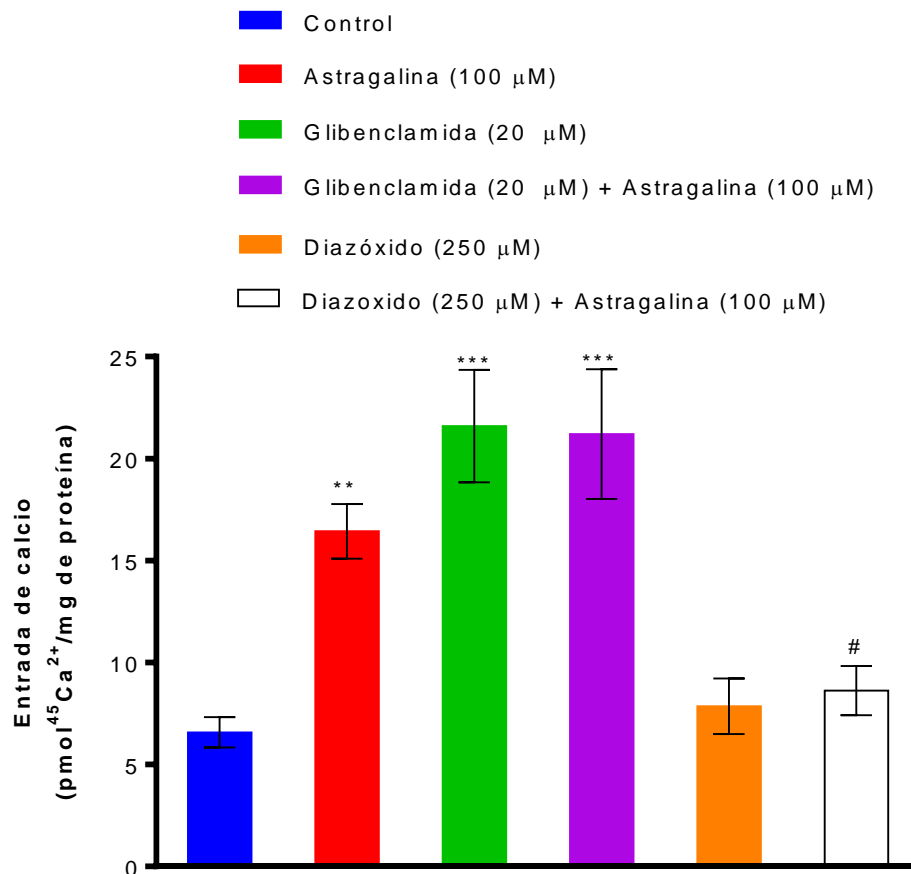
La astragalina, al igual que otros flavonoides como la quercetina y la rutina, libera insulina y aumenta la entrada de calcio de los islotes pancreáticos aislados de rata (Kappel et al., 2013b). Cabe señalar que las concentraciones de astragalina utilizadas para estas pruebas ya habían sido reportadas previamente en otras pruebas *in vitro* por otros autores, demostrando el rango de concentraciones de su actividad biológica (Kim & Kim, 2011; Ma et al., 2015; Park et al., 2012).

#### **2.4.10 Participación de los canales $K^+_{ATP}$ en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos**

La glibenclamida, al igual que otras sulfonilúreas, es un bloqueador de los canales  $K^+_{ATP}$ . Este compuesto se utilizó para bloquear estos canales, provocando la despolarización de la membrana de las células  $\beta$ -pancreáticas, lo que, como se menciona con anterioridad, es esencial para la secreción de insulina (McTaggart et al., 2010; Trube et al., 1986). El diazóxido ejerce el efecto contrario, uniéndose al dominio SUR1 de los canales  $K^+_{ATP}$  y permitiendo su activación, impidiendo la despolarización de la membrana y en consecuencia impide la liberación de insulina (Gomes al., 2014; Trube et al., 1986).

Para conocer si el aumento de la entrada de calcio inducido por astragalina se produce a través de los canales  $K^+_{ATP}$ , se utilizó glibenclamida (20  $\mu$ M) y diazóxido (250  $\mu$ M). Como se observa en la [figura 2-18](#), en presencia de glibenclamida y astragalina la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  aumentó 2,3 veces en comparación con el control. Sin embargo, al probar astragalina junto con glibenclamida no se observó ningún efecto estimulante adicional. Por otro lado, como era de esperar, el diazóxido disminuyó significativamente la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y, en presencia de este compuesto el efecto estimulante de la astragalina en el aumento de la entrada de calcio disminuyó en un 47,5 %.

**Figura 2-18.** Participación de los canales de potasio en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los islotes pancreáticos.



Los islotes se incubaron con glibenclamida (20  $\mu\text{M}$ ) o diazóxido (250  $\mu\text{M}$ ) durante los últimos 15 min de la preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; Incubación = 10 min. Los valores se expresan como la media  $\pm$  E.E.M; n = 5. \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001; en comparación con el grupo de control; #p < 0,05; en comparación con el grupo de astragalina y utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc de Bonferroni.

Aunque en presencia de glibenclamida con astragalina no se cambió el efecto estimulante de astragalina sobre la entrada de calcio, podemos sugerir que el efecto de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos sí depende de los canales  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  de la membrana plasmática. Esta sugerencia se deriva del hecho de que la presencia de astragalina ejerció un efecto sobre los canales de potasio similar al ejercido por glibenclamida y otros flavonoides, como la miricetina (Hagenacker et al., 2010), el kaempferol (Zhang & Liu, 2011) y la quercetina (Kittl et al., 2016), que han demostrado aumentar la despolarización y por lo tanto la secreción de insulina. La despolarización

mediada por los canales  $K^+_{ATP}$  se produce durante la primera fase de la secreción de insulina y está mediada por vesículas fácilmente liberables, lo que explica el efecto de la astragalina durante la primera fase de la liberación de insulina de las células beta pancreáticas.

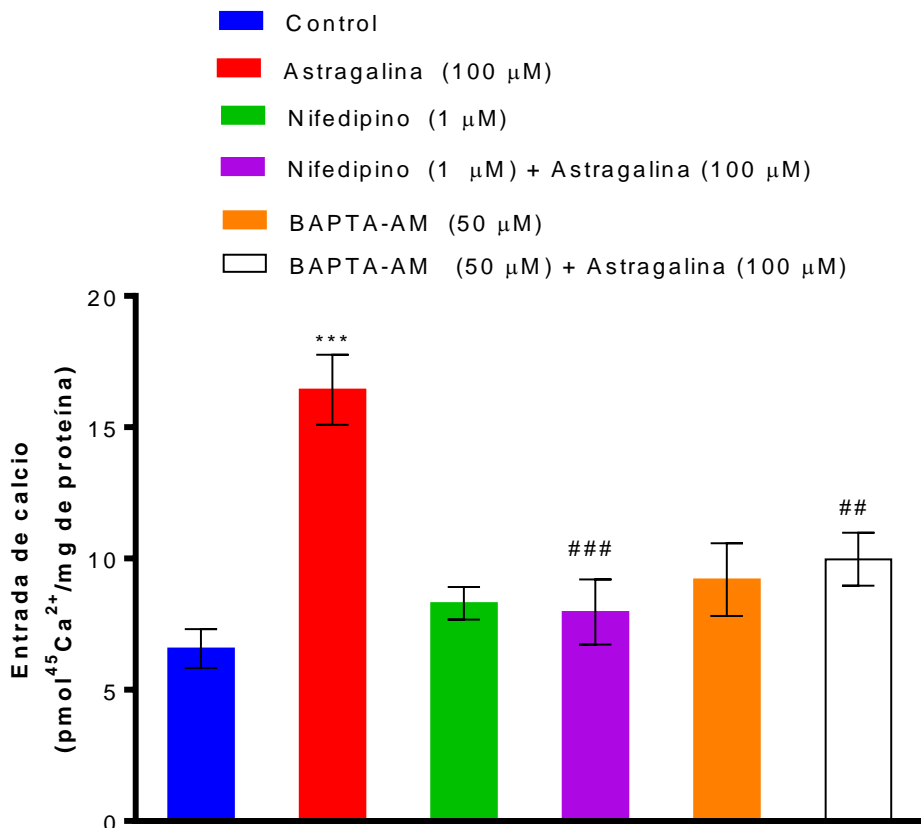
#### **2.4.11 Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos.**

El metabolismo de la glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas activa varias vías intracelulares, incluida la señalización de  $Ca^{2+}$  intracelular, que se dirige a varias proteínas, como CCDV-L (MacDonald et al., 2005). El metabolismo de la glucosa conduce al cierre de los canales  $K^+_{ATP}$ , la despolarización de la membrana plasmática y, posteriormente, la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV-L, seguido de la exocitosis de los gránulos de insulina. Se han observado CCDV-L de células  $\beta$  disfuncionales en pacientes diabéticos y también en modelos animales diabéticos (Yang & Berggren, 2006).

Se estudió el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (CCDV-L) y el calcio intracelular en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}Ca^{2+}$ . Como era de esperar ([figura 2-19](#)), en presencia de nifedipino y BAPTA-AM solos, la entrada de calcio no aumentó y, en presencia de estos dos inhibidores, el efecto estimulante sobre la entrada de calcio de la astragalina disminuyó en un 52 % y un 39 %, respectivamente.

Este estudio evidenció que, en presencia de nifedipino (bloqueador de CCDV-L), el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio se bloqueó por completo. Algunos estudios han demostrado que otros flavonoides, como la rutina (Kappel et al., 2013b), la quercetina (Bardy et al., 2013) y el kaempferol (Xu et al., 2015), exhiben vías de señalización intracelular similares.

**Figura 2-19.** Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje y el calcio intracelular en el efecto de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los islotes pancreáticos.



El nifedipino (1  $\mu\text{M}$ ) y BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) estuvieron presentes durante los últimos 15 min de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; Incubación = 10 min. Los valores se expresan como la media  $\pm$  E.E.M; n = 5. \*\*\* p < 0,001, en comparación con el grupo control; ## p < 0,01 y ### p < 0,001, en comparación con el grupo de astragalina y utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de Bonferroni prueba post-hoc.

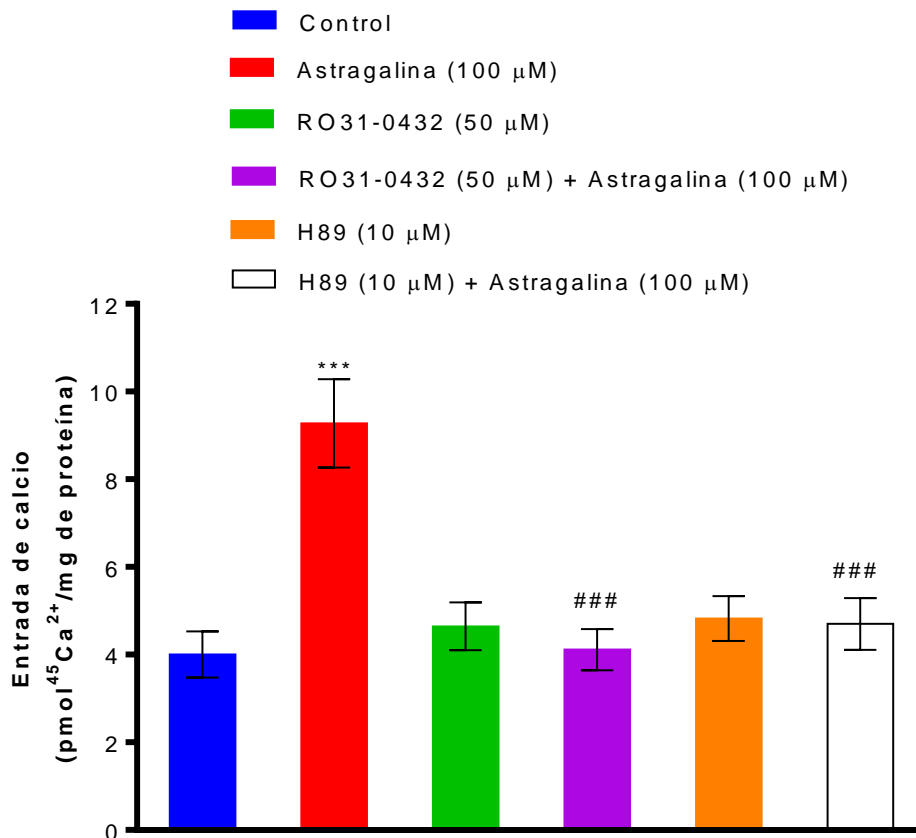
#### 2.4.12 Participación de PKC y PKA en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos.

La activación de PKC y PKA, implicadas en varias vías de transducción de señales, puede conducir a un ligero aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los islotes pancreáticos (Rorsman et



al., 2012). Por lo tanto, se estudió la implicación de estas proteínas quinasas en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio. Se usaron dos inhibidores: RO31-0432, un inhibidor de PKC, activado por un aumento en diacilglicerol (DAG) o iones de calcio (Wilkinson et al., 1993) y H89, un inhibidor de proteína dependiente de AMP cíclico de PKA (Lochner & Moolman, 2006).

**Figura 2-20.** Influencia de las proteínas quinasas (PKC y PKA) sobre el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los islotes pancreáticos.



RO310432 (50  $\mu\text{M}$ ) y H89 (10  $\mu\text{M}$ ) estuvieron presentes durante los últimos 15 min de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; Incubación = 10 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M; n = 5. Significativo para \*\*\*  $p < 0.001$ ; en comparación con el grupo control. Significativo para ###  $p < 0,001$ ; en comparación con el grupo de astragalina y utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc de Bonferroni.

Los islotes se incubaron en presencia de RO31-0432 (50  $\mu\text{M}$ ) o H89 (10  $\mu\text{M}$ ) para evaluar el rol de las proteínas quinasas en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio en células pancreáticas aisladas. Cuando se incubó astragalina en presencia de

estos inhibidores se observó disminuciones significativas del 56 % y el 43 %, respectivamente, en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ([figura 2-20](#)).

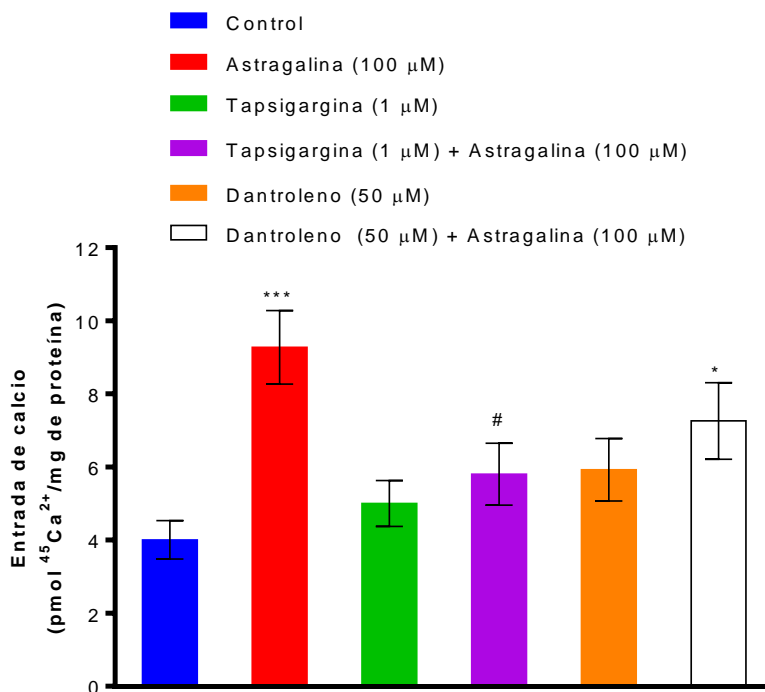
La inhibición del efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio indica que dicha estimulación está mediada por la acción de estas proteínas quinasas. Estudios previos muestran que la activación de PKC modula la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (Arkhammar et al., 1994; Benes et al., 1999; Safayhi et al., 1997). Otros flavonoides han demostrado influir en la homeostasis de la glucosa y activan la PKC y la PKA, por ejemplo, la quercetina induce la fosforilación de ERK1/2 en las células  $\beta$  pancreáticas, lo que potencia la secreción de insulina (Youl et al., 2010) y también estimula la captación de glucosa a través de la vía de la proteína quinasa activada por AMP en el músculo (Eid et al., 2010). También, la kaempferitrina puede activar la PKC, promoviendo la captación de glucosa en el músculo esquelético (Cazarolli et al., 2013). Además, el kaempferol puede activar la Akt hepática, suprimiendo la gluconeogénesis hepática y mejorando la sensibilidad a la insulina hepática (Alkhalidy et al., 2018), mientras que se ha demostrado que la rutina aumenta la captación de glucosa del músculo esquelético al activar la PKA y estimula la entrada de calcio en los islotes pancreáticos al activar la PKC (Kappel et al., 2013b).

#### **2.4.13 Participación del calcio de los depósitos en el efecto estimulador de la astragalina sobre la entrada de calcio en los islotes pancreáticos.**

El aumento abrupto del calcio intracelular, tanto del medio extracelular como de los depósitos internos del retículo endoplásmico (RE), es determinante para la secreción de insulina por parte de las células beta (Santulli et al., 2017). El BAPTA-AM se usó como quelante de calcio intracelular. Por otra parte, la taspigargina es un inhibidor no competitivo de las ATPasas de calcio de retículo sarco/endoplásmico (SERCA), una bomba de calcio dependiente de ATPasa ubicada en la membrana del RE y responsable de la recaptación de calcio en el RE cuando la concentración es baja dentro del RE. La inhibición de esta

bomba conduce a una disminución de los niveles de calcio en el RE y un aumento del calcio citosólico, lo que mantiene la captación de calcio extracelular basal (Lytton et al., 1991). Adicionalmente se estudió el efecto de astragalina sobre el canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico; este se activa por pequeñas elevaciones en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), provocando el efecto conocido como liberación de calcio mediada por calcio donde participan los receptores de rianodina (Santulli et al., 2015; Yaras et al., 2005). Este efecto amplifica la señal de calcio producida por otros mecanismos, como la apertura de los canales de calcio presentes en la membrana plasmática o mediante la inhibición de la bomba SERCA (Santulli et al., 2015). Se utilizó dantroleno, un inhibidor de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales del receptor de rianodina (RyR) para estudiar el rol de la astragalina en la liberación de calcio mediada por calcio (Zhao et al., 2001).

**Figura 2-21.** Participación de la movilización de calcio intracelular en el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en los islotes pancreáticos.



La tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ) y el dantroleno (50  $\mu\text{M}$ ) estuvieron presentes durante los últimos 15 min de preincubación y durante la incubación. Preincubación = 60 min; Incubación = 10

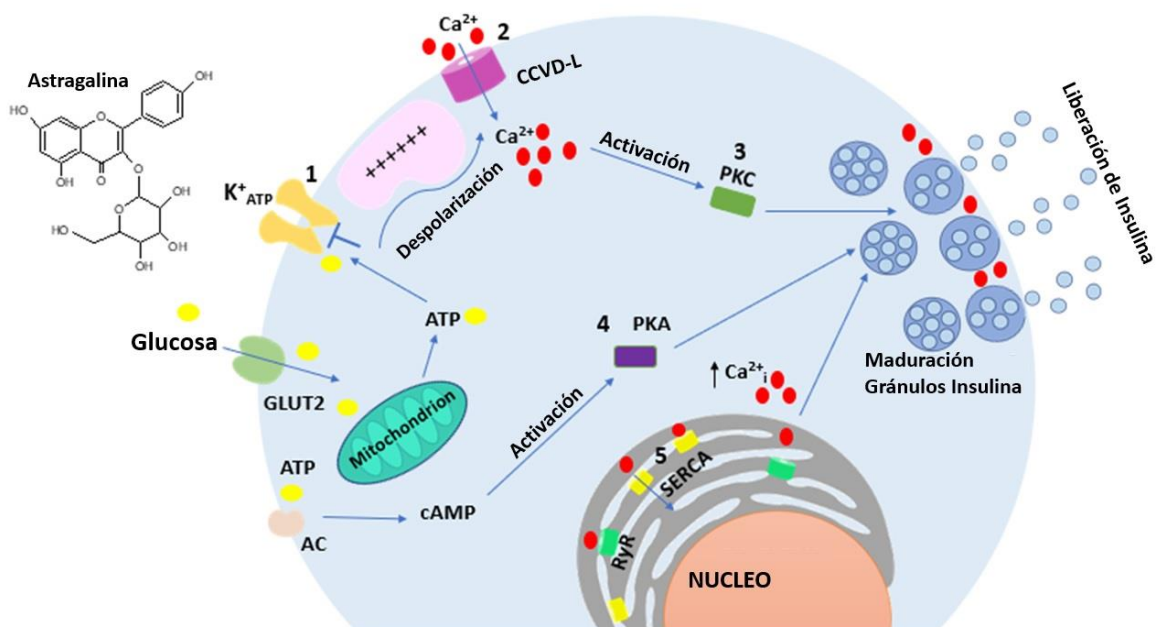
min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n=5. \*p < 0,05 y \*\*\*p < 0,001, en comparación con el grupo control; #p < 0,05, en comparación con el grupo de astragalina

Se estudió el efecto de la astragalina en la movilización del calcio intracelular de los depósitos. Los islotes se incubaron en presencia de tapsigargina (1  $\mu$ M) y dantroleno (50 mM). Como se ve en la [figura 2-21](#), solo en presencia de tapsigargina el efecto estimulante de la astragalina se redujo significativamente en un 37 %.

Dado que el efecto estimulante de la astragalina sobre la entrada de calcio se inhibió en presencia tanto de BAPTA como de tapsigargina, estos datos indican que la astragalina puede aumentar la liberación de ( $[Ca^{2+}]_i$ ), así como estimular la entrada de calcio extracelular a través del CCDV-L. El aumento de la entrada de calcio también puede estimular la liberación de calcio del RE y, en consecuencia, aumentar la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas. Se ha reportado en la literatura previamente que, varios flavonoides inhiben la bomba SERCA, incluidos miricetina (Thiyagarajah et al., 1991), quercetina, galangina, fisetina y kaempferol, entre otros (Ogunbayo et al., 2008). Conociendo que la inhibición de la bomba SERCA aumenta la magnitud de la entrada de  $Ca^{2+}$  desencadenada por la despolarización y la subsiguiente exocitosis de insulina en células  $\beta$  pancreáticas de rata (Hughes et al., 2006), un posible mecanismo por el cual la astragalina aumenta el calcio intracelular puede ser a través de la inhibición de SERCA.

La [figura 2-22](#) resume las diferentes rutas de señalización que utiliza la astragalina para promover la entrada de calcio a los islotes pancreáticos y por tanto la secreción de insulina.

**Figura 2-22.** Propuesta del mecanismo de acción de la astragalina sobre el efecto estimulador de la entrada de calcio y la secreción de insulina.

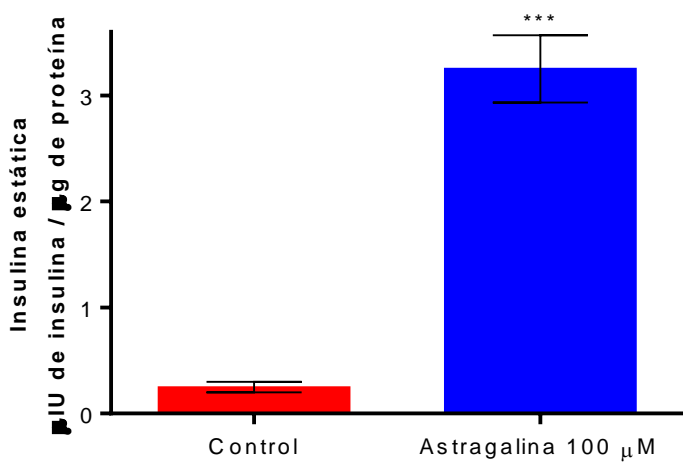


El aumento de la entrada de calcio estimulado por la astragalina puede estar mediado por (1) el cierre del canal K<sup>+</sup>ATP que conduce a la despolarización y (2) la apertura de los CCDV-L y desencadenar la entrada de calcio. (3) el calcio puede activar la PKC y (4) el ATP se convierte en AMPc a través de la adenil ciclasa (AC) que puede activar la PKA, ambas proteínas fosforiladas están relacionadas con la traslocación de los gránulos de insulina a la membrana plasmática. (5) Además, la astragalina promueve la liberación de calcio almacenado en el retículo endoplásmico a través de SERCA. (Imagen autoría propia).

#### 2.4.14 Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal

Se investigó otro parámetro de la homeostasis de la glucosa después del tratamiento ex vivo de islotes pancreáticos aislados con astragalina. La [figura 2-23](#) muestra el efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal de los islotes. El efecto estimulador de astragalina 100 μM sobre la liberación de insulina fue aproximadamente 12 veces mayor que el observado en el grupo control, después de 10 minutos de incubación.

**Figura 2-23.** Efecto de la astragalina sobre la secreción de insulina basal en islotes pancreáticos de rata.



Tiempo de preincubación = 60 min; tiempo de incubación = 10 min. Los valores se expresan como media  $\pm$  E.E.M, n = 5. \*\*\* p < 0,001, en comparación con el grupo control y utilizando la prueba *t* de Student para cada una de las concentraciones.

Finalmente, se demostró que la astragalina aumenta la secreción de insulina en un mecanismo mediado por diferentes dianas intracelulares, lo que conduce a una disminución de la glicemia *in vivo*. Aunque se ha demostrado que varios flavonoides actúan como secretagogos de insulina (Brahmachari, 2011), pocos estudios han descrito sus vías intracelulares como si se investigó en el presente estudio.

## 2.5 Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

La fracción etanólica tiene un efecto antihiperглиcemiante y aumenta glucogénesis hepática en roedores hiperглиcémicos de forma dosis dependiente, lo cual se puede asociar a la presencia en mayor proporción de sus metabolitos mayoritarios la isoquercetina y la astragalina, también indica que la fracción tiene un efecto secretagogo de insulina o insulinomimético.

La isoquercetina demostró aumentar la captación de glucosa en músculo sóleo aislado de forma similar que la insulina, lo que explica el efecto insulinomimético de la fracción etanólica.

Las rutas de señalización que utiliza la isoquercetina para promover la captación de glucosa en el músculo sóleo son:

- la ruta de PI3K,
- activar las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPK/ERK y
- la traducción del ARNm

todo lo anterior promueve la síntesis y traslocación del GLUT4 a la membrana celular y por tanto la captación de glucosa, también requiere de la integridad del citoesqueleto para facilitar el tráfico vesicular del GLUT4. Por otra parte, el receptor de insulina tirosina quinasa, el proceso de acoplamiento y fusión de vesículas en la membrana plasmática, los microdominios de lípidos de la membrana plasmática y la transcripción del ADN del GLUT4 no están involucrados en este efecto.

La astragalina (10 mg/Kg) demostró tener un efecto hipoglicemiante y aumentó la secreción de insulina sérica de forma bifásica, lo cual explicaría el efecto secretagogo de insulina de la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis*.

La entrada de calcio en los islotes  $\beta$ - pancreáticos aislados mediada por la astragalina utiliza las siguientes rutas de señalización:

- los canales de  $K^+_{ATP}$  de manera similar a glibenclamida, lo que explica el efecto secretor de insulina en la primera fase,
- los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L,
- la proteína quinasa C y proteína quinasa A y
- las ATPasas de calcio de retículo sarco/endoplásmico (SERCA)

por otra parte, el canal de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RyR) no está involucrado en este efecto.

La isoquercetina y astragalina, metabolitos mayoritarios de la fracción etanólica, demuestran tener un efecto insulinomimético y secretagogo de insulina respectivamente.

## 2.6 Productos de investigación obtenidos:

- **Poster:** Mechanism action of Astragalin in rat pancreatic islets: Potential secretagogue of insulin effect. **Congreso:** Current Topics in Biochemistry. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis (SC), Brasil. Fecha: 21/05/2018 al 24/05/2018.
- **Ponencia Oral:** Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of isoquercetin on glucose uptake in soleus muscle from rats. **Congreso:** PSE Meeting - Natural Products in Drug Discovery and Human Health, Facultad de Farmacia, Universidad de Lisboa. Lisboa. Portugal. **Fecha:** 28/07/2019 al 31/07/2019.
- **Artículo publicado:** Astragalin augments basal calcium influx and insulin secretion in rat pancreatic islets. **Año:** 2019. **Journal:** Cell Calcium, vol. 80, pag. 56-62.
- **Artículo publicado:** Cellular target of isoquercetin from *Passiflora ligularis* Juss for glucose uptake in rat soleus muscle. **Año:** 2020. **Journal:** Chemico-Biological Interactions, vol. 330, # 109198.



## 3. Conclusiones y recomendaciones

### 3.1 Conclusiones

Se determinó el efecto antihiperlicemiante de 500 mg/Kg de extracto acuoso y 500 mg/Kg de fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* en ratas después de la administración de una sobrecarga oral de glucosa, dado que la fracción acuosa del extracto no mostró este efecto se puede deducir que los metabolitos menos polares son los responsables de dicha actividad. El análisis cromatográfico del extracto acuoso y fracción etanólica reveló la presencia de isoquercetina (quercetina-3-O-glucósido) y astragalina (kaempferol-3-O-glucósido) como metabolitos mayoritarios y que estos se encontraban en mayor proporción en la fracción etanólica.

Se demostró el efecto antidiabético de 500 mg/Kg de extracto acuoso y de 250 mg/Kg de fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* ya que en ratones con diabetes inducida por dieta rica en grasa y dosis bajas de estreptozotocina (HFD/STZ), después de 21 días de tratamiento produjeron reducción en los siguientes parámetros: niveles de glucosa en sangre, resistencia a insulina, niveles de triglicéridos totales, LDL, colesterol total y peroxidación lipídica. Por otra parte, aumentaron los niveles de HDL, la actividad enzimática de SOD y CAT y demostraron tener un efecto protector en riñón, hígado y páncreas.

Dado que en todos los parámetros (anteriormente mencionados) medidos para evaluar el efecto antidiabético la fracción etanólica tuvo mejores resultados, podemos concluir que el efecto se puede asociar a la presencia en mayor proporción de flavonoides en la fracción etanólica de los cuales se pueden destacar isoquercetina y astragalina, este efecto se comprueba en ratas hiperlicémicas donde la fracción etanólica aumentó el glucógeno

hepático y muscular de forma dosis dependiente, lo que indica un efecto insulinomimético o secretagogo de insulina.

La isoquercetina, interviene en el efecto estimulante sobre la captación de glucosa en el músculo sóleo aislado, los datos obtenidos respaldaron el papel de la traslocación del transportador de glucosa en las vías de señalización de la isoquercetina, predominando un efecto estimulante sobre la captación de glucosa. Para ello, la isoquercetina activa las vías PI3K, MAPK y MEK/ERK y la síntesis proteica del transportador GLUT-4. Estas comparaciones en el desempeño de las proteínas quinasas y fosfatasas en el efecto estimulador de la isoquercetina y la insulina sobre la captación de glucosa establecen una clara evidencia del papel insulinomimético de la isoquercetina en la homeostasis de la glucosa, principalmente, a través de la traslocación de GLUT-4.

Por su parte, la astragalina ejerce un efecto hipoglicemiante mediado por el aumento de secreción de insulina en ratas hiperglicémicas. En islotes pancreáticos aislados de ratas, la astragalina estimula la entrada de calcio a través de los canales  $K^+_{ATP}$ , CCDV-L, la movilización de calcio de las reservas intracelulares y la activación de las quinasas PKC y PKA, que eventualmente pueden conducir a la secreción de insulina. Hasta donde se conoce, esta es la primera vez que se informa el mecanismo de acción de la astragalina sobre la secreción de insulina y estos resultados sugirieron que la astragalina, de esta forma contribuye a la homeostasis de la glucosa lo cual puede contribuir al tratamiento de la diabetes y mejorar la calidad de vida del paciente

Todos los resultados sugieren que el extracto acuoso y la fracción etanólica enriquecida en flavonoides son potencialmente útiles para el tratamiento de la DMTII, especialmente la fracción etanólica que demuestra tener la isoquercetina y astragalina como metabolitos mayoritarios y presentes en mayor proporción. La isoquercetina y astragalina tienen mecanismos de acción complementarios, por una parte, la astragalina es secretagogo de insulina en los islotes pancreáticos y por otra parte la isoquercetina es insulinomimético estos mecanismos explican que la fracción etanólica presente mejores resultados en la reducción de la glicemia, resistencia insulina, parámetros oxidativos y perfil lipídico encontrados en los ratones diabéticos.

## 3.2 Recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda lo siguiente:

Desarrollar una estandarización y optimización de la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* que sea enriquecida en flavonoides especialmente en isoquercetina y astragalina con el fin de estandarizar y mejorar su actividad antidiabética.

Evaluar la biodisponibilidad de la isoquercetina y astragalina a partir la administración oral de la fracción etanólica de hojas *P. ligularis* con el fin de correlacionarla con la actividad antidiabética. Asimismo, realizar una formulación farmacéutica que facilite la liberación y absorción de la fracción etanólica de hojas de *P. ligularis* (optimizada y estandarizada en los flavonoides astragalina e isoquercetina) así mismo que mejore la biodisponibilidad, especialmente de estos flavonoides que al ser de tipo O-glicosidados pueden sufrir de degradación a nivel intestinal.

En el músculo esquelético (al ser un reservorio de glucosa) y un blanco terapéutico importante de la acción de la insulina, futuros estudios merecen profundizar en las vías de señalización de la insulina, como la vía PI3K, investigando si isoquercetina (y otros similares) alteran la expresión de alguna proteína importante en la vía de señalización que culmina en una mayor o más rápida cantidad de GLUT-4 en la membrana plasmática ya que este efecto de la insulina y esta vía es la acción principal de la insulina que regula rápidamente la glucosa en sangre.

Estudiar mejor el papel de la isoquercetina en las vías de señalización en el músculo esquelético (y el tejido adiposo) que no dependen de la insulina para la captación de glucosa para investigar si podrían aumentar rápidamente esta captación y almacenamiento de glucosa.

En el islote pancreático, célula  $\beta$ -pancreática o en líneas celulares, sería importante estudiar más específicamente otras posibles dianas moleculares que pueden estar involucradas en el mecanismo de acción, tales como la proteína 2 de membrana asociada a vesículas (VAMP-2), las Ras-Raf-MEK-ERK, la p-mTOR, la glucoquinasa y otras numerosas quinasas y fosfatasa involucradas en la secreción de insulina las cuales no

fueron estudiados en el presente estudio. Estas dianas moleculares pueden ser destacadas como sitios importantes para la creación de nuevos fármacos con acción más precisa en el control de la secreción de insulina. Sería relevante profundizar más en los mecanismos moleculares involucrados en dicha secreción.

# A. Anexo: Preparación de reactivos

## A.1 Protocolo extracción y medición de Glucógeno por la técnica de Krisman

1. Pesar de cada rata (hígado o músculo) cerca de 300 mg.
2. Pipetear 2 mL de KOH 33% p/v en tubos falcon de 15 mL y colocar cada muestra (de 300mg) en cada tubo.
3. Hervir a 100°C por 20 a 30 minutos (o hasta homogenizar tejido), tapar tubo. Se recomienda 20 minutos sin agitación y 10 minutos con agitación.
4. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Colocar 4 mL de etanol al 96% de tal forma que quede 60% de etanol en cada tubo. Lo que falte para completar 5mL con agua destilada.
6. Agitar en vortex.
7. Calentar en incubadora por 10 minutos (tapar tubos) a 70°C. tener precaución de no sobrepasar esta temperatura.
8. Colocar inmediatamente en hielo por 15 minutos.
9. Centrifugar por 9 minutos a 2000 rpm.
10. Descartar sobrenadante.
11. Colocar 1mL de agua ultrapura para hígado o 500 µL para músculo. En caso de requerir almacenamiento, guardar a -70°C.
12. En una placa de 96 pozos realizar curva patrón con glicógeno (0,05 mg/mL a 1mg/mL).

Para la colocación de la muestra en la microplaca se hace de la siguiente forma

Para Hígado: 3µL de muestra+17 µL de agua desionizada+ 130 µL de reactivo de color

Para Músculo: 10 µL de muestra + 10 µL de agua desionizada +130 µL de reactivo de color

### **Preparación de reactivo de color**

Solución saturada de CaCl<sub>2</sub>: 74,5 g en 100 mL de Agua destilada (preparar en recipiente plástico por calentamiento).

Reactivo de Iodo (Iodo – Iodina) disolver 0,26g de I<sub>2</sub> + 2,6 de KI en 10mL de agua destilada.

Mezclar 130mL de una solución saturada de  $\text{CaCl}_2$  con 0,5 mL de una solución  $\text{KI}+\text{I}_2$ . Esta mezcla es estable por dos semanas en nevera.

### A.2 Preparación reactivo de Krebbs

Preparación de Krebbs adicionar en el siguiente orden:

Reactivo	Concentración final (M)	g para 100mL
1. NaCl	3,10	18
2. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,031	0.422
3. KCl	0,123	0.920
4. $\text{NaHCO}_3$	0,65	5.460
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,031	0.764
6. $\text{CaCl}_2$	0,065	0.960 (adicionar al final)

Adicionar 3 mM de glucosa (solo el día de realización del experimento)

Calcular cuánto Krebbs hacer en cada experimento

Por ejemplo, si va a preparar 26mL se realiza así:

Tomar 1mL de cada reactivo para un total de 6 mL, agregar 20 mL de agua destilada para un volumen total de 26 mL y adicionar 0,0140 g de glucosa.

### A.3 Preparación reactivo de Lowry-Folin para determinación de proteína

Se determina proteína utilizando el reactivo de Lowry y Folin lo cuales se preparan de la siguiente forma:

#### Preparación CTC: Cobre- Tartrato- Carbonato

- **Solución 1:** Carbonato de sodio: 20g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 100 mL de agua destilada o comprar en farmacia la solución al 20%.
- **Solución 2:** Sulfato de Cobre: 0,2g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 40 mL de agua destilada
- **Solución 3** Tartrato de sodio y potasio: 0,4g  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 40 mL de agua destilada.

Mezclar soluciones 1, 2 y 3 en agitación y las proporciones de 50:0,5:0,5 (en volumen).

Almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar cubierto con aluminio.

#### Preparación de reactivo de Lowry

10 mL de Solución de Cobre- Tartrato- Carbonato (CTC)

10 mL de Solución de dodecilsulfato sódico (SDS) 10%

12 mL de NaOH 1N

12 mL Agua destilada

Almacenar en frasco ámbar cubierto de aluminio.

Válido por 2 semanas en nevera, debe agitarse antes de usar.

#### Preparación Albúmina 1 mg/mL

Pesar 0,01 g de albúmina bovina y disolver en 10 mL de agua destilada, dividir en alícuotas de 500  $\mu$ L y congelar.

#### Preparación Folin 0,4N

Para 50mL mezclar 10mL Folin 2N + 40mL de agua destilada.

Colocar en una microplaca de la siguiente forma:

Patrón de Albúmina 1mg/mL ( $\mu$ L)		Agua destilada $\mu$ L	Reactivo de Lowry $\mu$ L	Esperar 10 minutos	Reactivo de Folin ( $\mu$ L)	Esperar 30 minutos	Leer a 620nm
A	0	100	100		50		
B	2	98	100		50		
C	5	95	100		50		
D	10	90	100		50		
E	15	85	100		50		
F	20	80	100		50		
G	30	70	100		50		
H	40	60	100		50		
Muestras de 5 -20 $\mu$ L		c.s.p 100 $\mu$ L	100		50		

#### A.4 Preparación de cloruro de Lantano ( $\text{LaCl}_3$ )

Preparación solución madre: debe estar 10 veces más concentrada para que al mezclar quede en la concentración deseada.

Reactivo	Concentración (M)	g para 50mL
1. NaCl	1,275	3,723
2. $\text{LaCl}_3$	0,1	1.857
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,012	0,148
4. HEPES	0,1	1,1192
5. KCl	0,04	0,171

Glucosa 11mM (pesar y mezclar en el día del experimento).

Día de experimento

Para preparar 10mL se requiere mezclar 1mL de cada una de las soluciones anteriormente mencionadas en el orden específico y al final adicionar 0,0198 g de glucosa, 5 mL de agua destilada y ajustar a un pH de 7,3 con NaOH 1 N.





## Bibliografía

- Abdelhameed, R. F. A., Ibrahim, A. K., Elfaky, M. A., Habib, E. S., Mahamed, M. I., Mehanna, E. T., Darwish, K. M., Khodeer, D. M., Ahmed, S. A., & Elhady, S. S. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cynanchum acutum* L. isolated flavonoids using experimentally induced type 2 diabetes mellitus: biological and in silico investigation for NF- $\kappa$ B pathway/miR-146a expression modulation. *Antioxidants*, *10*(11), 1713. <https://doi.org/10.3390/antiox10111713>
- Aguilar-Bryan, L., Clement, J. P., Gonzalez, G., Kunjilwar, K., Babenko, A., & Bryan, J. (1998). Toward understanding the assembly and structure of K<sub>ATP</sub> channels. *Physiological Reviews*, *78*(1), 227–245. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.227>
- Agyemang, K., Han, L., Liu, E., Zhang, Y., Wang, T., & Gao, X. (2013). Anti-diabetic research: pharmacological effects of its phytochemical constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 654643. <https://doi.org/10.1155/2013/654643>
- Alam, Md. M., Meerza, D., & Naseem, I. (2014). Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sciences*, *109*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.06.005>
- Al-Awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Szucs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., & Varga, C. (2016). Experimental diabetes mellitus in different animal models. *Journal of Diabetes Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- Algariri, K., Meng, K. Y., Atangwho, I. J., Asmawi, M. Z., Sadikun, A., Murugaiyah, V., & Ismail, N. (2013). Hypoglycemic and anti-hyperglycemic study of *Gynura procumbens* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *3*(5), 358–366. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60077-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60077-5)
- Algoblan, A., Alalfi, M., & Khan, M. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 587. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>

- AL-Ishaq, Abotaleb, Kubatka, Kajo, & Büsselberg. (2019). Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules*, 9(9), 430. <https://doi.org/10.3390/biom9090430>
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, A., Luo, J., McMillan, R. P., Wang, Y., Zhen, W., Hulver, M. W., & Liu, D. (2018). Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.014>
- Altunkaynak, B. Z., & Ozbek, E. (2009). Overweight and structural alterations of the liver in female rats fed a high-fat diet: a stereological and histological study. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 20(2), 93–103.
- American Diabetes Association. (2022). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement\_1), S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- American Diabetes Association (ADA). (2017). Lifestyle management. *Diabetes Care*, 40(Supplement\_1), S33–S43. <https://doi.org/10.2337/dc17-S007>
- American Diabetes Association (ADA). (2021a). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- American Diabetes Association (ADA). (2021b). Introduction: standards of medical care in diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), S1–S2. <https://doi.org/10.2337/dc21-Sint>
- Amir Siddiqui, M., Badruddeen, Akhtar, J., Uddin, S., Chandrashekharan, S. M., Ahmad, M., Khan, M. I., & Khalid, M. (2022). Chrysin modulates protein kinase IKK $\epsilon$ /TBK1, insulin sensitivity and hepatic fatty infiltration in diet-induced obese mice. *Drug Development Research*, 83(1), 194–207. <https://doi.org/10.1002/ddr.21859>
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C., & Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(6), E1323–E1332. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90617.2008>
- Antunes, L. C., Elkfury, J. L., Jornada, M. N., Foletto, K. C., & Bertoluci, M. C. (2016). Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(2), 138–142. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000169>

- Anurag, P., & Anuradha, C. V. (2002). Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4(1), 36–42. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2002.00178.x>
- Anusooriya, P., Malarvizhi, D., Gopalakrishnan, V. K., & Devaki, K. (2014). antioxidant and antidiabetic effect of aqueous fruit extract of *Passiflora ligularis* Juss. on streptozotocin induced diabetic rats. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/130342>
- Aragón Novoa, D. M., Ospina Giraldo, L. F., Ramos Rodríguez, F. A., Castellanos Hernández, L., Costa Modesti, G., & Barreto Silva, F. R. M. (2021). *Passiflora ligularis* Juss. (granadilla): farmacológicos de una estudios químicos y planta con potencial terapéutico (D. M. Aragón Novoa, Ed.; First). Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
- Araújo Galdino, O., de Souza Gomes, I., Ferreira de Almeida Júnior, R., Conceição Ferreira de Carvalho, M. I., Abreu, B. J., Abbott Galvão Ururahy, M., Cabral, B., Zucolotto Langassner, S. M., Costa de Souza, K. S., & Augusto de Rezende, A. (2022). The nephroprotective action of *Passiflora edulis* in streptozotocin-induced diabetes. *Scientific Reports*, 12(1), 17546. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21826-9>
- Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., Kohler, M., & Berggren, P. O. (1994). Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the  $\beta$ -cell voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2743–2749.
- Aschner, P., Mauricio Muñoz, O., Giron, D., Garcia, O. M., Fernandez Ávila, D. G., Casas, L. A., Bohórquez, L. F., Arángo T., C. M., Carvajal, L., Ramírez, D. A., Sarmiento, J. G., Colon, C. A., Correa G., N. F., Alarcón R., P., & Bústamante S., A. A. (2016). Clinical practice guideline for the prevention, early detection, diagnosis, management and follow up of type 2 diabetes mellitus in adults. *Colombia Medica*, 109–130. <https://doi.org/10.25100/cm.v47i2.2207>
- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ämmälä, C., Bokvist, K., & Rorsman, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(S1994A), 54–65. <https://doi.org/10.1002/jcb.240550007>
- Ashcroft, F. M., & Rorsman, P. (2013). K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(11), 660–669. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.166>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60(9), 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>

- Balibrea, J., & Arias-Díaz, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Diabetes*, 22(2), 160–168.
- Barber, E., Houghton, M. J., & Williamson, G. (2021). Flavonoids as human intestinal  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Foods*, 10(8), 1939. <https://doi.org/10.3390/foods10081939>
- Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J. F., Ravier, M. A., Bertrand, G., Dalle, S., Cros, G., Magous, R., Richard, S., & Oiry, C. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(5), 1102–1113. <https://doi.org/10.1111/bph.12194>
- Barge, S., Deka, B., Kashyap, B., Bharadwaj, S., Kandimalla, R., Ghosh, A., Dutta, P. P., Samanta, S. K., Manna, P., Borah, J. C., & Talukdar, N. C. (2021). Astragaloside mediates the pharmacological effects of *Lysimachia candida* Lindl on adipogenesis via downregulating PPAR $\gamma$  and FKBP51 signaling cascade. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6990–7003. <https://doi.org/10.1002/ptr.7320>
- Barnes, A. S. (2011). The epidemic of obesity and diabetes: trends and treatments. *Texas Heart Institute Journal*, 38(2), 142–144.
- Batra, S., & Sjögren, C. (1983). Effect of estrogen treatment of calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sciences*, 32(4), 315–319.
- Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M. C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A., & Vigneri, R. (2017). Insulin receptor isoforms in physiology and disease: an updated view. *Endocrine Reviews*, 38(5), 379–431. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00073>
- Benes, C., Poitout, V., Marie, J.-C., Matin-Perez, J., Roisin, M.-P., & Fagard, R. (1999). Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochemical Journal*, 340(1), 219–225. <https://doi.org/10.1042/bj3400219>
- Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription*, 2(3), 103–108. <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>
- Berger, C., & Zdzienicka, D. (2020). Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1249–1272. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02383-4>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Blackman, S. M., Cooke, D. W., & Hopkins, J. (2013). *Diabetes*. 1, 649–658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00035-9>

- Bonfanti, D. H., Alcazar, L. P., Arakaki, P. A., Martins, L. T., Agustini, B. C., de Moraes Rego, F. G., & Frigeri, H. R. (2015). ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry*, 48(7–8), 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.026>
- Bösenberg, L. H., & van Zyl, D. G. (2008). The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 13(3), 80–88. <https://doi.org/10.1080/22201009.2008.10872177>
- Brahmachari, G. (2011). Bio-flavonoids with promising anti-diabetic potentials: A critical survey. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry - Research Signpost*, 661(2), 187–212.
- Brereton, M. F., Iberl, M., Shimomura, K., Zhang, Q., Adriaenssens, A. E., Proks, P., Spiliotis, I. I., Dace, W., Mattis, K. K., Ramracheya, R., Gribble, F. M., Reimann, F., Clark, A., Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2014). Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nature Communications*, 5(1), 4639. <https://doi.org/10.1038/ncomms5639>
- Calisti, L., & Tognetti, S. (2005). Measure of glycosylated hemoglobin. *Acta Bio-Medica : Atenei Parmensis*, 76 Suppl 3, 59–62.
- Carvajal de Pabón, L. M., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L. M., Restrepo, S. L., Álvarez, J. M., Bonilla, K. C., Clara Ochoa, O., & Sánchez, N. (2011). Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354–363.
- Castro, A. J. G., Frederico, M. J. S., Cazarolli, L. H., Mendes, C. P., Bretanha, L. C., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., de Medeiros Pinto, V. A., da Fonte Ramos, C., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (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>
- Castro Gomes, A. J., Cazarolli, L. H., Bretanha, L. C., Sulis, P. M., Rey Padilla, D. P., Aragón Novoa, D. M., Dambrós, B. F., Pizzolatti, M. G., & Mena Barreto Silva, F. R. (2018). The potent insulin secretagogue effect of betulinic acid is mediated by potassium and chloride channels. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 648(April), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.015>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947–a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

- Cazarolli, L. H., Folador, P., Moresco, H. H., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2009). Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -l-fucopyranoside on  $^{14}\text{C}$ -glucose uptake. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2–3), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.11.012>
- Cazarolli, L. H., Folador, P., Pizzolatti, M. G., & Mena Barreto Silva, F. R. (2009a). Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. *Biochimie*, 91(7), 843–849. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.04.004>
- Cazarolli, L. H., Kappel, V. D., Pereira, D. F., Moresco, H. H., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2012). Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C- $\beta$ -fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. *Fitoterapia*, 83(7), 1176–1183. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.07.003>
- Cazarolli, L. H., Pereira, D. F., Kappel, V. D., Folador, P., Figueiredo, M. D. S. R. B., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2013). Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. *European Journal of Pharmacology*, 712(1–3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.029>
- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Jorge, A. P., de Sousa, E., Horst, H., Woehl, V. M., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., & Silva, F. R. M. B. (2006). Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chemico-Biological Interactions*, 163(3), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.07.010>
- Cazarolli, L., Zanatta, L., Alberton, E., Reis Bonorino Figueiredo, M., Folador, P., Damazio, R., Pizzolatti, M., & Mena Barreto Silva, F. (2008). Flavonoids: Cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(10), 1032–1038. <https://doi.org/10.2174/138955708785740580>
- Chang, Y.-C., & Chuang, L.-M. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 316–331.
- Chen, S., Chen, J., Li, S., Guo, F., Li, A., Wu, H., Chen, J., Pan, Q., Liao, S., Liu, H., & Pan, Q. (2021). High-fat diet-induced renal proximal tubular inflammatory injury: emerging risk factor of chronic kidney disease. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.786599>
- Chippy, J., Lincy, J., & Mathew, G. (2016). Evaluation of anti-diabetic activity of leaves of *Passiflora ligularis* on alloxan induced diabetes mellitus in albino rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 6(4), 518–522.
- Choi, B. H., & Hahn, S. J. (2010). Kv1.3: a potential pharmacological target for diabetes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1031–1035. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.133>

- Choi, J., Kang, H. J., Kim, S. Z., Kwon, T. O., Jeong, S. II, & Jang, S. II. (2013). Antioxidant effect of astragaloside isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Archives of Pharmacal Research*, 36(7), 912–917. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0090-x>
- Choi, S. B., Park, C. H., Choi, M. K., Jun, D. W., & Park, S. (2004). Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(11), 2257–2264. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2257>
- Coman, C., Rugina, O. D., & Socaciu, C. (2012). Plants and natural compounds with antidiabetic action. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 314. <https://doi.org/10.15835/nbha4017205>
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Zucolotto, S. M., Castellanos, L., Ramos, F. A., Reginatto, F. H., & Schenkel, E. P. (2016). Chemical profiles of traditional preparations of four south american *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.005>
- Da Silva Xavier, G. (2018). The cells of the islets of langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- Dabla, P. K. (2010). Renal function in diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*, 1(2), 48. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i2.48>
- Dash, S., Pattnaik, G., Kar, B., Sahoo, N., & Bhattacharya, S. (2021). An approach towards method development to investigate the anti-diabetic activity on experimental animals. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 15(3), 330–348. <https://doi.org/10.5530/ctbp.2021.3.34>
- de Almeida, V. L., Silva, C. G., & Campana, P. R. V. (2021). *Flavonoids of Passiflora: isolation, structure elucidation, and biotechnological application* (pp. 263–310). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91095-8.00004-0>
- Dejager, S., Penforinis, A., Blickle, J.-F., Fiquet, B., & Quere, S. (2014). How are patients with type 2 diabetes and renal disease monitored and managed? Insights from the observational OREDIA study. *Vascular Health and Risk Management*, 341. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S60312>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>

- Di Magno, L., Di Pastena, F., Bordone, R., Coni, S., & Canettieri, G. (2022). The mechanism of action of biguanides: new answers to a complex question. *Cancers*, *14*(13), 3220. <https://doi.org/10.3390/cancers14133220>
- Díaz Horta, O. (2003). El ion calcio: su regulación y función en la célula  $\beta$  pancreática. *Revista Cubana de Endocrinología*, *14*(3), 0–0. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-295320030003000008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-295320030003000008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Doi, K., Yamanouchi, J., Kume, E., & Yasoshima, A. (1997). Morphologic changes in hepatocyte nuclei of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *49*(3–4), 295–299. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80041-3](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80041-3)
- Dowarah, J., & Singh, V. P. (2020). Anti-diabetic drugs recent approaches and advancements. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *28*(5), 115263. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115263>
- Drozdowski, L., & Thomson, A. (2006). Intestinal sugar transport. *World Journal of Gastroenterology*, *12*(11), 1657. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i11.1657>
- Du, Y., & Wei, T. (2014). Inputs and outputs of insulin receptor. *Protein & Cell*, *5*(3), 203–213. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0030-7>
- Duan, Y., Dai, H., An, Y., Cheng, L., Shi, L., Lv, Y., Li, H., Wang, C., He, C., Zhang, H., Huang, Y., Fu, W., Meng, Y., & Zhao, B. (2022). Mulberry leaf flavonoids inhibit liver inflammation in type 2 diabetes rats by regulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/3354062>
- Duarte, I. de A. E., Milenkovic, D., Borges, T. K. dos S., Rosa, A. J. de M., Morand, C., Oliveira, L. de L. de, & Costa, A. M. (2020). Acute effects of the consumption of *Passiflora setacea* juice on metabolic risk factors and gene expression profile in humans. *Nutrients*, *12*(4), 1104. <https://doi.org/10.3390/nu12041104>
- Echeverry, S. M., Rey, D., Valderrama, I. H., Araujo, B. V. de, & Aragón, D. M. (2021). Development of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) to improve the hypoglycemic activity of *Passiflora ligularis* leaves extract. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 64). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102604>
- Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Costa, G. M., Ospina-Giraldo, L. F., & Aragón, D. M. (2018). Development and optimization of microparticles containing a hypoglycemic fraction of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(5), 10–18. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8502>
- Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Nistor, L., Afshar, A., Arnason, J. T., & Haddad, P. S. (2010).



- Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Molecular Nutrition and Food Research*, *54*(7), 991–1003. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900218>
- Eisenreich, A., & Leppert, U. (2017). Update on the protective renal effects of metformin in diabetic nephropathy. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(31). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170404143102>
- Fallah, Z., Tajbakhsh, M., Alikhani, M., Larijani, B., Faramarzi, M. A., Hamedifar, H., Mohammadi-Khanaposhtani, M., & Mahdavi, M. (2022). A review on synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships of 1,2,3-triazole-based  $\alpha$ -glucosidase inhibitors as promising anti-diabetic agents. *Journal of Molecular Structure*, *1255*, 132469. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132469>
- Fang, P., Yu, M., Min, W., Wan, D., Han, S., Shan, Y., Wang, R., Shi, M., Zhang, Z., & Bo, P. (2018). Effect of baicalin on GLUT4 expression and glucose uptake in myotubes of rats. *Life Sciences*, *196*, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.022>
- Farzaei, F., Morovati, M. R., Farjadmand, F., & Farzaei, M. H. (2017). A mechanistic review on medicinal plants used for diabetes mellitus in traditional persian medicine. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *22*(4), 944–955. <https://doi.org/10.1177/2156587216686461>
- Fazakerley, D. J., Krycer, J. R., Kearney, A. L., Hocking, S. L., & James, D. E. (2019). Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism?. *Journal of Lipid Research*, *60*(10), 1720–1732. <https://doi.org/10.1194/jlr.R087510>
- Floch, J.-P. le, Escuyer, P., Baudin, E., Baudon, D., & Perlemuter, L. (1990). Blood glucose area under the curve: methodological aspects. *Diabetes Care*, *13*(2), 172–175. <https://doi.org/10.2337/diacare.13.2.172>
- Folador, P., Cazarolli, L. H., Gazola, A. C., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., & Silva, F. R. M. B. (2010). Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. *Fitoterapia*, *81*(8), 1180–1187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.022>
- Frederico, M. J. S., Castro, A. J. G., Mascarello, A., Mendes, C. P., Kappel, V. D., Stumpf, T. R., Leal, P. C., Nunes, R. J., Yunes, R. A., & Silva, F. R. M. B. (2012). Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *12*(19), 2049–2058. <https://dx.doi.org/10.2174/1568026611212190003>
- Frederico, M., Gomes Castro, A., Menegaz, D., de Bernardis Murat, C., Pires Mendes, C., Mascarello, A., Nunes, R., & Silva, F. R. M. B. (2017). Mechanism of Action of Novel

- Glibenclamide Derivatives on Potassium and Calcium Channels for Insulin Secretion. *Current Drug Targets*, 18(6), 641–650. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160615084752>
- Frederico, M. J. S., Castro, A. J. G., Pinto, V. A. M., Ramos, C. D. F., Monteiro, F. B. F., Mascarello, A., Nunes, R. J., & Silva, F. R. M. B. (2018). Mechanism of action of camphoryl-benzene sulfonamide derivative on glucose uptake in adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4408–4419. <https://doi.org/10.1002/jcb.26506>
- Friedrichsen, M., Mortensen, B., Pehmøller, C., Birk, J. B., & Wojtaszewski, J. F. P. (2013). Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: Role in glucose uptake and insulin sensitivity. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 366, Issue 2, pp. 204–214). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.013>
- Frøde, T. S., & Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.038>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. In *Current Protocols in Pharmacology* (pp. 5.47.1-5.47.20). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- George, P., & McCrimmon, R. (2012). Diazoxide. *Practical Diabetes*, 29(1), 36–37.
- Ghasemi, A., Khalifi, S., & Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408–420. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Gilbert, E. R., Fu, Z., & Liu, D. (2011). Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2011/416254>
- Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G. A., & Ravier, M. A. (2014). Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in type 2 diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 340–361. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.001>
- Ginsberg, H. N., Zhang, Y.-L., & Hernandez-Ono, A. (2005). Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of Medical Research*, 36(3), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.01.005>
- Goldberg, I. J. (2001). Diabetic dyslipidemia: Causes and consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 965–971. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7304>

- Gomes Castro, A. J., Silva Frederico, M. J., Cazarolli, L. H., Bretanha, L. C., Tavares, L. de C., Buss, Z. da S., Dutra, M. F., Pacheco de Souza, A. Z., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2014). Betulinic acid and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 48, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.020>
- Gorovits, N., & Charron, M. J. (2003). What we know about facilitative glucose transporters. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31(3), 163–172.
- Goss, M. J., Nunes, M. L. O., Machado, I. D., Merlin, L., Macedo, N. B., Silva, A. M. O., Bresolin, T. M. B., & Santin, J. R. (2018). Peel flour of *Passiflora edulis* Var. Flavicarpa supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.137>
- Gulliford, M. C., Charlton, J., & Latinovic, R. (2006). Risk of diabetes associated with prescribed glucocorticoids in a large population. *Diabetes Care*, 29(12), 2728–2729. <https://doi.org/10.2337/dc06-1499>
- Guo, X., Wang, Y., Wang, K., Ji, B., & Zhou, F. (2018). Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 19(7), 559–569. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700254>
- Gupta, J., Gupta, A., & Kumar, A. (2018). Role of dietary flavonoids having antidiabetic properties and their protective mechanism. *IJCRCPS*, 5(1), 13–21. <https://doi.org/10.22192/ijrcrps.2018.05.01.004>
- Gupta, R. K., Kumar, D., Chaudhary, A. K., Maithani, M., & Singh, R. (2012). Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3), 801–806. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.021>
- Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K. H., Magnusson, K. E., & Strålfors, P. (1999). Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(14), 1961–1971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544179>
- Hagenacker, T., Hillebrand, I., Büsselberg, D., & Schäfers, M. (2010). Myricetin reduces voltage activated potassium channel currents in DRG neurons by a p38 dependent mechanism. *Brain Research Bulletin*, 83(5), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.07.010>

- Haligur, M., Topsakal, S., & Ozmen, O. (2012). Early Degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver, and kidney in rats: An immunohistochemical study. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/120645>
- Han, Y., Tang, S., Liu, Y., Li, A., Zhan, M., Yang, M., Song, N., Zhang, W., Wu, X., Peng, C., Zhang, H., & Yang, S. (2021). AMPK agonist alleviate renal tubulointerstitial fibrosis via activating mitophagy in high fat and streptozotocin induced diabetic mice. *Cell Death & Disease*, 12(10), 925. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04184-8>
- Hassan, Z., Yam, M. F., Ahmad, M., & Yusof, A. P. M. (2010). Antidiabetic properties and mechanism of action of *Gynura procumbens* water extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules*, 15(12), 9008–9023. <https://doi.org/10.3390/molecules15129008>
- Hawley, J. A., Hargreaves, M., & Zierath, J. R. (2006). Signalling mechanisms in skeletal muscle: Role in substrate selection and muscle adaptation. *Essays in Biochemistry*, 42, 1–12. <https://doi.org/10.1042/bse0420001>
- Henquin, J.-C. (2011). The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S27–S31. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70010-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70010-9)
- Hiriart, M., & Aguilar-Bryan, L. (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(6), E1298–E1306. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90493.2008>
- Ho, G. T. T., Kase, E. T., Wangenstein, H., & Barsett, H. (2017). Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins, and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2677–2685. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05582>
- Hong, H. C., Li, S. L., Zhang, X. Q., Ye, W. C., & Zhang, Q. W. (2013). Flavonoids with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-8-19>
- Hsia, D. S., Grove, O., & Cefalu, W. T. (2016). An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 1. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000311>
- Huang, G., Tang, B., Tang, K., Dong, X., Deng, J., Liao, L., Liao, Z., Yang, H., & He, S. (2014). Isoquercitrin inhibits the progression of liver cancer *in vivo* and *in vitro* via the MAPK signalling pathway. *Oncology Reports*, 31(5), 2377–2384. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3099>
- Huang, J., Imamura, T., Babendure, J. L., Lu, J.-C., & Olefsky, J. M. (2005). Disruption of microtubules ablates the specificity of insulin signaling to GLUT4 translocation in 3T3-

- L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42300–42306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510920200>
- Huang, X.-L., He, Y., Ji, L.-L., Wang, K.-Y., Wang, Y.-L., Chen, D.-F., Geng, Y., OuYang, P., & Lai, W.-M. (2017). Hepatoprotective potential of isoquercitrin against type 2 diabetes-induced hepatic injury in rats. *Oncotarget*, 8(60). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21074>
- Hughes, E., Lee, A. K., & Tse, A. (2006). Dominant role of sarcoendoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and exocytosis in rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 147(3), 1396–1407. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1023>
- Huopio, H., Shyng, S.-L., Otonkoski, T., & Nichols, C. G. (2002).  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels and insulin secretion disorders. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(2), E207–E216. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00047.2002>
- Ibtissem, B. A., Hajer, B. S., Ahmed, H., Awatef, E., Choumous, K., Ons, B., Mounir, Z. K., & Najiba, Z. (2017). Oxidative stress and histopathological changes induced by methylthiophanate, a systemic fungicide, in blood, liver and kidney of adult rats. *African Health Sciences*, 17(1), 154. <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i1.20>
- Janssen, B. J. A., De Celle, T., Debets, J. J. M., Brouns, A. E., Callahan, M. F., & Smith, T. L. (2004). Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1618–H1624. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01192.2003>
- Jayachandran, M., Zhang, T., Ganesan, K., Xu, B., & Chung, S. S. M. (2018). Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism via insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 829, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.015>
- Jing, X., Li, D.-Q., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. v., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T., Rorsman, P., & Renström, E. (2005).  $\text{CaV}2.3$  calcium channels control second-phase insulin release. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 146–154. <https://doi.org/10.1172/JCI22518>
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C., & MacDonald, M. J. (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia*, 53(6), 1019–1032. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1685-0>
- Joseph, J., Anand, K., Malindisa, S. T., Oladipo, A. O., & Fagbohun, O. F. (2021). Exercise, CaMKII, and type 2 diabetes. *EXCLI Journal*, 20, 386–399. <https://doi.org/10.17179/excli2020-3317>

- Jung, K. Y., Kim, K. M., & Lim, S. (2014). Therapeutic approaches for preserving or restoring pancreatic  $\beta$ -cell function and mass. *Diabetes & Metabolism Journal*, 38(6), 426. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.6.426>
- Kamp, T. J., & Hell, J. W. (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase a and protein kinase C. *Circulation Research*, 87(12), 1095–1102. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.1095>
- Kandandapani, S., Balaraman, A. K., & Ahamed, H. N. (2015). Extracts of passion fruit peel and seed of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) attenuate oxidative stress in diabetic rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(9), 680–686. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30066-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30066-2)
- Kaneko, Y. K., & Ishikawa, T. (2015). Diacylglycerol signaling pathway in pancreatic  $\beta$ -cells: an essential role of diacylglycerol kinase in the regulation of insulin secretion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(5), 669–673. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00060>
- Kanzaki, M. (2006). Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocrine Journal*, 53(3), 267–293. <https://doi.org/10.1507/endocrj.KR-65>
- Kappel, V. D., Cazarolli, L. H., Pereira, D. F., Postal, B. G., Madoglio, F. A., Buss, Z. da S., Reginatto, F. H., & B. Silva, F. R. M. (2013). Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: Multiple sites of action. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4), 706–715. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000062>
- Kappel, V. D., Cazarolli, L. H., Pereira, D. F., Postal, B. G., Zamoner, A., Reginatto, F. H., & Silva, F. R. M. B. (2013a). Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(8), 1179–1186. <https://doi.org/10.1111/jphp.12066>
- Kappel, V. D., Frederico, M. J. S., Postal, B. G., Mendes, C. P., Cazarolli, L. H., & Silva, F. R. M. B. (2013b). The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: Potential insulin secretagogue effect. *European Journal of Pharmacology*, 702(1–3), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.055>
- Kappel, V. D., Pereira, D. F., Cazarolli, L. H., Guesser, S. M., da Silva, C. H. B., Schenkel, E. P., Reginatto, F. H., & Silva, F. R. M. B. (2012). Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. *Molecules*, 17(6), 6754–6768. <https://doi.org/10.3390/molecules17066754>
- Karam, I., Ma, N., Yang, Y.-J., & Li, J.-Y. (2018). Induce hyperlipidemia in rats using high fat diet investigating blood lipid and histopathology. *Journal of Hematology and Blood Disorders*, 4(1). <https://doi.org/10.15744/2455-7641.4.104>
- Ke, M., Hu, X. Q., Ouyang, J., Dai, B., & Xu, Y. (2012). The effect of astragalín on the VEGF production of cultured Müller cells under high glucose conditions. *Bio-Medical*

- Materials and Engineering*, 22(1–3), 113–119. <https://doi.org/10.3233/BME-2012-0696>
- Khan, M. A. B., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H., & al Kaabi, J. (2020). Epidemiology of type 2 diabetes – global burden of disease and forecasted trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 10(1), 107–111. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191028.001>
- Khelifi, R., Dhaouefi, Z., Toumia, I. Ben, Lahmar, A., Sioud, F., Bouhajeb, R., Bellalah, A., & Chekir-Ghedira, L. (2020). *Erica multiflora* extract rich in quercetin-3-O-glucoside and kaempferol-3-O-glucoside alleviates high fat and fructose diet-induced fatty liver disease by modulating metabolic and inflammatory pathways in Wistar rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 86, 108490. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108490>
- Kim, B., Cho, B., & Jang, S. (2018). Anti-obesity effects of *Diospyros lotus* leaf extract in mice with high-fat diet-induced obesity. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3941>
- Kim, M. S., & Kim, S. H. (2011). Inhibitory effect of astragaloside on expression of lipopolysaccharide induced inflammatory mediators through NF- $\kappa$ B in macrophages. *Archives of Pharmacal Research*, 34(12), 2101–2107. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1213-x>
- Kittl, M., Beyreis, M., Tumurkhuu, M., Fürst, J., Helm, K., Pitschmann, A., Gaisberger, M., Glasl, S., Ritter, M., & Jakab, M. (2016). Quercetin stimulates insulin secretion and reduces the viability of rat INS-1 beta-cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 278–293. <https://doi.org/10.1159/000445623>
- Kjøbsted, R., Hingst, J. R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M., Pehmøller, C., Shum, M., Marette, A., Mounier, R., Treebak, J. T., Wojtaszewski, J. F. P., Viollet, B., & Lantier, L. (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *The FASEB Journal*, 32(4), 1741–1777. <https://doi.org/10.1096/fj.201700442R>
- Koh, D. S., Cho, J. H., & Chen, L. (2012). Paracrine interactions within islets of Langerhans. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(2), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9752-2>
- Krisman, C. (1962). A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochemistry*, 4(1), 17–23.
- Kyriazis, G. A., Smith, K. R., Tyrberg, B., Hussain, T., & Pratley, R. E. (2014). Sweet taste receptors regulate basal insulin secretion and contribute to compensatory insulin hypersecretion during the development of diabetes in male mice. *Endocrinology*, 155(6), 2112–2121. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2015>

- Lacy, P. E., & Kostianovsky, M. D. (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 6(1), 35–39.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Li, H., Park, H.-M., Ji, H.-S., Han, J., Kim, S.-K., Park, H.-Y., & Jeong, T.-S. (2020). Phenolic-enriched blueberry-leaf extract attenuates glucose homeostasis, pancreatic  $\beta$ -cell function, and insulin sensitivity in high-fat diet-induced diabetic mice. *Nutrition Research*, 73, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.09.005>
- Li, R., Bilik, D., Brown, M. B., Zhang, P., Ettner, S. L., Ackermann, R. T., Crosson, J. C., & Herman, W. H. (2013). Medical costs associated with type 2 diabetes complications and comorbidities. *The American Journal of Managed Care*, 19(5), 421–430.
- Li, Y., Wang, P., Xu, J., & Desir, G. V. (2006). Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(2), C345–C351. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2005>
- Liu, M., Weiss, M. A., Arunagiri, A., Yong, J., Rege, N., Sun, J., Haataja, L., Kaufman, R. J., & Arvan, P. (2018). Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20, 28–50. <https://doi.org/10.1111/dom.13378>
- Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Georgiev, T., Osorio-Fuentealba, C., Espinosa, A., Hidalgo, J., Hidalgo, C., & Jaimovich, E. (2015). The cholesterol-lowering agent methyl- $\beta$ -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(4), E294–E305. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2014>
- Lochner, A., & Moolman, J. A. (2006). The many faces of H89: A review. *Cardiovascular Drug Reviews*, 24(3–4), 261–274. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Randall, R. J., & Farr, L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Luna, B., & Feinglos, M. N. (2001). Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *American Family Physician*, 63(9), 1747–1756.
- Lytton, J., Westlin, M., & Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17067–17071.



- Ma, Q., Guo, Y., Sun, L., & Zhuang, Y. (2017). Anti-diabetic effects of phenolic extract from rambutan peels (*Nephelium lappaceum*) in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutrients*, 9(8), 801. <https://doi.org/10.3390/nu9080801>
- Ma, Z., Piao, T., Wang, Y., & Liu, J. (2015). Astragalosin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammatory mediators production in human osteoarthritis chondrocyte by inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK activation. *International Immunopharmacology*, 25(1), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.01.018>
- MacDonald, P. E., Joseph, J. W., & Rorsman, P. (2005). Glucose-sensing mechanisms in pancreatic  $\beta$ -cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2211–2225. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1762>
- MacDonald, P. E., & Wheeler, M. B. (2003). Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*, 46(8), 1046–1062. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1159-8>
- McCarty, M. F. (2006). PKC-mediated modulation of L-type calcium channels may contribute to fat-induced insulin resistance. *Medical Hypotheses*, 66(4), 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.08.034>
- McTaggart, J. S., Clark, R. H., & Ashcroft, F. M. (2010). Symposium review: The role of the K<sub>ATP</sub> channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *The Journal of Physiology*, 588(17), 3201–3209. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191767>
- Mendez, C. F., Leibiger, I. B., Leibiger, B., Høy, M., Gromada, J., Berggren, P.-O., & Bertorello, A. M. (2003). Rapid association of protein kinase C- $\epsilon$  with insulin granules is essential for insulin exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44753–44757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308664200>
- Ministerio de la Protección Social. (2016). *Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la diabetes mellitus tipo 2 en la población mayor de 18 años* (1st ed.).
- Miralles, F., & Portha, B. (2001). Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 50(suppl\_1), S84. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.S84>
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W., & Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. In D. Miranda, G. Fischer, C. Carranza, S. Magnitskiy, F. Casierra, W. Piedrahíta, & L. E. Flórez (Eds.), *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents* (1ra Ed). Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas

- Mirhoseini, M., Baradaran, A., & Rafieian-kopaei, M. (2013). Medicinal plants, diabetes mellitus and urgent needs. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 2(2), 53–54
- Miroddi, M., Calapai, G., Navarra, M., Minciullo, P. L., & Gangemi, S. (2013). *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.047>
- Monzón, G., Castellanos, L., Meneses, C., Forero, A. M., Rodríguez, J., Aragón, M., Jiménez, C., & Ramos, F. A. (2021). Identification of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and ligularoside a, a new triterpenoid saponin from *Passiflora ligularis* Juss (sweet granadilla) leaves, by a nuclear magnetic resonance- based metabolomic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07850>
- Moon, M. K., Hur, K.-Y., Ko, S.-H., Park, S.-O., Lee, B.-W., Kim, J. H., Rhee, S. Y., Kim, H. J., Choi, K. M., & Kim, N.-H. (2017). Combination therapy of oral hypoglycemic agents in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal*, 41(5), 357. <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.5.357>
- Morimoto M. S. (2000). Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Revista del Hospital General Manuel Gea González*, 3(3), 118-120.
- Mounika, K. L. S. (2015). In silico evaluation of alpha glucosidase and alpha amylase inhibitory activity of chemical constituents from *Psoralea corylifolia*. *International Journal of ChemTech Research*, 8(11), 532–538.
- Nakrani, M. N., Wineland, R. H., & Anjum, F. (2021). *Physiology, Glucose Metabolism*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Nerdy, N., & Ritarwan, K. (2019). Hepatoprotective activity and nephroprotective activity of peel extract from three varieties of the passion fruit (*Passiflora sp.*) in the albino rat. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(4), 536–542. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.153>
- Neumiller, J. J. (2009). Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *Journal of the American Pharmacists Association*, 49(5), S16–S29. <https://doi.org/10.1331/JAPhA.2009.09078>
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.379>

- Noshahr, Z. S., Salmani, H., Khajavi Rad, A., & Sahebkar, A. (2020). Animal models of diabetes-associated renal injury. *Journal of Diabetes Research*, 2020, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/9416419>
- Nugent, D. A., Smith, D. M., & Jones, H. B. (2008). A review of islet of Langerhans degeneration in rodent models of type 2 diabetes. *Toxicologic Pathology*, 36(4), 529–551. <https://doi.org/10.1177/0192623308318209>
- O'Brien, T., Nguyen, T. T., & Zimmerman, B. R. (1998). Hyperlipidemia and diabetes mellitus. *Mayo Clinic Proceedings*, 73(10), 969–976. <https://doi.org/10.4065/73.10.969>
- Ogunbayo, O. A., Harris, R. M., Waring, R. H., Kirk, C. J., & Michelangeli, F. (2008). Inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase by flavonoids: A quantitative structure-activity relationship study. *IUBMB Life*, 60(12), 853–858. <https://doi.org/10.1002/iub.132>
- Ojuka, E. O., Goyaram, V., & Smith, J. A. H. (2012). The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(3), E322–E331. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00091.2012>
- Oldoni, T. L. C., Merlin, N., Bicas, T. C., Prasniewski, A., Carpes, S. T., Ascari, J., de Alencar, S. M., Massarioli, A. P., Bagatini, M. D., Morales, R., & Thomé, G. (2021). Antihyperglycemic activity of crude extract and isolation of phenolic compounds with antioxidant activity from *Moringa oleifera* Lam. leaves grown in Southern Brazil. *Food Research International*, 141, 110082. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110082>
- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. (2018). Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
- Oteiza, P. I., Fraga, C. G., Mills, D. A., & Taft, D. H. (2018). Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.001>
- Pacheco, G., Simão, M. J., Vianna, M. G., Garcia, R. O., Vieira, M. L. C., & Mansur, E. (2016). In vitro conservation of *Passiflora* —A review. *Scientia Horticulturae*, 211, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>
- Panchanathan, S., & Rajendran, J. (2015). Evidence of anti-hyperglycemic and anti-oxidant effect of *Passiflora edulis flavicarpa* (sims.) in streptozotocin induced diabetic rats. *Notulae Scientia Biologicae*, 7(4), 383–389. [10.15835/nsb.7.4.9655](https://doi.org/10.15835/nsb.7.4.9655)

- Pandeya, P. R., Lee, K.-H., Lamichhane, R., Lamichhane, G., Poudel, A., & Jung, H.-J. (2021). Evaluation of anti-obesity activity of an herbal formulation (F2) in DIO mice model and validation of UPLC-DAD method for quality control. *Applied Sciences*, 11(16), 7404. <https://doi.org/10.3390/app11167404>
- Pandol, S. J. (2011). The exocrine pancreas. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 3(1), 1–64. <https://doi.org/10.4199/C00026ED1V01Y201102ISP014>
- Park, J. E., Park, J. Y., Seo, Y., & Han, J. S. (2019). A new chromanone isolated from *Portulaca oleracea* L. increases glucose uptake by stimulating GLUT4 translocation to the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.206>
- Park, S. N., Kim, S. Y., Lim, G. N., Jo, N. R., & Lee, M. H. (2012). *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(2), 680–683. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.11.126>
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H., & Strålfors, P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9670–9678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007454200>
- Parra, M., Aguilera, A., Escobar, W., Rubiano, V., & Rodríguez, A. (2010). *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de granadilla en el Departamento del Huila*. Asofrucol. [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_165\\_AGENDA\\_GRANADILLA.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_165_AGENDA_GRANADILLA.pdf)
- Patel, D., Prasad, S., Kumar, R., & Hemalatha, S. (2012). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4), 320–330. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60032-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60032-X)
- Patel, S., & Dutta, S. (2018). Insulin. *RCSB Protein Data Bank*. [https://doi.org/10.2210/rcsb\\_pdb/GH/DM/drugs/Insulin/Insulin](https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/Insulin/Insulin)
- Pereira Fontana, D., Cazarolli, L. H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo, M. S. R. B., Guedes, A., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2011). Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 27(11–12), 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.008>
- Pinent, M., Castell, A., Baiges, I., Montagut, G., Arola, L., & Ardévol, A. (2008). Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4), 299–308. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00048.x>

- Ploug, T., & Ralston, E. (2002). Exploring the whereabouts of GLUT4 in skeletal muscle (Review). *Molecular Membrane Biology*, 19(1), 39–49. <https://doi.org/10.1080/09687680110119229>
- Prabhakar, P., & Doble, M. (2008). A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Current Diabetes Reviews*, 4(4), 291–308. <https://doi.org/10.2174/157339908786241124>
- Prem, P. N., & Kurian, G. A. (2021). High-fat diet increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by renal ischemia-reperfusion injury in rat. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.715693>
- Qin, G., Ma, J., Huang, Q., Yin, H., Han, J., Li, M., Deng, Y., Wang, B., Hassan, W., & Shang, J. (2018). Isoquercetin improves hepatic lipid accumulation by activating ampk pathway and suppressing TGF- $\beta$  signaling on an HFD-induced nonalcoholic fatty liver disease rat model. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4126. <https://doi.org/10.3390/ijms19124126>
- Queiroz, E. A. M., Paim, R. T. T., Lira, S. M., da Silva, J. Y. G., Lima, C. L. S., Holanda, M. O., Benjamin, S. R., Vieira, Í. G. P., & Guedes, M. I. F. (2018). Antihyperglycemic effect of *Passiflora glandulosa* cav. fruit rinds flour in streptozotocin-induced diabetic mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(9), 510–517. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.242308>
- Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., & Zakaria, M. H. (2014). Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/167309>
- Ranilla, L. G., Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(12), 4676–4689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093>
- Ravussin, E., & Smith, S. R. (2006). Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967(1), 363–378. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04292.x>
- Rehani, P. R., Iftikhar, H., Nakajima, M., Tanaka, T., Jabbar, Z., & Rehani, R. N. (2019). Safety and mode of action of diabetes medications in comparison with 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Journal of Diabetes Research*, 2019, 4267357. <https://doi.org/10.1155/2019/4267357>

- Rehwald, A., Meier, B., & Sticher, O. (1994). Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 69(3), 153–158. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0031-6865(94)90017-5)
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., & Selamoglu, Z. (2018). Astragalín: A bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Science*, 2018, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>
- Rickels, M. R., Norris, A. W., & Hull, R. L. (2020). A tale of two pancreases: exocrine pathology and endocrine dysfunction. *Diabetologia*, 63(10), 2030–2039. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05210-8>
- Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 1–58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110062>
- Rodriguez, L., Stirling, C. J., & Woodman, P. G. (1994). Multiple N-ethylmaleimide-sensitive components are required for endosomal vesicle fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 5(7), 773–783. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.7.773>
- Rorsman, P., Braun, M., & Zhang, Q. (2012). Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell Calcium*, 51(3–4), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.11.006>
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renström, E., Gromada, J., Barg, S., & Göpel, S. (2000). The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News in Physiological Sciences*, 15(2), 72–77. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.2.72>
- Rosler, K.-H., & Goodwin, R. S. (1984). A general use of amberlite XAD-2 resin for the purification of flavonoids from aqueous fractions. *Journal of Natural Products*, 47(1), 188–188. <https://doi.org/10.1021/np50031a036>
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Safayhi, H., Haase, H., Kramer, U., Bihlmayer, A., Roenfeldt, M., Ammon, H. P., Froschmayr, M., Cassidy, T. N., Morano, I., Ahlijanian, M. K., & Striessnig, J. (1997). L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Molecular Endocrinology*, 11(5), 619–629. <https://doi.org/10.1210/mend.11.5.9922>

- Sakaguchi, K., Takeda, K., Maeda, M., Ogawa, W., Sato, T., Okada, S., Ohnishi, Y., Nakajima, H., & Kashiwagi, A. (2016). Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance. *Diabetology International*, 7(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s13340-015-0212-4>
- Salaj, N., Kladar, N., Srđenović Čonić, B., Jeremić, K., Hitl, M., Gavarić, N., & Božin, B. (2021). Traditional multi-herbal formula in diabetes therapy – Antihyperglycemic and antioxidant potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(10), 103347. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103347>
- Salehi, Ata, v. Anil Kumar, Sharopov, Ramírez-Alarcón, Ruiz-Ortega, Abdulmajid Ayatollahi, Tsouh Fokou, Kobarfard, Amiruddin Zakaria, Iriti, Taheri, Martorell, Sureda, Setzer, Durazzo, Lucarini, Santini, Capasso & Sharifi-Rad. (2019). Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. *Biomolecules*, 9(10), 551. <https://doi.org/10.3390/biom9100551>
- Salgado, J. M., Bombarde, T. A. D., Mansi, D. N., Piedade, S. M. de S., & Meletti, L. M. M. (2010). Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 784–789. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300034>
- Salih, N. D., Muslih, R. K., & Hamoodi, S. R. (2009). Histological liver changes in streptozotocin induced diabetic mice. *International Medical Journal Malaysia*, 8(1), 1-4.
- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Samini, F., & Farkhondeh, T. (2016). Chrysin treatment improves diabetes and its complications in liver, brain, and pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(4), 388–393. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0412>
- Santilli, F., Simeone, P., Liani, R., & Davì, G. (2015). Platelets and diabetes mellitus. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 120, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.05.002>
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., & Marks, A. R. (2017). Intracellular calcium release channels: an update. *The Journal of Physiology*, 595(10), 3041–3051. <https://doi.org/10.1113/JP272781>
- Santulli, G., Pagano, G., Sardu, C., Xie, W., Reiken, S., Ascia, S. L. D., Cannone, M., Marziliano, N., Trimarco, B., Guise, T. a, Lacampagne, A., Marks, A. R., D'Ascia, S. L., Cannone, M., Marziliano, N., Trimarco, B., Guise, T. a, Lacampagne, A., & Marks, A. R. (2015). Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1968–1978. <https://doi.org/10.1172/JCI79273>

- Sarto, D. A. Q. S., Siqueira, A. H. D. de, Magalhaes, F. M. de A., Caproni, K. de P., Martins, Â. M., Santos, G. B., Silva, D. B. da, Boas, B. M. V., & Garcia, J. A. D. (2018). Dry extract of *Passiflora incarnata* L. leaves as a cardiac and hepatic oxidative stress protector in LDLr<sup>-/-</sup> mice fed high-fat diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180147>
- Satyanarayana, K., Sravanthi, K., Shaker, I., Ponnulakshmi, R., & Selvaraj, J. (2015). Role of chrysin on expression of insulin signaling molecules. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 6(4), 248. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.157951>
- Scheepers, A., Joost, H., & Schurmann, A. (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(5), 364–371. <https://doi.org/10.1177/0148607104028005364>
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., & Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, 6(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>
- Sepúlveda, P. M., Echeverry, S., Costa, G., & Aragón, M. (2020). *Passiflora ligularis* leaf ultrasound-assisted extraction in the optimization of flavonoid content and enhancement of hypoglycemic activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10810>
- Sepúlveda Ramos, P. M. (2021). *Contribución a la caracterización biofarmacéutica de un extracto de hojas de Passiflora ligularis (granadilla) optimizado en flavonoides*. Universidad Nacional de Colombia.
- Seyer-Hansen, K. (1976). Renal Hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clinical Science*, 51(6), 551–555. <https://doi.org/10.1042/cs0510551>
- Shaker, S. M., Magdy, Y. M., Abd-Elaziz, L. F., El-Said, S. A., Alkharashy, O. A., & Nabeeh, E. S. (2014). Histological study on the effect of metformin on high-fat-diet-induced liver injury in adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Histology*, 37(3), 592–602. <https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000452726.54766.93>
- Shanmugam, S., Rajan, M., de Souza Araújo, A. A., & Narain, N. (2018). Potential of Passion (*Passiflora spp.*) fruit in control of type II diabetes. *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*, 7(3). <https://doi.org/10.19080/CRDOJ.2018.07.555712>
- Sheng, L., Chen, Q., Di, L., & Li, N. (2021). Evaluation of anti-diabetic potential of corn silk in high-fat diet/ streptozotocin-induced type 2 diabetes mice model. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 21(1), 131–138. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200606224708>
- Silva Frederico, M. J., Mascarello, A., Castro, A. J. G., Da Luz, G., Altenhofen, D., Mendes, C. P., Leal, P. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., & Silva, F. R. M. B. (2016).



- Incretinomimetic and insulinomimetic effect of (2E)-N'-(1'-Naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide for glycemic homeostasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1002/jcb.25403>
- Simons, K., & Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>
- Skelin Klemen, M., Dolenšek, J., Slak Rupnik, M., & Stožer, A. (2017). The triggering pathway to insulin secretion: Functional similarities and differences between the human and the mouse  $\beta$  cells and their translational relevance. *Islets*, 9(6), 109–139. <https://doi.org/10.1080/19382014.2017.1342022>
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(4), 349–358. <https://doi.org/10.1111/jdi.12235>
- Smart, E. J., & Anderson, R. G. W. (2002). Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods in enzymology*, 353, 131-139 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)53043-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)53043-3)
- Smirnov, A. V., Snigur, G. L., & Voronkov, M. P. (2012). Pancreatic islet beta-cell apoptosis in experimental diabetes mellitus. *Apoptosis and Medicine*. InTech. <https://doi.org/10.5772/51411>
- Soares D, J., Leal P, A. B., Silva, J., Almeida, Jackson R. G. S., & de Oliveira, H. (2017). Influence of flavonoids on mechanism of modulation of insulin secretion. *Pharmacognosy Magazine*, 13(52), 639-646. [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_87\\_17](https://doi.org/10.4103/pm.pm_87_17)
- Somwar, R., Kim, D. Y., Sweeney, G., Huang, C., Niu, W., Lador, C., Ramlal, T., & Klip, A. (2001). GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical Journal*, 359(3), 639–649. <https://doi.org/10.1042/bj3590639>
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52(4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
- Sudasinghe, H. P., & Peiris, D. C. (2018). Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. *PeerJ*, 6, E4389. <https://doi.org/10.7717/peerj.4389>
- Suen, J., Thomas, J., Kranz, A., Vun, S., & Miller, M. (2016). Effect of flavonoids on oxidative stress and inflammation in adults at risk of cardiovascular disease: A systematic review. *Healthcare*, 4(3), 69. <https://doi.org/10.3390/healthcare4030069>

- Sugano, M., Yamato, H., Hayashi, T., Ochiai, H., Kakuchi, J., Goto, S., Nishijima, F., Iino, N., Kazama, J. J., Takeuchi, T., Mokuda, O., Ishikawa, T., & Okazaki, R. (2006). High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: A new rat model of diabetic nephropathy. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *16*(7), 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.08.007>
- Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A., & Klip, A. (1999). An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 Myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(15), 10071–10078. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10071>
- Tajima, K., Shirakawa, J., Okuyama, T., Kyohara, M., Yamazaki, S., Togashi, Y., & Terauchi, Y. (2017). Effects of metformin on compensatory pancreatic  $\beta$ -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *313*(3), E367–E380. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00447.2016>
- Tal, M., Liang, Y., Najafi, H., Lodish, H. F., & Matschinsky, F. M. (1992). Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(24), 17241–17247. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41918-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41918-7)
- Tamayo, D. C., Camacho, S. M., & López, P. A. (2015). Caracterización de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 atendidos por médicos residentes de medicina familiar en Bogotá, Colombia. *Revista Desafíos*, *9*(2), 17–24.
- Teixeira, L. S., Lima, A. S., Boleti, A. P. A., Lima, A. A. N., Libório, S. T., de Paula, L., Oliveira, M. I. B., Lima, E. F., Costa, G. M., Reginatto, F. H., & Lima, E. S. (2014). Effects of *Passiflora nitida* Kunth leaf extract on digestive enzymes and high caloric diet in rats. *Journal of Natural Medicines*, *68*(2), 316–325. <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0800-1>
- Tesh, G. H., & Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). *Nephrology*, *12*(3), 261–266. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x>
- Thiyagarajah, P., Kuttan, S. C., Lim, S. C., Teo, T. S., & Das, N. P. (1991). Effect of myricetin and other flavonoids on the liver plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump kinetics and structure-function relationships. *Biochemical Pharmacology*, *41*(5), 669–675. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90065-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90065-D)
- Thompson, B., & Satin, L. S. (2021). Beta-cell ion channels and their role in regulating insulin secretion. *Comprehensive Physiology*, *11*(4), 1-21. <https://doi.org/10.1002/cphy.c210004>

- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., & Rizvi, S. I. (2013). Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *Journal of Biomarkers*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/378790>
- Tremblay, F., Dubois, M.-J., & Marette, A. (2003). Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Frontiers in Bioscience*, 8(12), d1072–d1084.
- Trube, G., Rorsman, P., & Ohno-Shosaku, T. (1986). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Archiv*, 407(5), 493–499.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(4), 315–331. <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>
- Tunduguru, R., & Thurmond, D. C. (2017). Promoting glucose transporter-4 vesicle trafficking along cytoskeletal tracks: PAK-Ing them out. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00329>
- Unuofin, J. O., & Lebelo, S. L. (2020). Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of Type 2 Diabetes: An Updated Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1356893>
- Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., & Křen, V. (2014). Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267–282.
- Vasiljević, J., Torkko, J. M., Knoch, K. P., & Solimena, M. (2020). The making of insulin in health and disease. *Diabetologia*, 63(10), 1981–1989. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05192-7>
- Viera, W., Shinohara, T., Samaniego, I., Sanada, A., Terada, N., Ron, L., Suárez-Tapia, A., & Koshio, K. (2022). Phytochemical composition and antioxidant activity of *Passiflora* spp. germplasm grown in Ecuador. *Plants*, 11(3), 328. <https://doi.org/10.3390/plants11030328>
- Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*, 12(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>

- Wang, H., Xia, W., Long, G., Pei, Z., Li, Y., Wu, M., Wang, Q., Zhang, Y., Jia, Z., & Chen, H. (2020). Isoquercitrin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity via the inhibition of apoptosis, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.599416>
- Wang, Y., Sun, G., Sun, J., Liu, S., Wang, J., Xu, X., & Miao, L. (2013). Spontaneous type 2 diabetic rodent models. *Journal of Diabetes Research*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/401723>
- Wilkinson, S. E., Parker, P. J., & Nixon, J. S. (1993). Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochemical Journal*, *294*(2), 335–337. <https://doi.org/10.1042/bj2940335>
- Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, *89*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1079/BJN2002763>
- World Health Organization (WHO). (2021). *Diabetes*. [https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1)
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the Flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(sup1), S29–S45. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595>
- Xie, L., Deng, Z., Zhang, J., Dong, H., Wang, W., Xing, B., & Liu, X. (2022). Comparison of flavonoid O-glycoside, C-glycoside and their aglycones on antioxidant capacity and metabolism during *in vitro* digestion and *in vivo*. *Foods*, *11*(6), 882. <https://doi.org/10.3390/foods11060882>
- Xu, Y. C., Leung, S. W. S., Leung, G. P. H., & Man, R. Y. K. (2015). Kaempferol enhances endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery through activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *British Journal of Pharmacology*, *172*(12), 3003–3014. <https://doi.org/10.1111/bph.13108>
- Yanardag, R., Ozsoy-Sacan, O., Bolkent, S., Orak, H., & Karabulut-Bulan, O. (2005). Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. *Human & Experimental Toxicology*, *24*(3), 129–135. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht507oa>
- Yang, H., & Yang, L. (2016). Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of Molecular Endocrinology*, *57*(2), R93–R108. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0316>
- Yang, S.-N., & Berggren, P.-O. (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cell physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, *27*(6), 621–676. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0888>

- Yang, Y., Smith, D. L., Keating, K. D., Allison, D. B., & Nagy, T. R. (2014). Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity*, 22(10), 2147–2155. <https://doi.org/10.1002/oby.20811>
- Yaras, N., Ugur, M., Ozdemir, S., Gurdal, H., Purali, N., Lacampagne, A., Vassort, G., & Turan, B. (2005). Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and  $Ca^{2+}$  homeostasis in rat heart. *Diabetes*, 54(11). <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3082>
- Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J. F., Gross, R., Petit, P., Bataille, D., & Oiry, C. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology*, 161(4), 799–814. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00910.x>
- Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci*, 64, 873–891. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6359-9>
- Zhang, L., Zhang, S.-T., Yin, Y.-C., Xing, S., Li, W.-N., & Fu, X.-Q. (2018). Hypoglycemic effect and mechanism of isoquercitrin as an inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 in type 2 diabetic mice. *RSC Advances*, 8(27), 14967–14974.
- Zhang, M., Lv, X.-Y., Li, J., Xu, Z.-G., & Chen, L. (2008). The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental Diabetes Research*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/704045>
- Zhang, Q., Ramracheya, R., Lahmann, C., Tarasov, A., Bengtsson, M., Braha, O., Braun, M., Brereton, M., Collins, S., Galvanovskis, J., Gonzalez, A., Groschner, L. N., Rorsman, N. J. G., Salehi, A., Travers, M. E., Walker, J. N., Gloyn, A. L., Gribble, F., Johnson, P. R. V., & Rorsman, P. (2013). Role of  $K_{ATP}$  channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, 18(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.014>
- Zhang, S., Xu, H., Yu, X., Wu, Y., & Sui, D. (2017). Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 383–390. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4475>
- Zhang, Y., & Liu, D. (2011). Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic  $\beta$ -cell viability and insulin secretory function. *European Journal of Pharmacology*, 670(1), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.011>
- Zhao, F., Li, P., Chen, S. R. W., Louis, C. F., & Fruen, B. R. (2001). Dantrolene inhibition of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels: molecular mechanism and isoform selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13810–13816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006104200>

- Zhou, Y.-J., Xu, N., Zhang, X.-C., Zhu, Y.-Y., Liu, S.-W., & Chang, Y.-N. (2021). Chrysin improves glucose and lipid metabolism disorders by regulating the AMPK/PI3K/AKT signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells and HFD/STZ-induced C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(20), 5618–5627. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01109>
- Zhu, M., Li, J., Wang, K., Hao, X., Ge, R., & Li, Q. (2016). Isoquercitrin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis of EA.hy926 cells via the PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway. *Molecules*, 21(3), 356. <https://doi.org/10.3390/molecules21030356>
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., & Schenkel, E. P. (2012). Analysis of C -glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 232–239. <https://doi.org/10.1002/pca.1348>